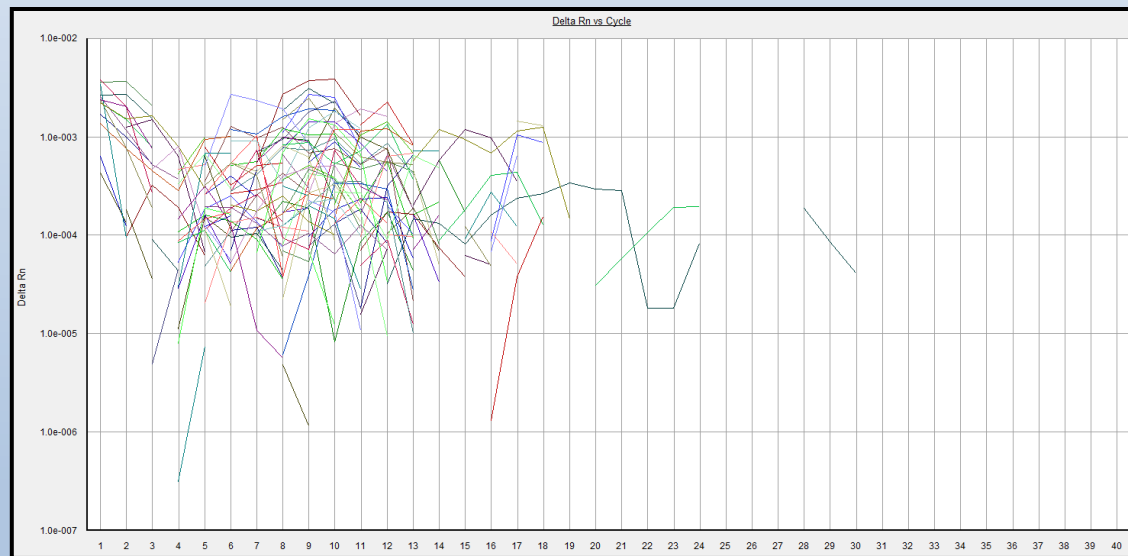


# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

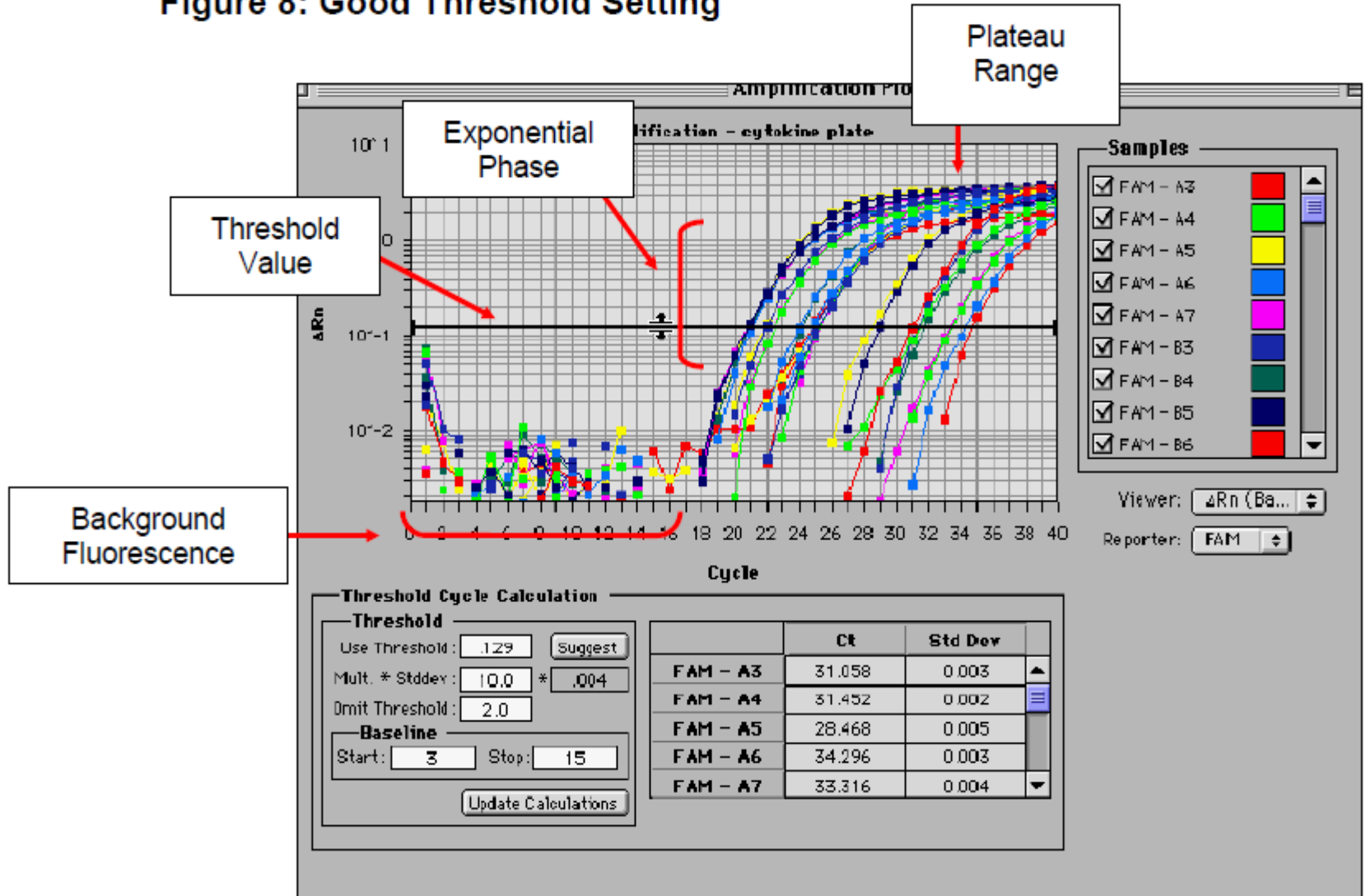


## VII. Troubleshooting

# 3 qPCR parameters

- **Baseline** – determined during early phases of qPCR across the entire plate, background signal
- **Threshold** – numerical value determined for each run, statistically significant point above the calculated baseline
- **Ct** – threshold cycle – cycle number where fluorescence crosses the threshold

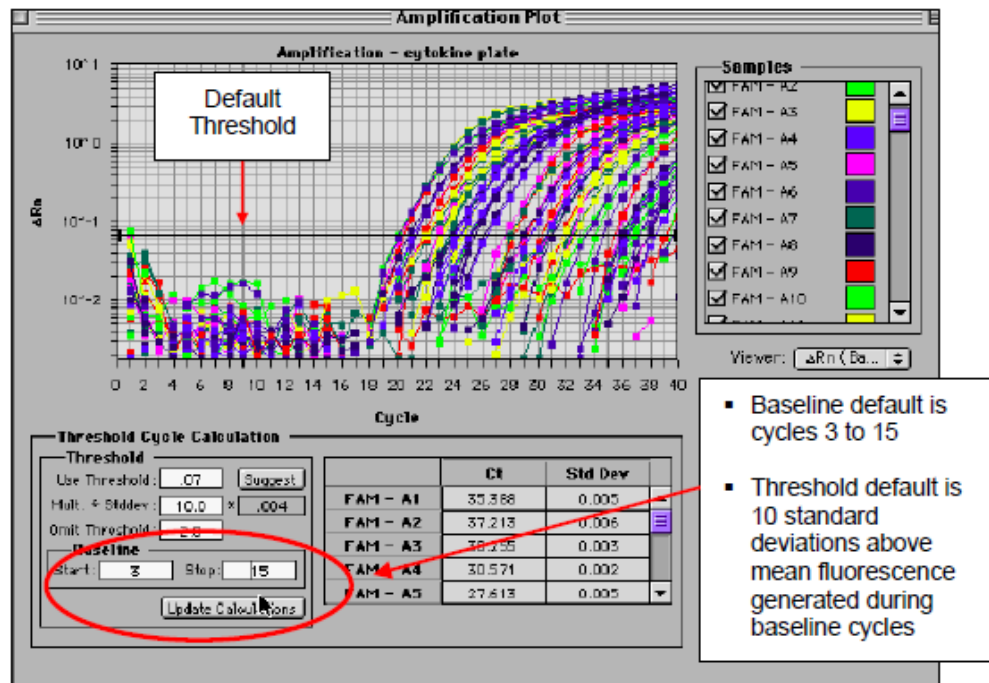
Figure 8: Good Threshold Setting



# Baseline

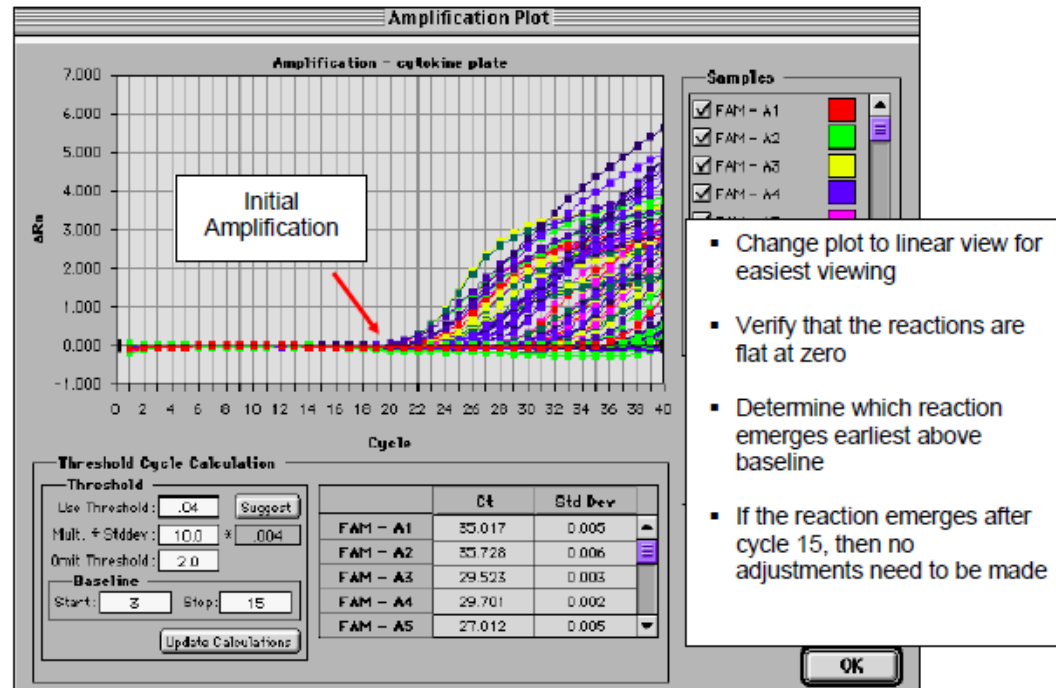
- Software – 3-15 cyklus reakce

Figure 1: Default Baseline



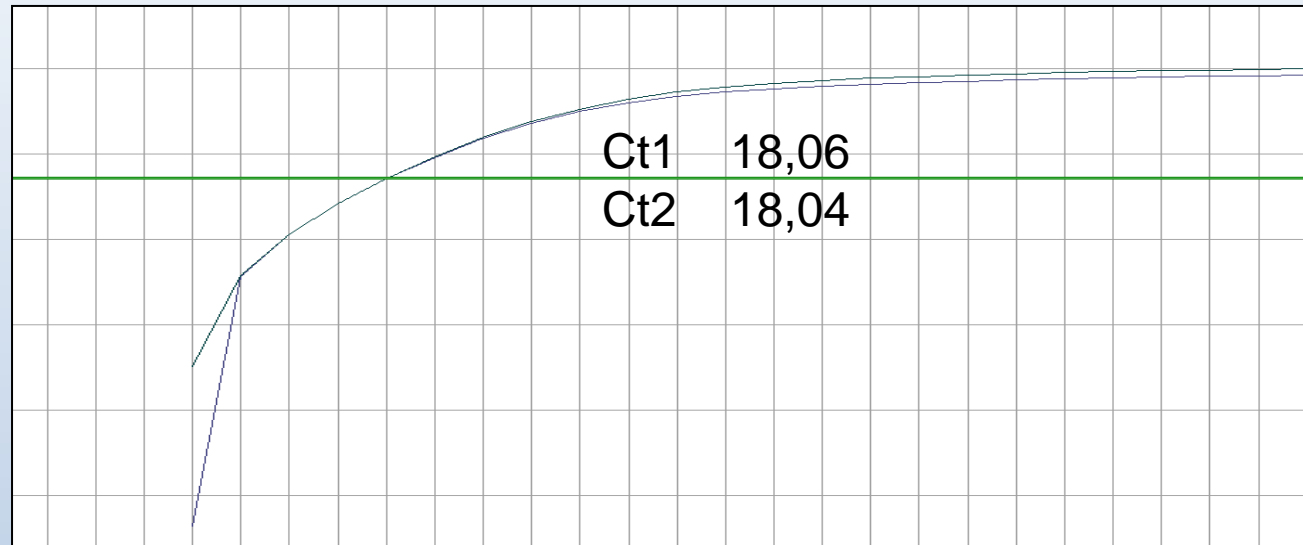
# Baseline

Figure 2: Baseline Adjustment



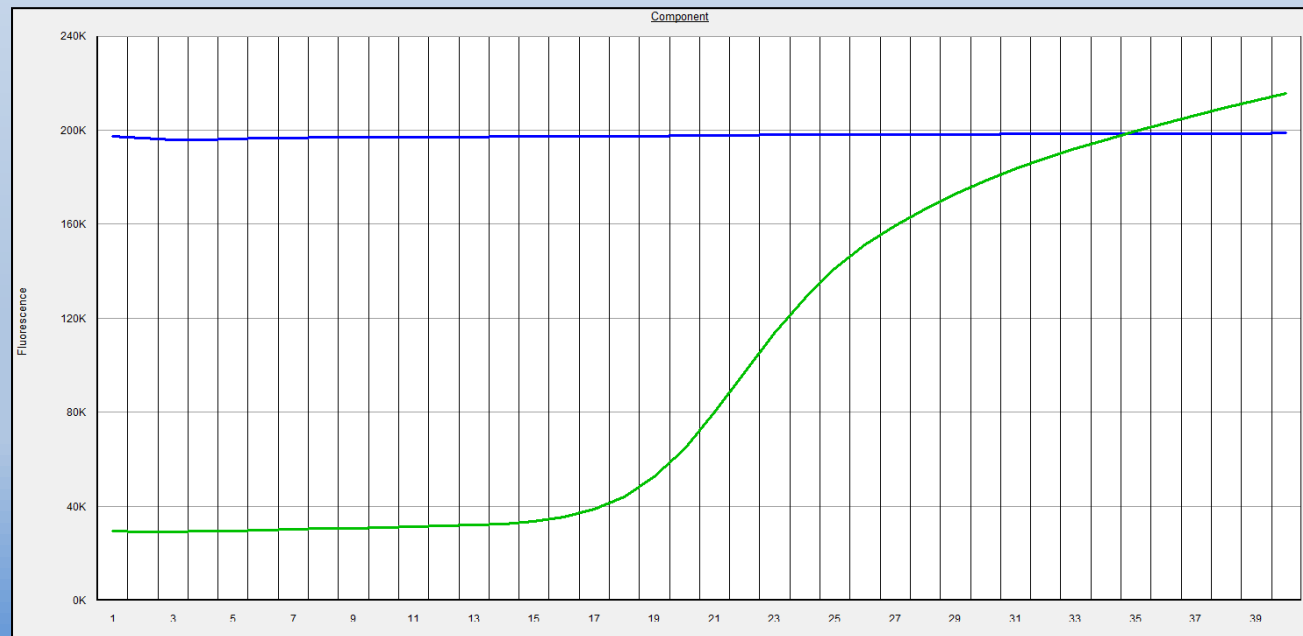
# Problémy v qRT-PCR analýze

## Jak vypadá správný amplifikační výstup?



## Duplikátní reakce

- Exponenciální amplifikace
- Identická amplifikace
- Podobné/shodné Ct
- Odpovídající fluorescence jednotlivých reportérů

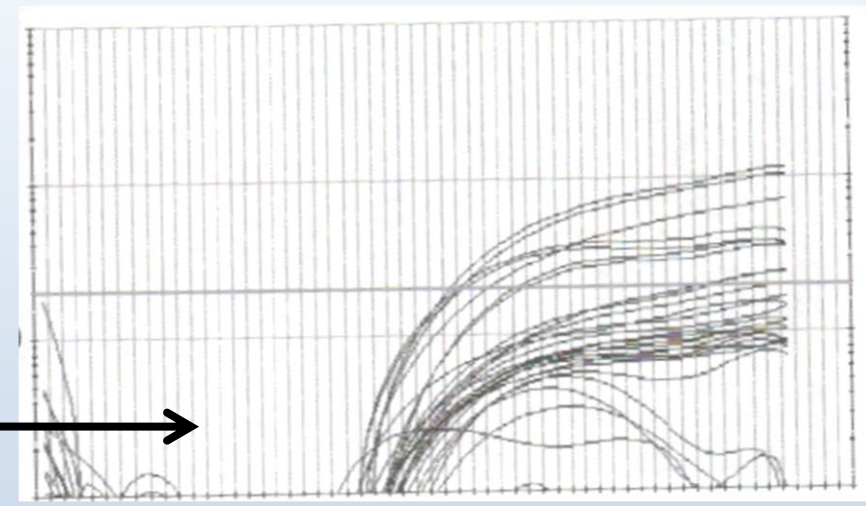


# Problémy v qRT-PCR analýze

## Problém 1:

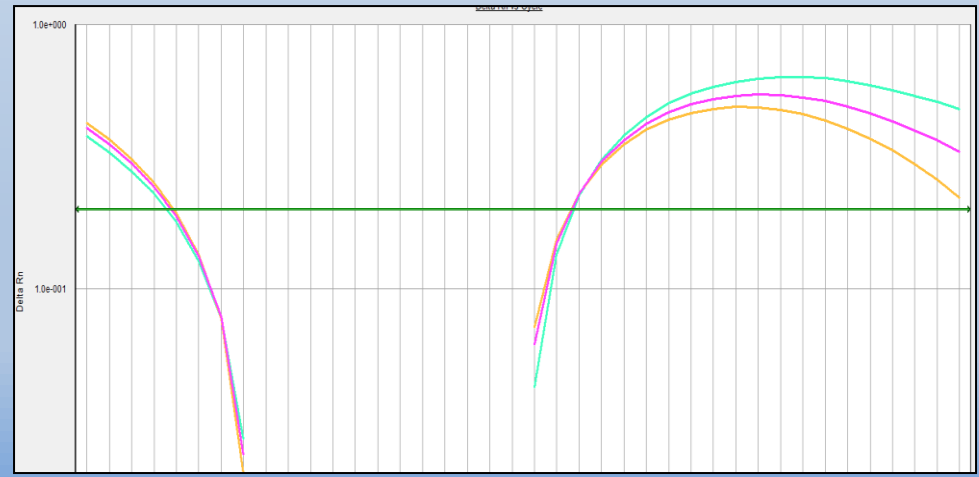
### Příliš mnoho templátu

- Vysoká hodnota pozadí
- Fluorescence v prvních cyklech (ze kterých se počítá baseline) je vyšší, než fluorescence na konci reakce



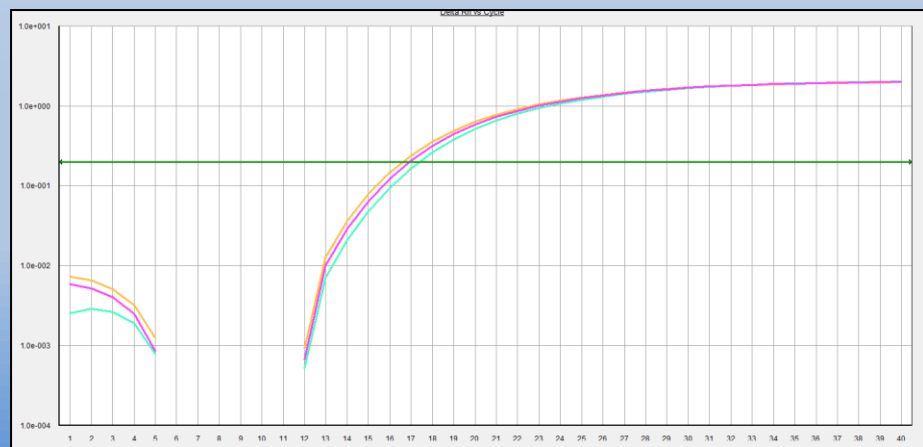
### Řešení:

- Ředit templát 1:100 – 1:1000 a zopakovat PCR
- Změnit manuálně treshold nebo nastavení baseline



Baseline 3.-13 cyklus →

← Baseline 3.-25. cyklus



# Problémy v qRT-PCR analýze

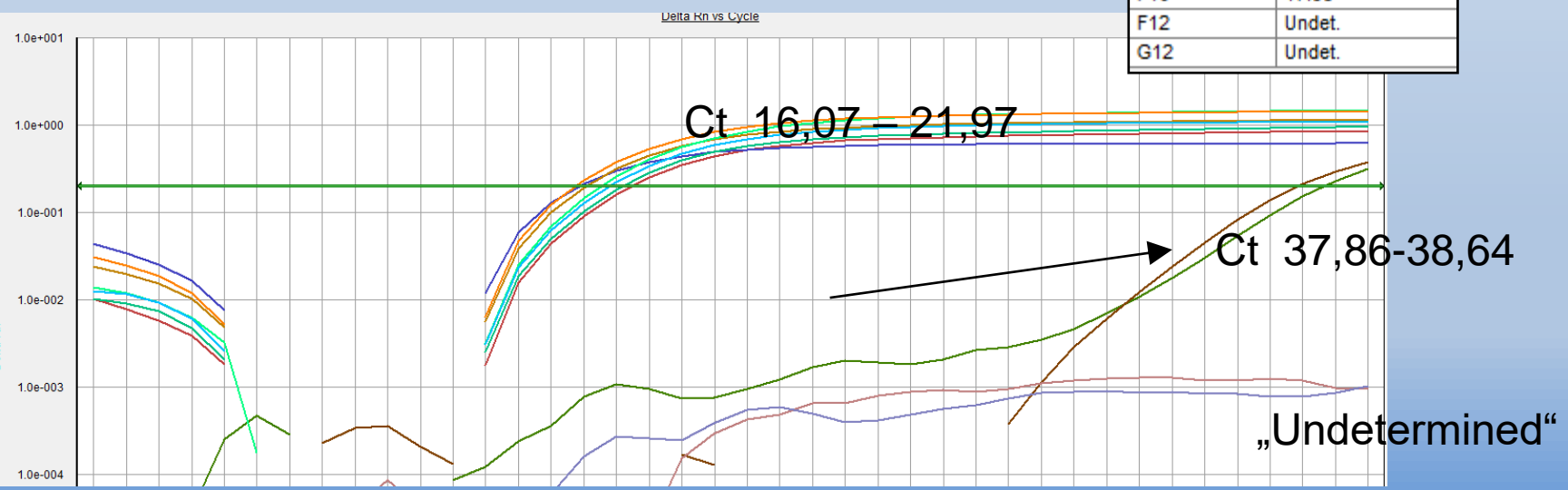
## Problém 2:

**Amlifikace není exponenciální**

Pravděpodobně přítomnost inhibitorů  
v konkrétním vzorku

**Řešení:** Ředění templátu 1:10-100

Well	Ct
A10	17.46
A10	21.97
A12	15.85
A12	19.26
B10	38.64
B10	Undet.
B12	37.86
B12	Undet.
C10	17.18
C10	20.35
C12	16.07
C12	19.16
D10	Undet.
D10	Undet.
D12	Undet.
D12	Undet.
E10	16.49
E10	21.55
E12	15.71
E12	20.11
F10	16.75
F10	17.93
F12	Undet.
G12	Undet.





# Problémy v qRT-PCR analýze

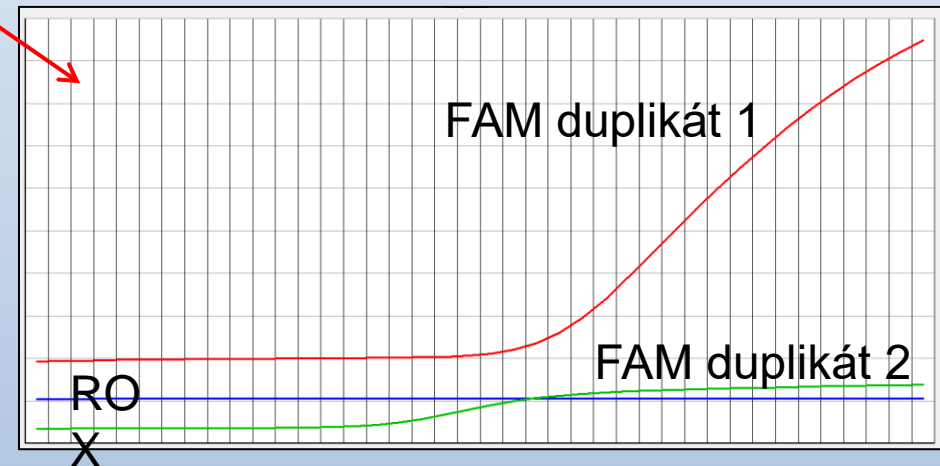
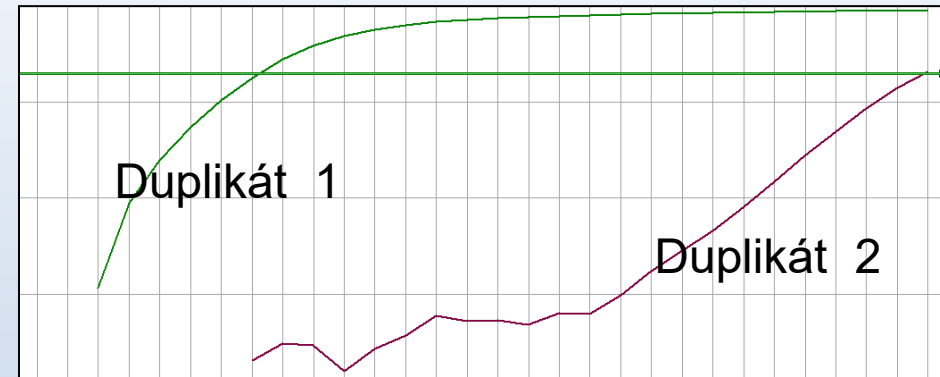
## Problém 3:

### Ct duplikátních reakcí se výrazně liší

- pravděpodobně nedošlo k amplifikaci
- gelová elektroforéza PCR reakcí  
nebo
- multikomponentní záznam fluorescence
- nepřesné pipetování, Monte Carlo efekt,  
přítomnost inhibitoru v reakci

### Řešení:

- Zopakovat reakce  
nebo (pokud už nemáme vzorky)
- vzít v úvahu Ct z exponenciální reakce
- přijít na příčinu problému (otestovat příslušnou  
jamku v bloku, reagentie atd.)



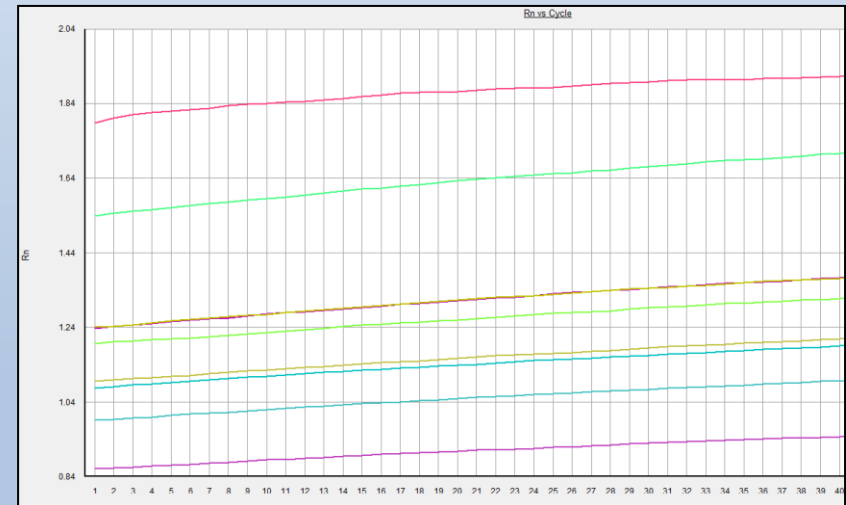
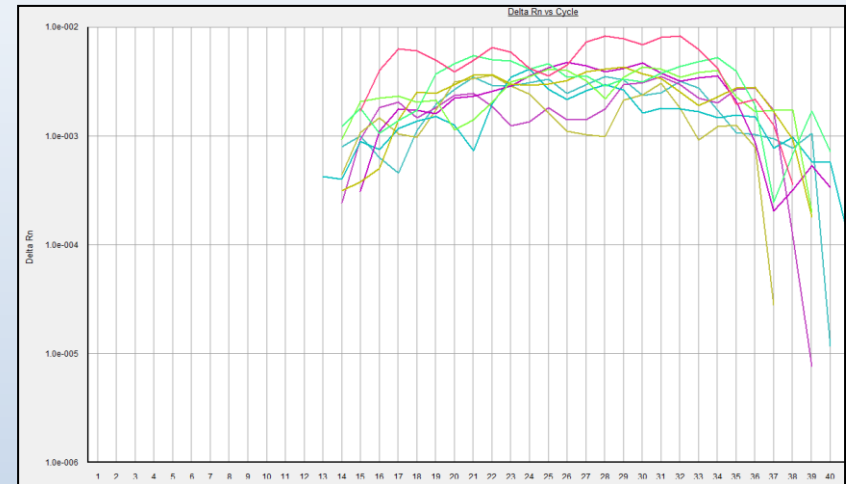
# Problémy v qRT-PCR analýze

## Problém 4:

### Nedošlo k amplifikaci u žádného vzorku

#### Řešení:

- Zopakovat reakce včetně pozitivní kontroly
- Pokud opět nedošlo k amplifikaci u žádného vzorku, zkontrolovat společné chemikálie (voda, master mix, sonda)
- Zkontrolovat reakci na agarózovém gelu a vyloučit selhání sondy, eventuálně provést reakci spolu se SYBR green
- Pokud se problém vyskytuje pouze u některých vzorků je problém s těmito vzorky (kvalita templátu, inhibice)



# Problémy v qRT-PCR analýze

## Problém 5:

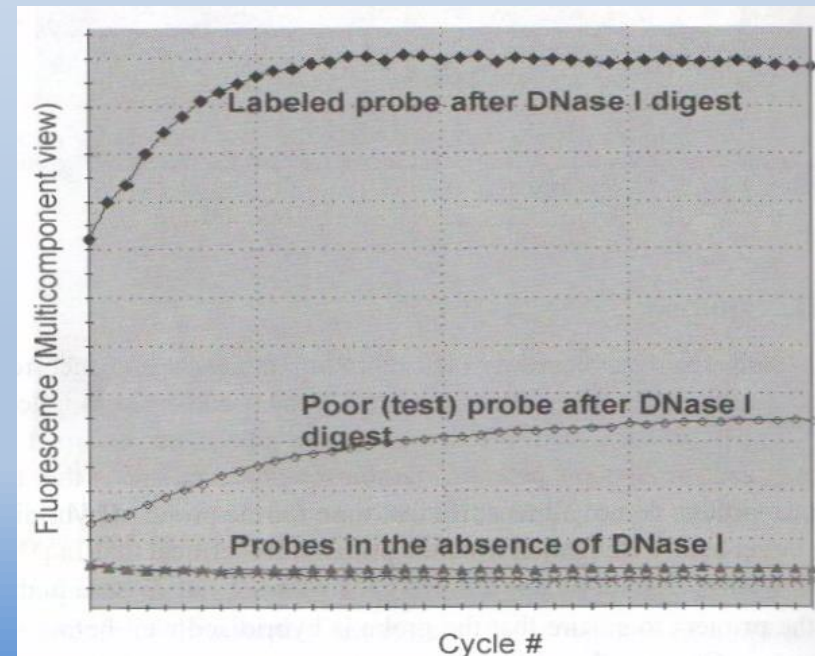
### Nefunguje sonda

#### Řešení:

- Vyloučit lidskou chybu, přítomnost inhibitorů, nekvalitní templát, chyby v RT
- Kontrola pomocí SYBR Green nebo v agarózovém gelu
- Pokud je vyloučeno selhání amplifikace, provést test s **DNázou I**

#### DNázal

- oddělí fluorofor od zhášeče a umožní fluorescenci
- problémy ve značení nebo purifikaci sondy



# Problémy v qRT-PCR analýze

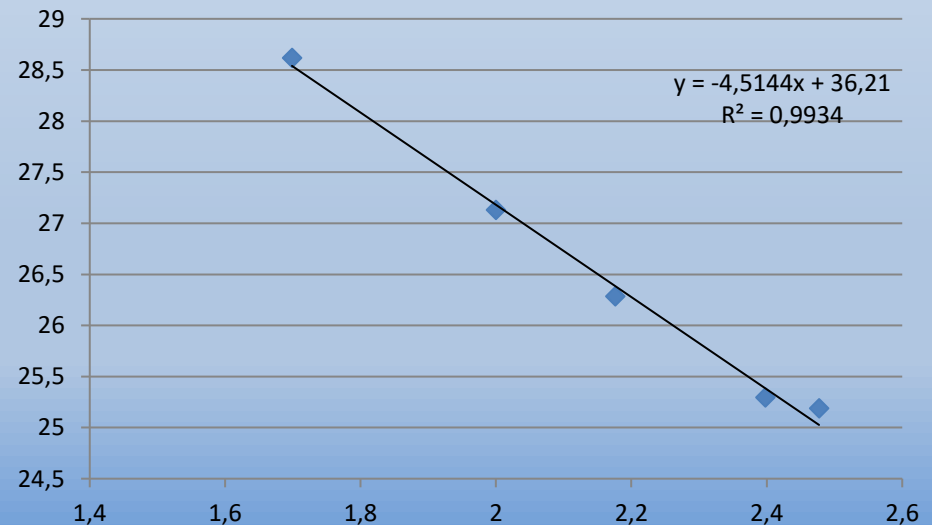
## Problém 6:

### Směrnice kalibrační křivky je menší než -3,3

- Efektivita PCR reakce je menší než 100%

### Řešení:

- chyba výpočtu, inhibitory v reakci, chyba při pipetování
- nové standardy
- kontaminace templátu, koncentrace  $MgCl_2$



# Problémy v qRT-PCR analýze

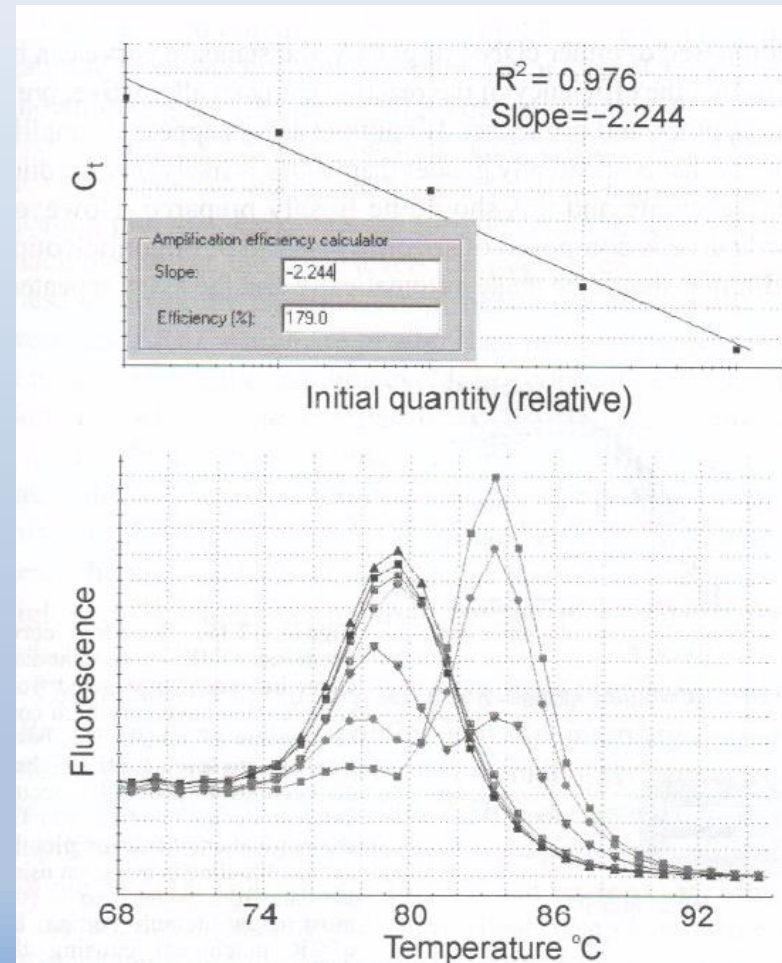
## Problém 7:

### Směrnice kalibrační křivky je větší než -3,3

- Účinnost PCR vyšší než 100%
- V případě specifické detekce (TaqMan) většinou pipetovací chyby nebo chyby ředění
  - event. změnit některé parametry analýzy (zejména baseline)
- SYBR Green – možné nespecifické produkty (primer dimery)

### Řešení:

- nová reakce
- optimalizace PCR



# Problémy v qRT-PCR analýze

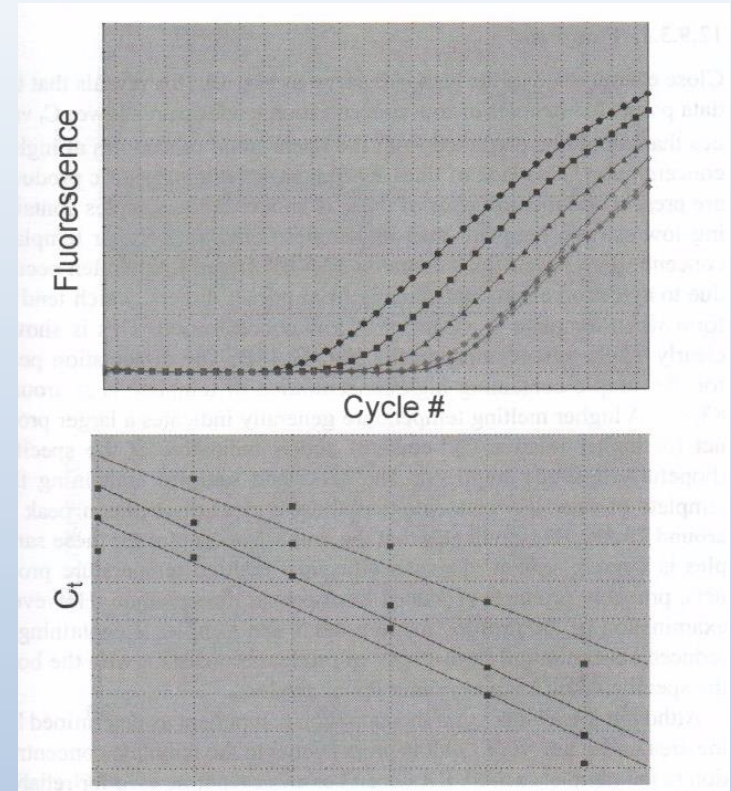
## Problém 8:

### Nelze naředit standardy na nižší koncentraci

- Přítomnost kontaminující DNA

### Řešení:

- nové standardy
- ověřit čistotu RNA vstupující do procesu



# Problémy v qRT-PCR analýze

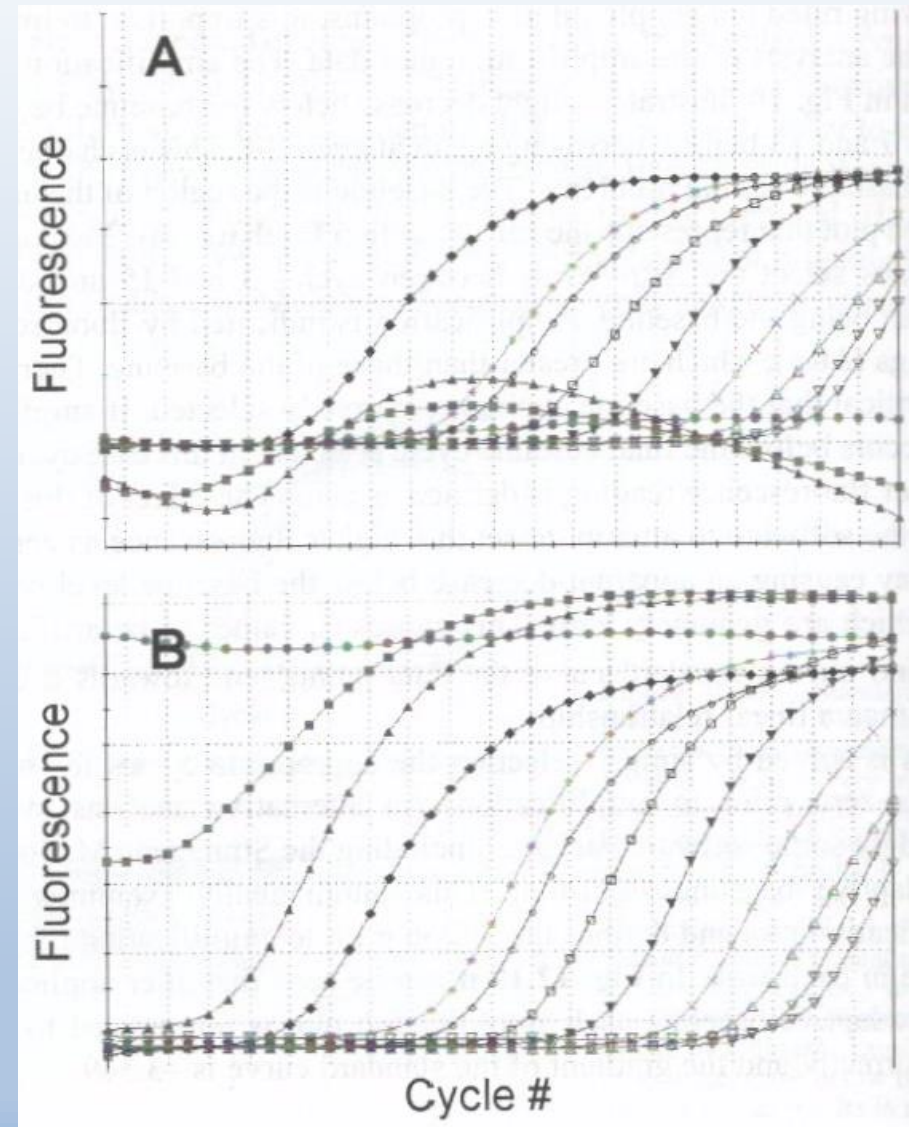
## Problém 9:

### Amplifikační grafy vypadají divně

- příliš mnoho templátu
- chybné nastavení baseline

### Řešení:

- naředit vzorky
- změnit nastavení baseline – vyloučit cykly, ve kterých je abnormální fluorescence
- změnit algoritmus výpočtu



# Problémy v qRT-PCR analýze

## Problém 9:

### Amplifikační grafy vypadají „divně“

- změnit algoritmus výpočtu – tzv. adaptivní nastavení baseline – pro každý cyklus jednotlivě

