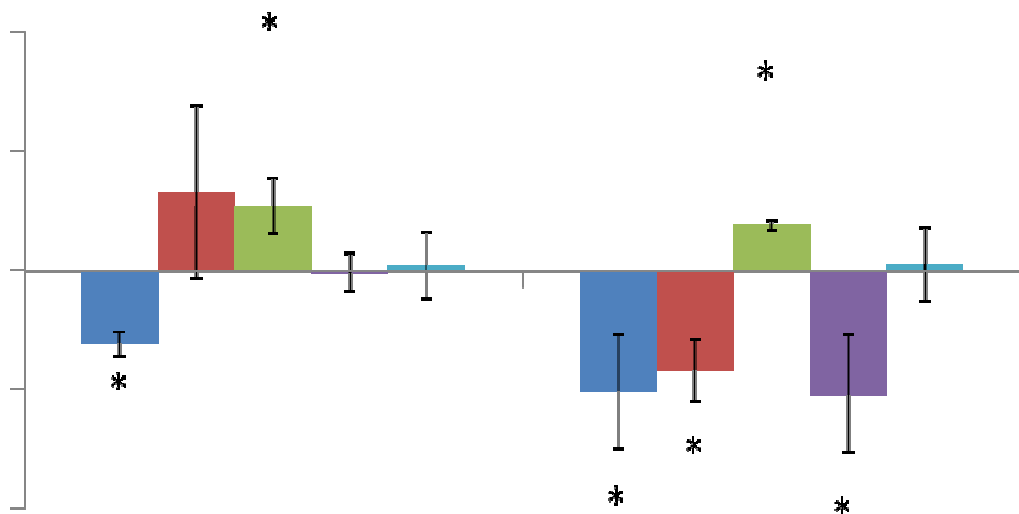


ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



2. Kvantifikační strategie

Kvantifikační strategie

Přesná kvantifikace závisí na:

Repeatability (Opakovatelnost)

Intra-assay variabilita (stejná analýza v jedné laboratoři)

Reproducibility (Reproducibilita)

Inter-assay variabilita (stejná analýza v různých laboratořích)

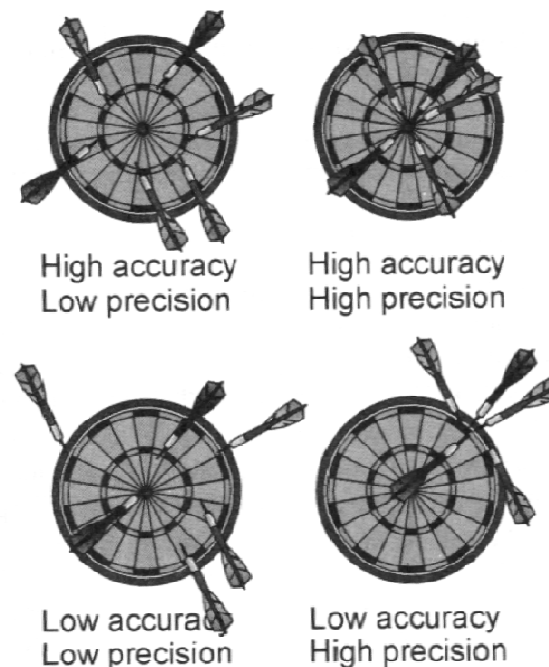


Accuracy (Správnost)

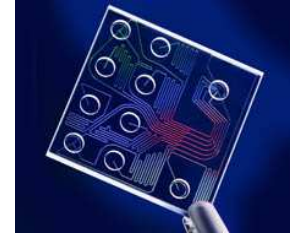
Shoda mezi experimentálně zjištěnou hodnotou a realitou

Precision (Přesnost)

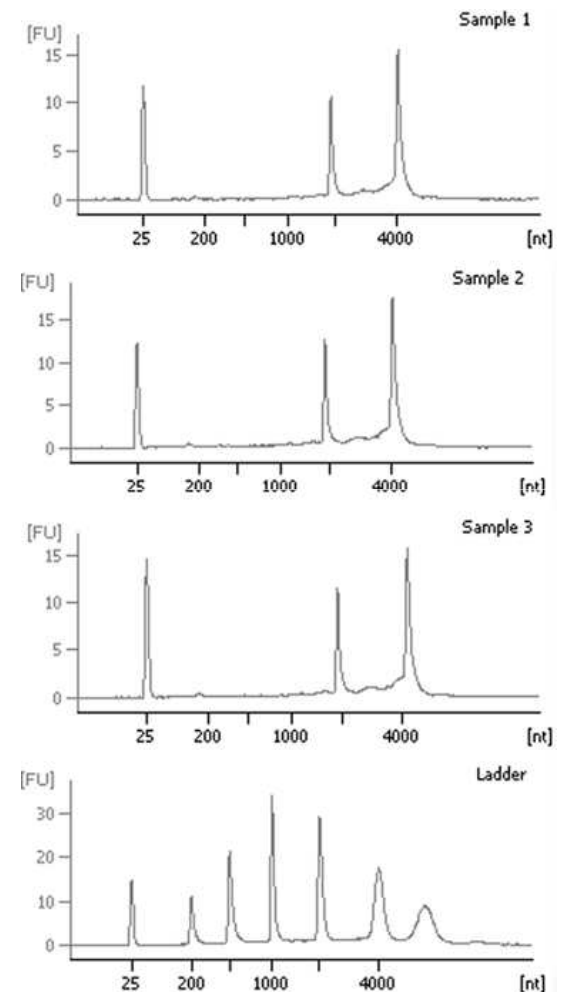
Shoda mezi experimenty („jak přesně pipetujeme“)



Templát – Izolace RNA



- Volba zdroje (charakter tkáně, biopsie, mikrodisekce...)
- Integrita (RNA Integrity Number – RIN) výpočet na základě 28S a 18S rRNA
- Čistota (A266/280; A260/230), přítomnost PCR inhibitorů
- Přesné určení koncentrace RNA
- Celková RNA nebo mRNA?
- Vhodnost metody, automatizace, výtěžek...



Reverzní transkripce

- Významný zdroj variability v qRT-PCR
- Metoda izolace RNA může významně ovlivnit proces reverzní transkripce
- Volba primerů, enzymu, teplotního profilu
- One step vs. Two step PCR

- Výtěžek cDNA
 - sekvence směrem 5'konci signifikantně nižší výtěžek než 3'
 - RNáza H

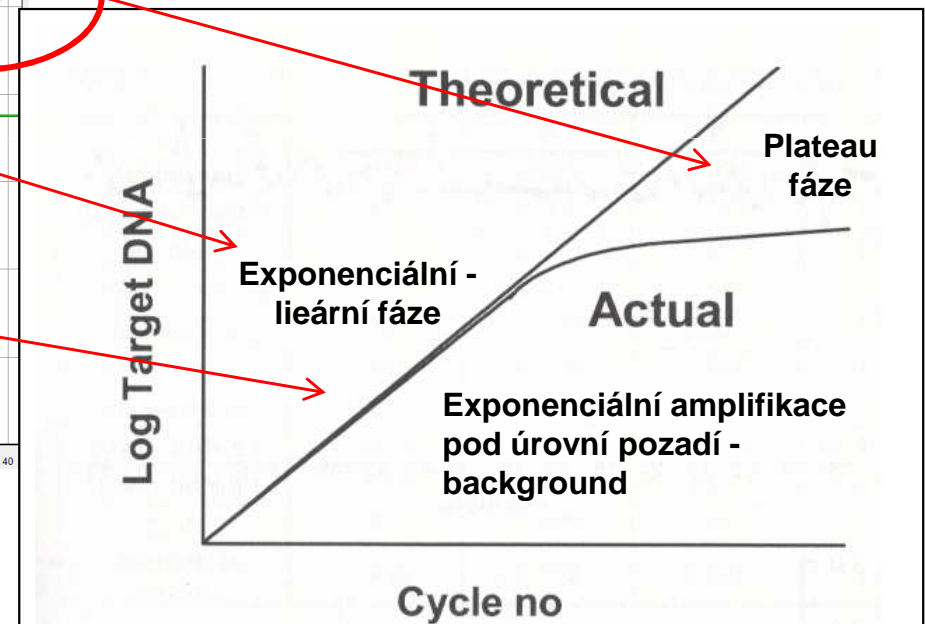
Kvantifikační strategie

End-point vs. Real-Time PCR

- Vztah mezi vstupním množstvím templátu a výsledným množstvím amplikonu je úměrný pouze v exponenciální fázi reakce.
- Klasická PCR proto musí být zastavena ještě před dosažením plateau fáze.
- Intra-assay variabilita klasické PCR (30-40%); Inter-assay variabilita (50-70%)



end point



Kvantifikační strategie

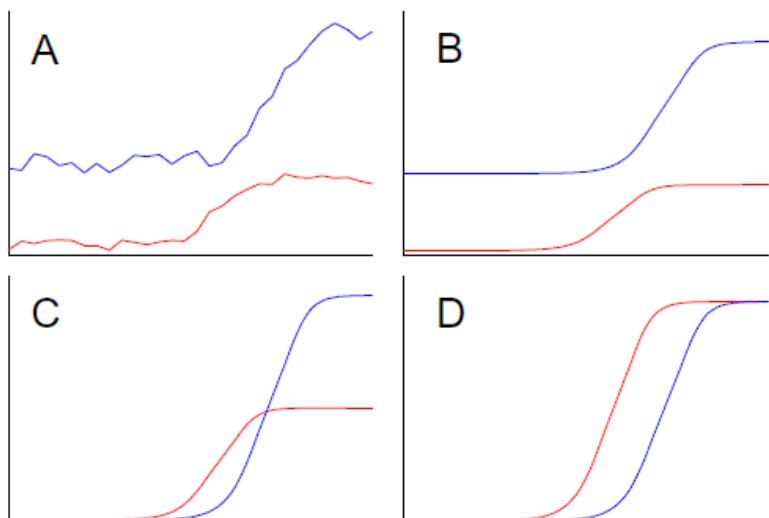
Zpracování dat

A data přímo z přístroje

B vyhlazení dat

C normalizace pozadí (na základě nespecifické fluorescence)

D normalizace amplitudy signálu (na základě plateau)



Množství polymerázy

Koncentrace primerů

Tvar mikrozkušavek

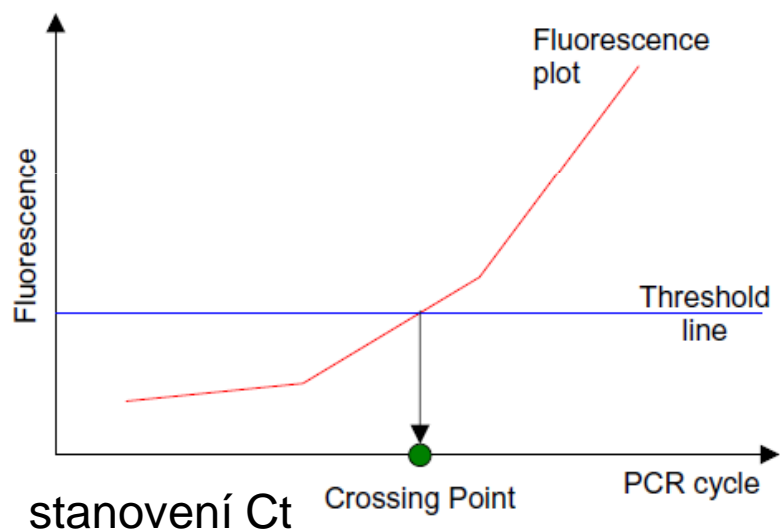
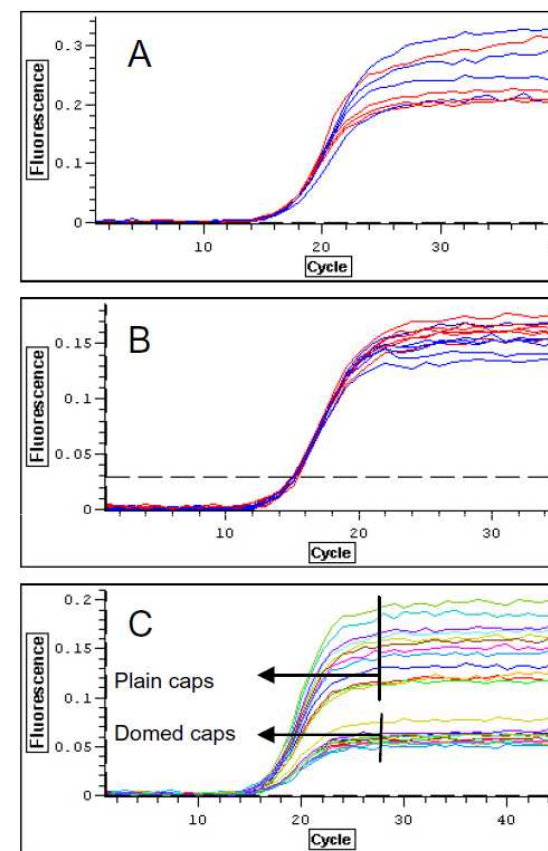
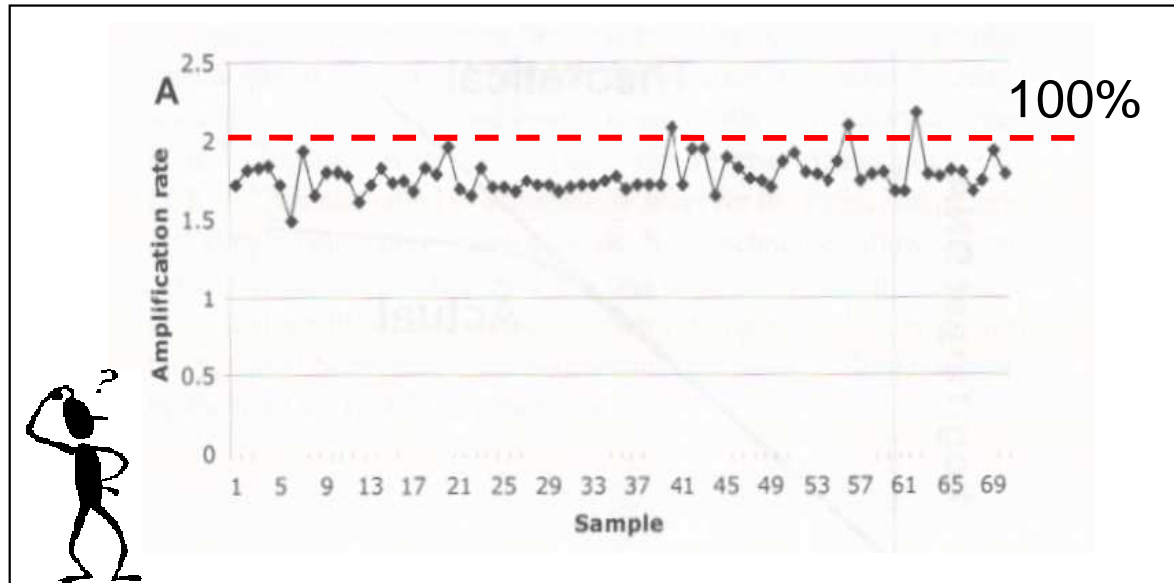


Figure 7

Effect of different factors on plateau position. A: More enzyme in blue than in red samples B: More primers in blue than in red samples C: Domed and plain caps

Kvantifikační strategie

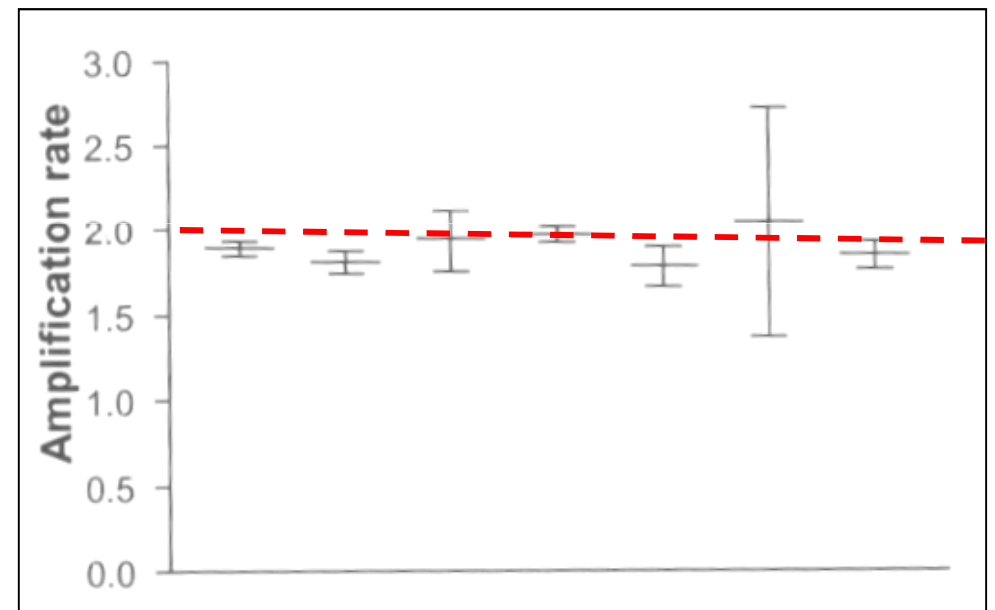
Účinnost PCR (Efficiency)



$$Y=N 2^n$$

$$Y=N (1+E\%)^n$$

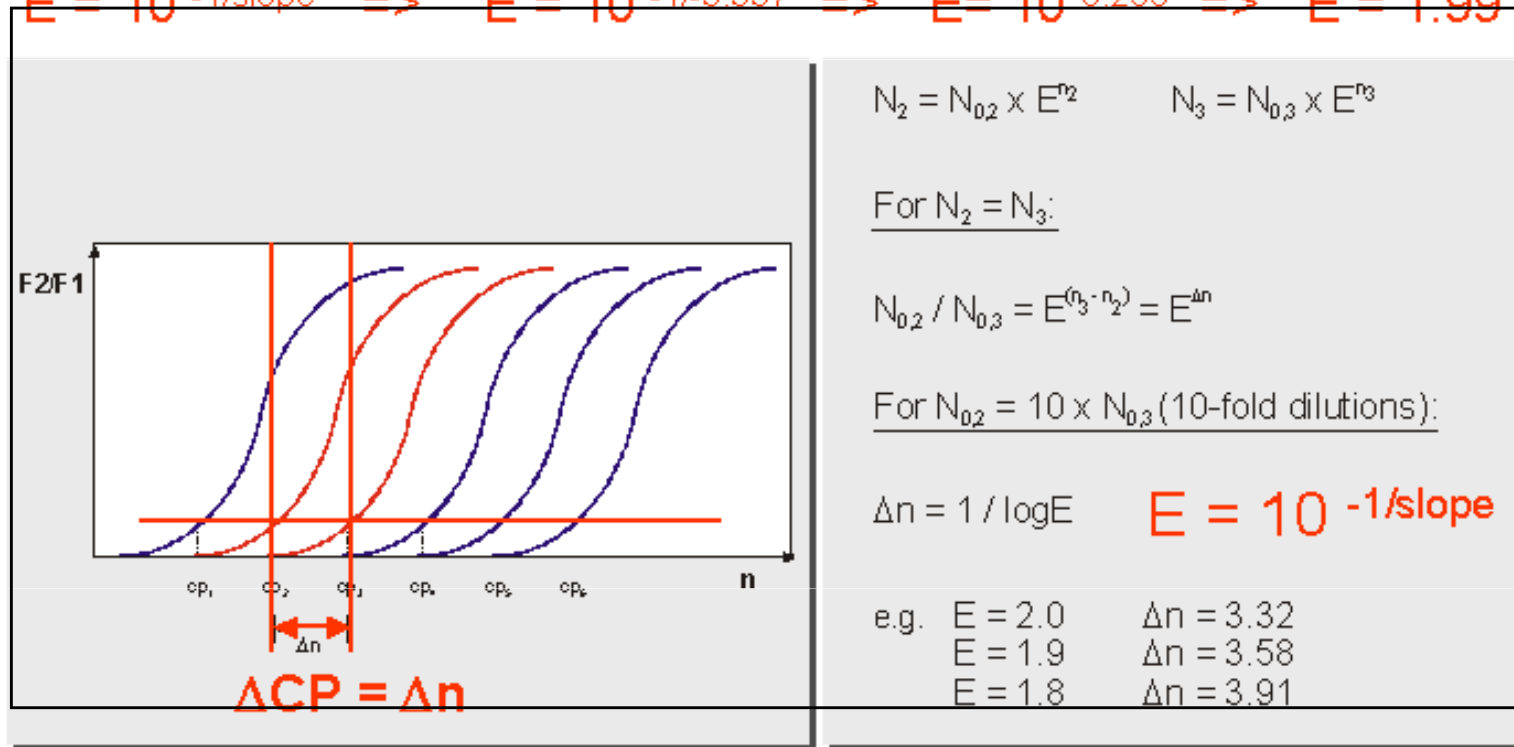
Účinnost PCR je 100% jen výjimečně, dokonce i v případě opakovaných PCR identických templátů



Účinnost PCR

Calculation of real-time PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \Rightarrow E = 10^{-1/-3.337} \Rightarrow E = 10^{0.299} \Rightarrow E = 1.99$$



Roche Diagnostics, LC rel. Quantification software, March 2001

Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds.

Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg; page 21-34

Kvantifikační strategie

Externí standardy

$$N_C = N_0 \cdot (E + 1)^C$$

$$N_0 = N_C / (E + 1)^C$$

$$N_0 = N_t / (E + 1)^{C_t}$$

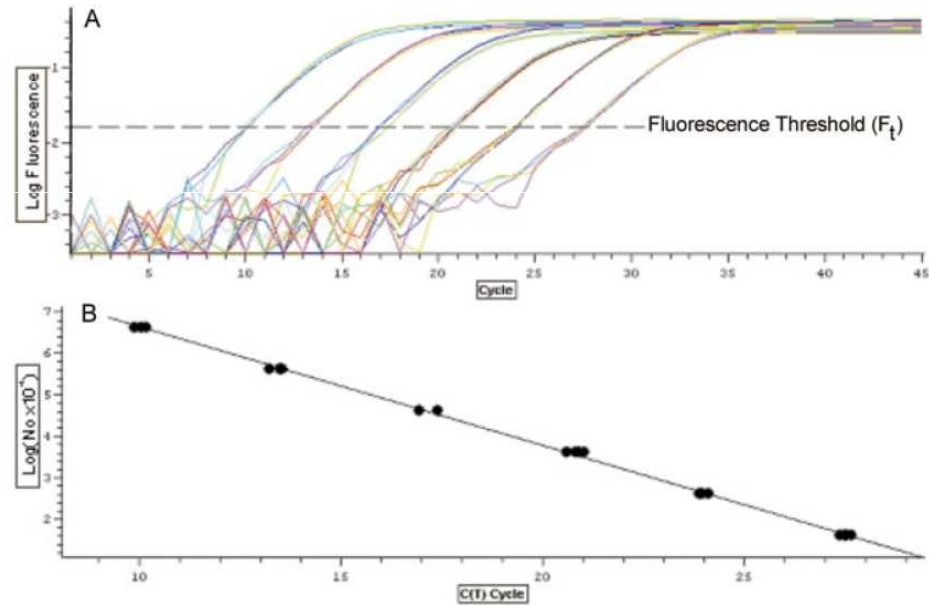


$$\text{Směrnice (k)} = -\text{Log}(E + 1)$$

$$E = 10^{-1/k}$$

$$\text{Posun} = \text{Log}(N_t)$$

$$N_t = 10^{\text{posun}}$$



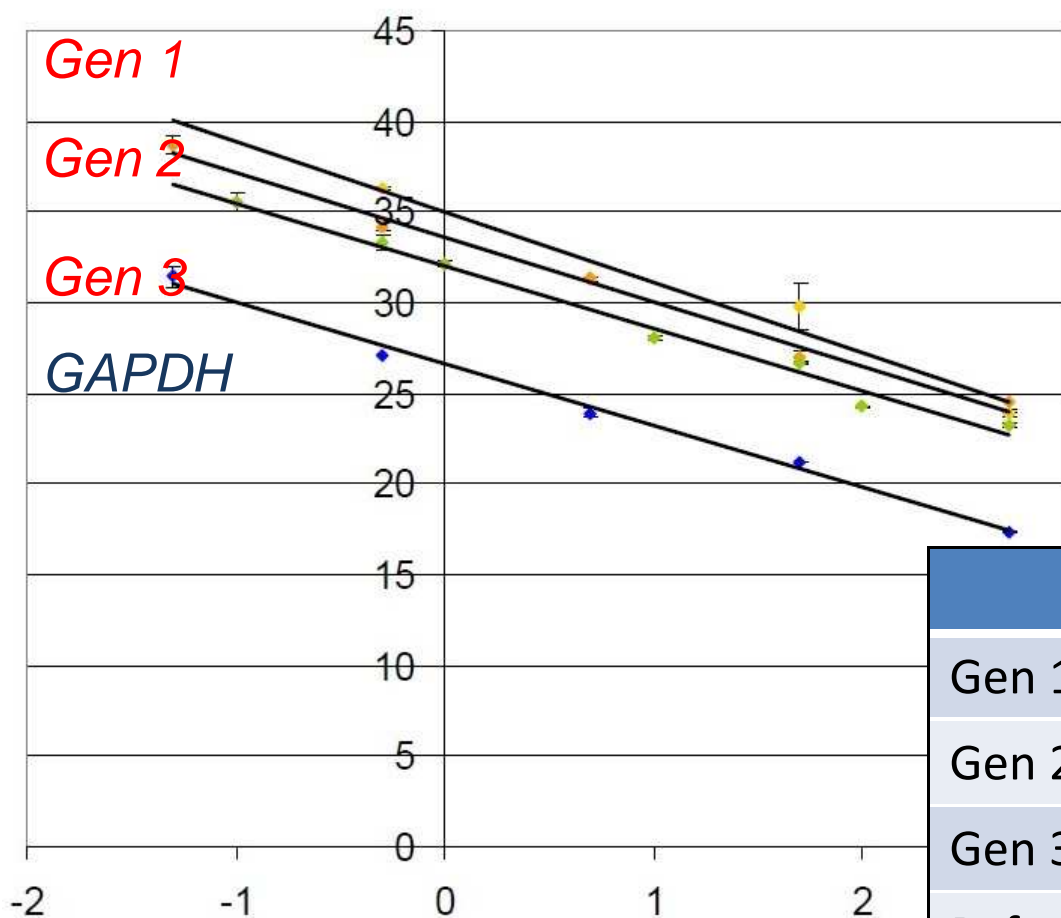
Platné za předpokladu:

E je konstantní během celé PCR

E standardů a vzorků je shodná

Kvantifikační strategie

Výpočet účinnosti PCR – externí standardy



$R^2 \geq 0,98$

Slope	Amplification	Efficiency
-3.60	1.8957	0.8957
-3.55	1.9129	0.9129
-3.50	1.9307	0.9307
-3.45	1.9492	0.9492
-3.40	1.9684	0.9684
-3.35	1.9884	0.9884
-3.30	2.0092	1.0092
-3.25	2.0309	1.0309
-3.20	2.0535	1.0535
-3.15	2.0771	1.0771
-3.10	2.1017	1.1017

	k	E	%
Gen 1	-3,3848	1,9744	97,44
Gen 2	-3,8847	1,8089	80,89
Gen 3	-3,560	1,9094	90,94
Reference gene (GAPDH)	-3,4594	1,9475	94,75
Ideálně	-3,32	2	100

Výpočet účinnosti PCR – externí standardy

1. $E = 10^{-1/k}$

- obvykle od $E = 1,60 - 2,10$ při $R^2 > 0,989$
- pg – desítky ng cDNA
- vztah mezi Ct a log množství cDNA – lineární – min. 5 řádů
- nadhodnocování reálné účinnosti PCR

2. Výpočet z nárůstu fluorescence v lineární fázi

- $E = 1,35 - 1,65$
- podhodnocování reálné účinnosti (datové body z oblasti blízké plateau)

3. Výpočet na základě všech datových bodů (Sigmoidal curve fitting method, SCF)

- Není nutné odečítání hodnot pozadí
- $E = 1,35 - 1,65$

4. Výpočet na základě nárůstu fluorescence v exponenciální fázi

- $Y_n = Y_0(E)^n$

Účinnost PCR

Otázka:

Provádíte PCR alikvotu templátové DNA obsahujícího 3×10^5 kopií. V předchozích experimentech jste určili efektivitu reakce 85%. Kolik cyklů musíte provést, abyste dosáhli výsledného počtu kopií 2×10^{10} ?

Odpověď:

$$Y = N(1+E)^n$$

$$Y = 2 \times 10^{10}$$

$$N = 3 \times 10^5$$

$$E = 0,85$$

$$n = ?$$

$$2 \times 10^{10} = 3 \times 10^5 (1+0,85)^n$$

$$\log \frac{2 \times 10^{10}}{3 \times 10^5} = n \times \log (1+0,85)$$

$$\log \frac{2 \times 10^{10}}{3 \times 10^5} = n \times \log (1+0,85)$$

$$n = \frac{\log 0,67 \times 10^4}{\log 1,85}$$

$$n = 17,8$$

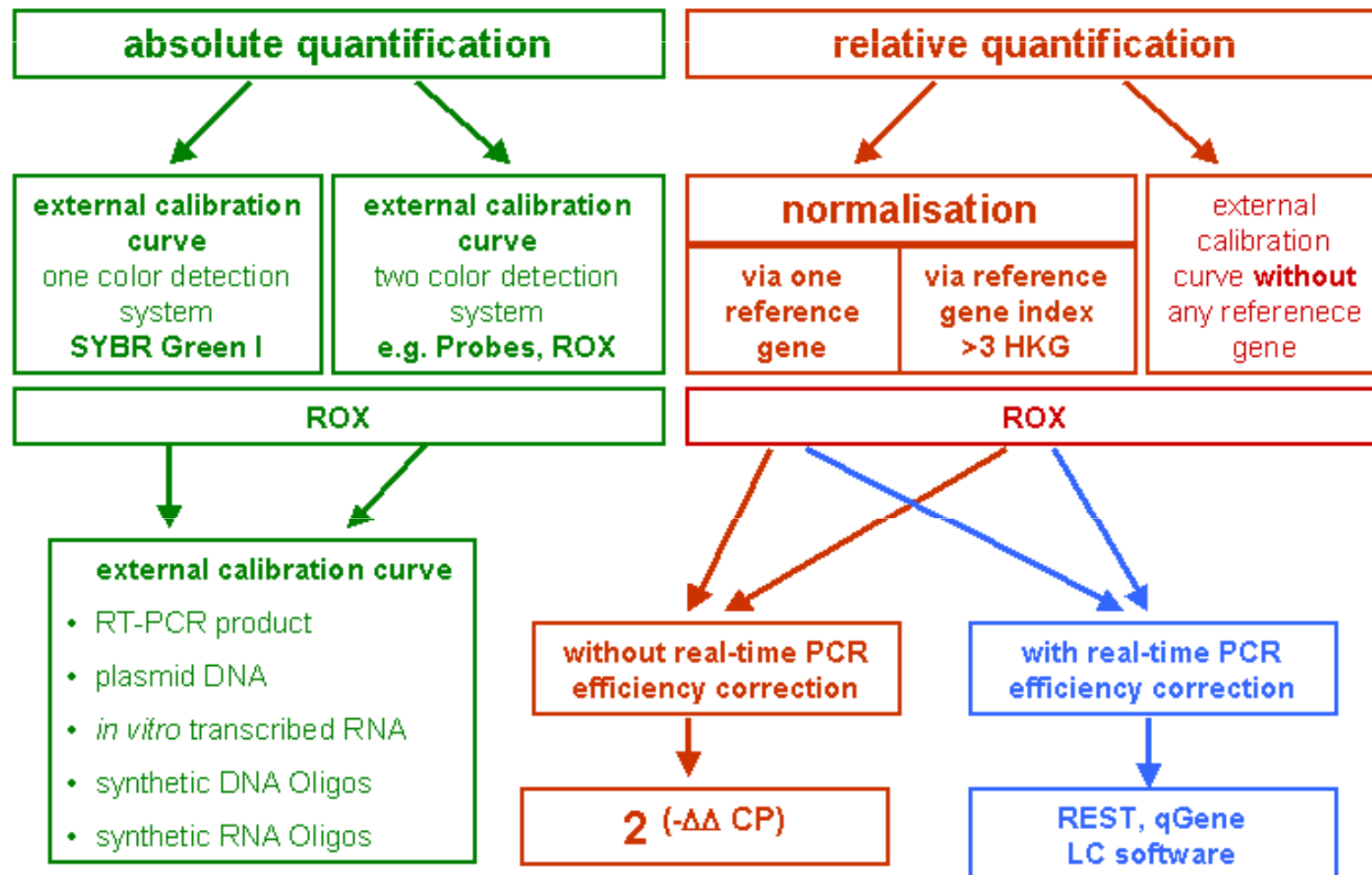
K amplifikaci z 3×10^5 na 2×10^{10} s účinností 85% je nutných 18 cyklů.

Absolutní kvantifikace

Relativní kvantifikace

Quantification Strategies in real time qRT-PCR

M.W. Pfaffl, *BioSpektrum* 2004 (Sonderausgabe PCR)

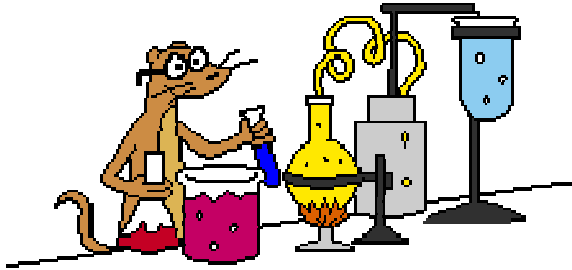


1. Absolutní kvantifikace

- srovnání Ct jednotlivých vzorků s externím standardem (kalibrační křivkou)
- Exaktní výsledek – zvolená jednotka (např. počet kopií/ng RNA/ml krve/ genom/buňku/hmotnost tkáně... atd.)
- Vysoká reprodukovatelnost, specifita a přesnost kalibračních křivek
- Velký dynamický rozsah – 10^1 - 10^{10} molekul templátu
- Validace
- Volba externího standardu (recDNA, gDNA, RT-PCR produkt, recRNA, syntetické oligonukleotidy...)
- Reprodukovatelnost výsledků

Kvantifikační strategie

Externí standardy



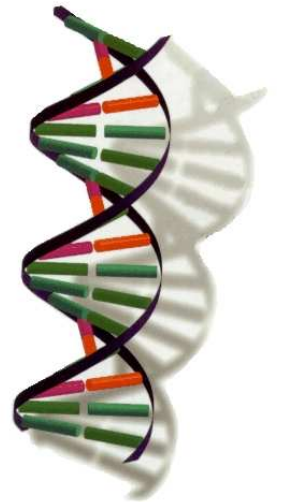
Výsledek absolutní kvantifikace závisí na

1. Volbě standardu

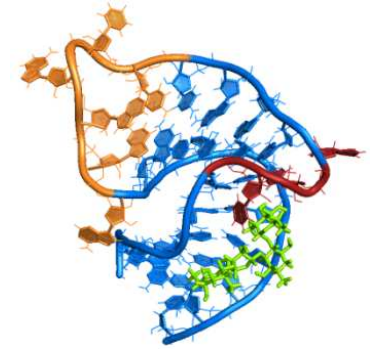
2. Good laboratory practice

DNA

- Plazmidová DNA, genomová DNA, cDNA, syntetické oligonukleotidy
- Velmi stabilní, odolné vůči náhodnému štěpení
- Úseky DNA cca 2kb mají podobné vlastnosti jako mRNA/cDNA
- Reprodukovatelné výsledky
- Snadné stanovení koncentrace
- Kalibrační křivky založené na DNA nereflektují RT krok
- Externí standardy nezohledňují přítomnost PCR inhibitorů



Externí standardy



RNA

- RecRNA (rekombinantní RNA)
 - syntetizována přímo nebo in vitro z plazmidové DNA, obsahující klonovaný RT-PCR fragment
- Reverzní transkripce
 - Odlišná kinetika reakce jako u nativní RNA
 - Neodráží zastoupení jednotlivých RNA frakcí (rRNA 80%, tRNA 10-15% a další)
- Externí standardy nezohledňují přítomnost PCR inhibitorů
- Stabilita a citlivost k nukleázám

- Komerčně dodávaná celková RNA nebo její frakce (polyA, tRNA) jako tzv. background RNA – zvýšení účinnosti RT RecRNA

Externí standardy



Biotechnology Letters 23: 275–282, 2001.
© 2001 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR

Michael W. Pfaffl* & M. Hageleit

Table 1. Characterisation of real-time IGF-1 LightCycler PCR using either recRNA or ss recDNA external calibration curve in comparison with the native liver total RNA. Intra- and inter-assay variation of calibration curve models are mean values ($n = 4$) determined in Table 2.

	IGF-1 recRNA calibration curve	IGF-1 recDNA calibration curve	Unknown IGF-1 mRNA
Start template	IGF-1 recRNA	IGF-1 recDNA	IGF-1 mRNA
Amplification efficiency	1.77	1.93	1.89
Detection limit	16 molecules	6 molecules	80 pg liver total RNA
Quantification limit	1600 molecules	60 molecules	500 pg liver total RNA
Quantification range (test linearity)	1600– 1.6×10^{10} molecules ($r = 0.992$)	60– 6×10^{10} molecules ($r = 0.996$)	500 pg–50 ng liver total RNA ($r = 0.933$)
Intra-assay variation	2.7% ($n = 4$)	0.7% ($n = 4$)	1.2% ($n = 4$)
Inter-assay variation	4.5% ($n = 4$)	2.6% ($n = 4$)	4.9% ($n = 4$)

Kvantifikační strategie

Externí standardy

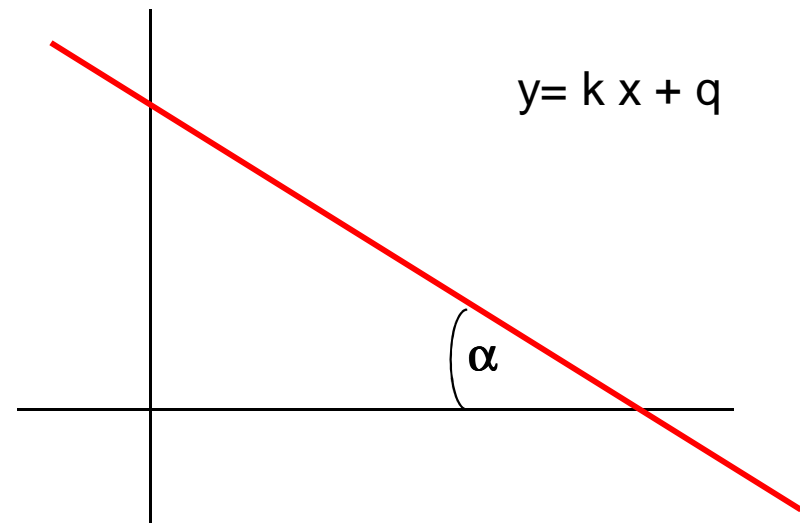
Je nutné vytvářet pokaždé novou kalibrační křivku? Jaká je její reproducibilita?

Předpokládáme stejnou instrumentaci, reagentie i templát (opakujeme stejnou kalibrační křivku)

variabilita

2-3% směrnice (k)

10% posun (q)



- Některé přístroje (např. Roche Lightcycler) umožňují ukládání standardních křivek a jejich kalibraci (korekce q) prostřednictvím jediného datového bodu v každé analýze (za předpokladu konzistentního designu analýzy)

Kvantifikační strategie

Efekt počátečního počtu kopií

Odhady množství templátu nad 1000 kopií jsou relativně přesné (chyba 1%)

Ale - malý vstupní počet templátových molekul – chyba narůstá

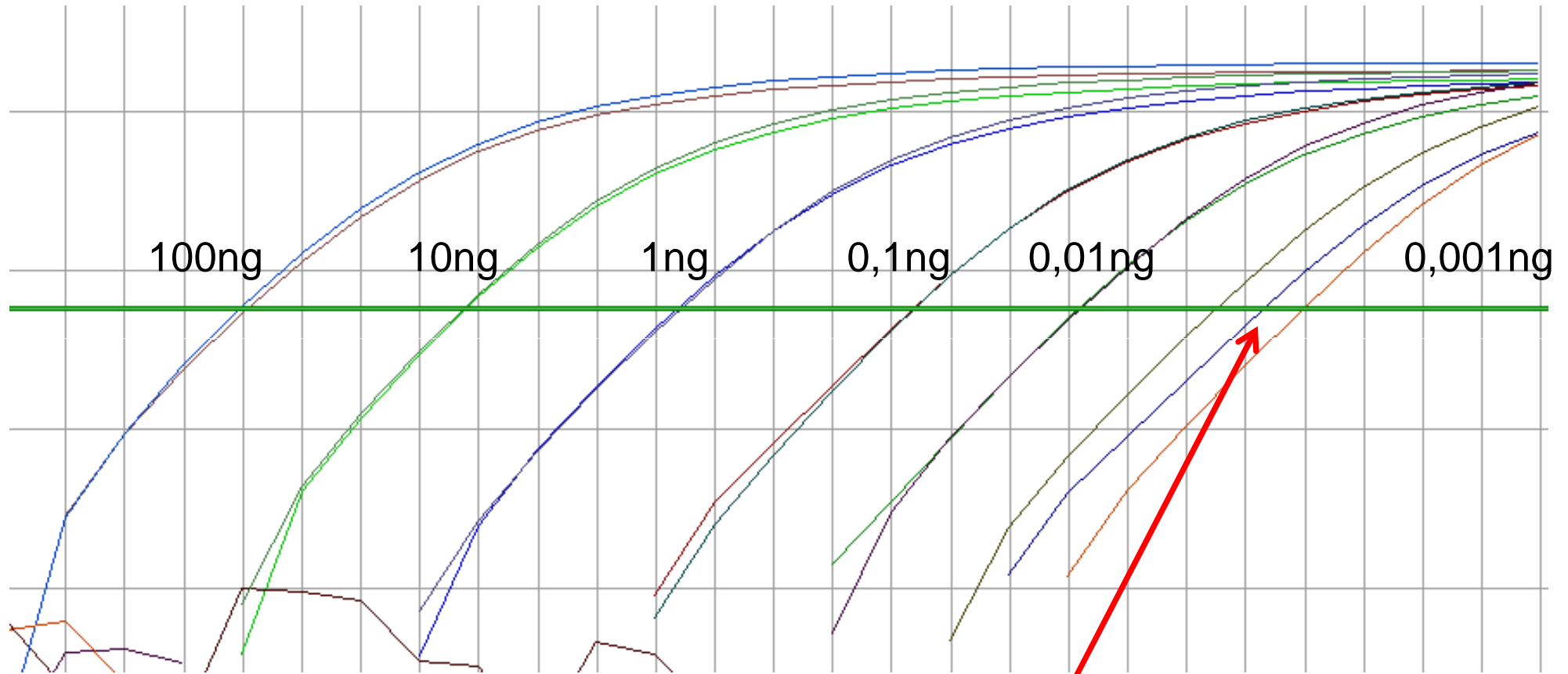
Např. účinnost PCR 80% → v každém cyklu pravděpodobnost 20%, že nedojde ke zdvojnásobení počtu molekul

Monte Carlo effect

závisí na množství templátu – čím je menší množství templátu, tím je i menší pravděpodobnost, že množství ampliconu bude odrážet skutečné množství templátu (nárůst variability)



Monte Carlo effect



Přesto, lze úspěšně kvantifikovat i extrémně malá množství templátu:

Stanovení 10 kopií genomu viru hepatitidy C v plazmě

Intra-assay variabilita (CV) 3,1%

Inter-assay CV 4,4% (4,15% CV pro 100000 kopií)



Journal of Virological Methods 105 (2002) 253–263



www.elsevier.com/locate/jviromet

Sensitivity and reproducibility of HCV quantitation in chimpanzee sera using TaqMan real-time PCR assay

Montserrat Puig^a, Kathleen Mihalik^a, Mei-ying W. Yu^b,
Stephen M. Feinstone^a, Marian E. Major^{a,*}

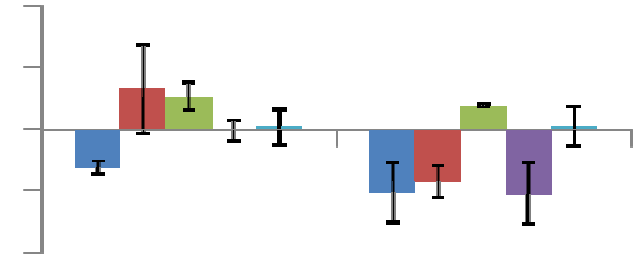
^a Laboratory of Hepatitis Viruses, Division of Viral Products, CBER, FDA, Building 29A, Room 1D02, 8800 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, USA

^b Laboratory of Plasma Derivatives, Division of Hematology, CBER, FDA, 8800 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, USA

Received 13 February 2002; received in revised form 20 May 2002; accepted 21 May 2002

2. Relativní kvantifikace

- Nevyžaduje externí standardy
 - Srovnání Ct jednotlivých vzorků (genů) (např. u pacienta po léčbě) s expresí referenčního genu (housekeeping gene) a vůči biologické kontrole
 - (např. pacient před léčbou, zdravý člověk...)
 - Kontrola = tzv. kalibrátor
 - Určení poměru exprese
-
- $\Delta\Delta Ct$
 - Korekce účinnosti PCR
 - Hodnocení skupin vzorků – software REST/REST XL



Kvantifikační strategie

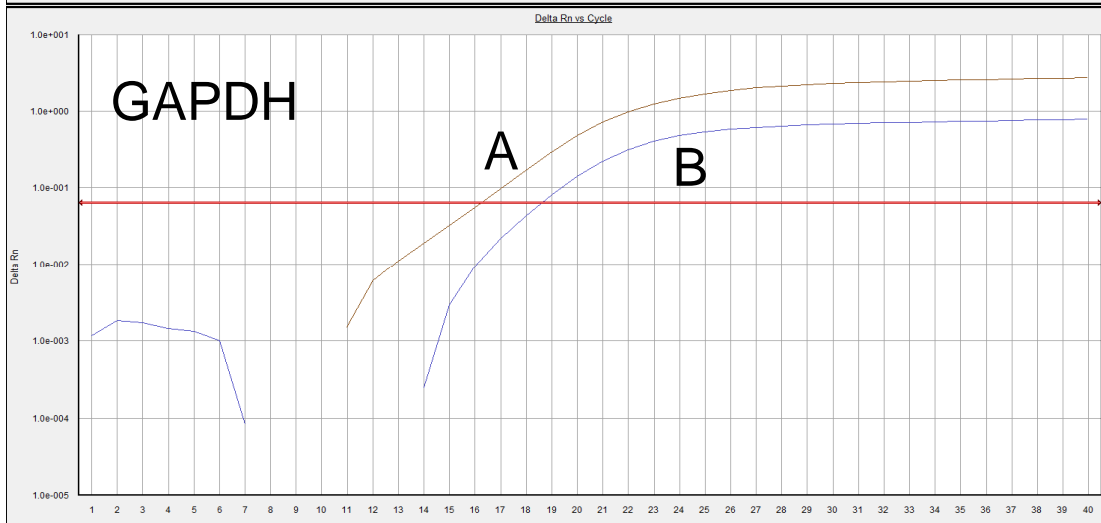
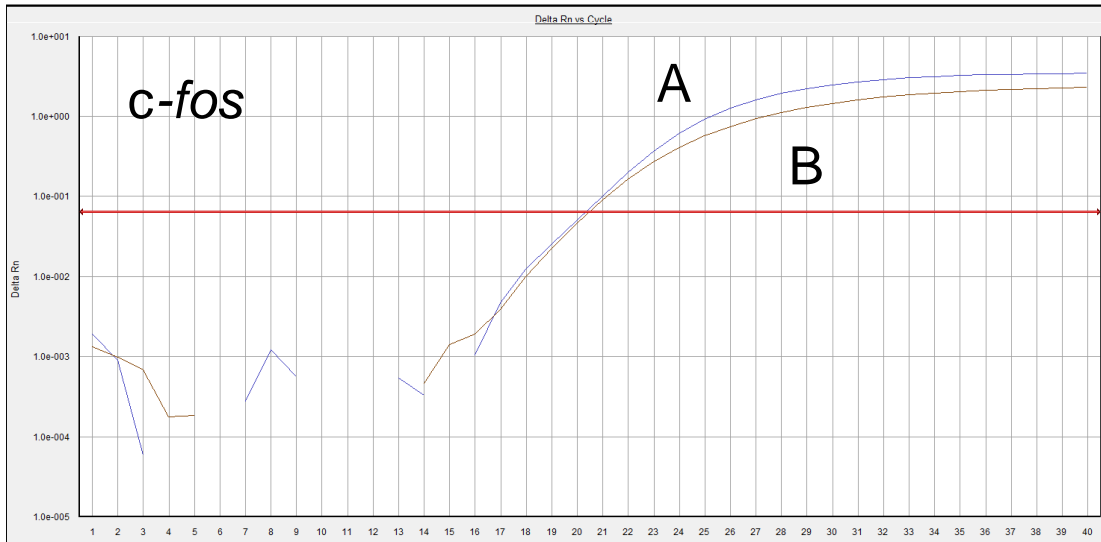
2. Relativní kvantifikace $\Delta\Delta Ct$

Bez zahrnutí efektivity jednotlivých reakcí

Předpokládáme 100%

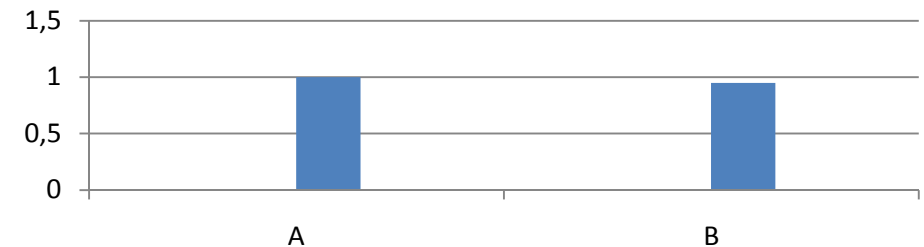
$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

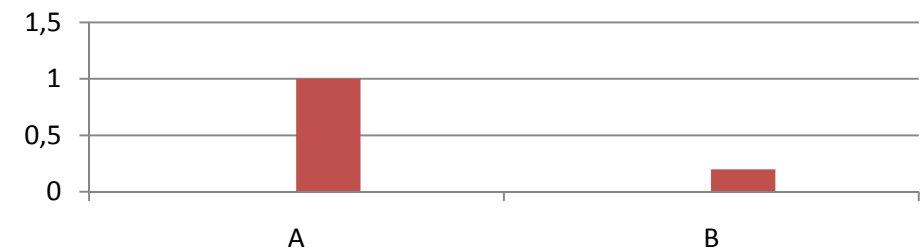


vzorek	c-fos	GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	R
A	22,00	18,18	3,82	0	1
B	22,34	15,76	6,58	2,76	1,15

Nenormalizovaná exprese c-fos



Normalizovaná exprese c-fos vůči GAPDH



Kvantifikační strategie

Korekce relativní kvantifikace zahrnující účinnost PCR

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta\text{Ct cílový gen (kontrola-vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (kontrola-vzorek)}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta\text{Ct cílový gen (PRŮMĚR kontrola - PRŮMĚR vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (PRŮMĚR kontrola - PRŮMĚR vzorek)}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{referenční gen}})^{\text{Ct vzorek}}}{(E_{\text{cílový gen}})^{\text{Ct vzorek}}} \div \frac{(E_{\text{referenční gen}})^{\text{Ct kalibrátor}}}{(E_{\text{cílový gen}})^{\text{Ct kalibrátor}}}$$

Kvantifikační strategie

Účinnost PCR

I malý rozdíl v účinnosti PCR mezi stanovovaným genem a referenční kontrolou může dramaticky změnit výsledný poměr

Např. rozdíl v účinnosti (ΔE) = 3%

$E_{\text{cílový gen}} > E_{\text{referenční gen}}$ po 25 cyklech poměr 47%

$E_{\text{referenční gen}} > E_{\text{cílový gen}}$ po 25 cyklech poměr 209%

= 5%

$E_{\text{cílový gen}} > E_{\text{referenční gen}}$ po 25 cyklech poměr 28%

$E_{\text{referenční gen}} > E_{\text{cílový gen}}$ po 25 cyklech poměr 338%

= 10%

$E_{\text{cílový gen}} > E_{\text{referenční gen}}$ po 25 cyklech poměr 7,2%

$E_{\text{referenční gen}} > E_{\text{cílový gen}}$ po 25 cyklech poměr 1083%

Experiment: Srovnání exprese klinicky významného genu (YFG) u pacientů a zdravých dobrovolníků. Normalizace vůči GAPDH.

Pacienti: Ct (YFG) 32; Ct (GAPDH) 26

Kontrola: Ct (YFG) 35; Ct (GAPDH) 27

Jak se liší exprese YFG u pacientů a zdravých dobrovolníků?

Pacienti: $dCt = 32 - 26 = 6$

Kontrola: $dCt = 35 - 27 = 8$

$ddCt: 6 - 8 = -2$

Poměr exprese: $2^{-ddCt} = 4$

Experiment: Srovnání exprese klinicky významného genu (YFG) u pacientů a zdravých dobrovolníků. Normalizace vůči GAPDH.

Pacienti: Ct (YFG) 32; Ct (GAPDH) 26

Kontrola: Ct (YFG) 35; Ct (GAPDH) 27

Efektivita PCR (YFG) 80%; (GAPDH) 90%

Jak se liší exprese YFG u pacientů a zdravých dobrovolníků?

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta\text{Ct cílový gen(kontrola-vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (kontrola-vzorek)}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{1,8^3}{1,9^1} = \frac{5,832}{1,9} = 3,07$$

Experiment: Srovnání exprese klinicky významného genu (YFG) u pacientů a zdravých dobrovolníků. Normalizace vůči GAPDH.

Pacienti: Ct (YFG) 32; Ct (GAPDH) 26

Kontrola: Ct (YFG) 35; Ct (GAPDH) 27

Efektivita PCR (YFG) 60%; (GAPDH) 105%

Jak se liší exprese YFG u pacientů a zdravých dobrovolníků?

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta\text{Ct cílový gen(kontrola-vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (kontrola-vzorek)}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{1,6^3}{2,05^1} = \frac{4,096}{2,05} = 1,998 \quad !$$

Kvantifikační strategie

Normalizace v relativní kvantifikaci

Sample-to-sample variation

Run-to-run variation

Korekce variability mezi jednotlivými vzorky, způsobené

- Charakterem vzorků
- Integritou RNA
- Efektivitou RT
- Pipetovací chybou

Normalizace vůči

- Neregulovanému endogennímu referenčnímu genu
- Celkové buněčné RNA/DNA

Kvantifikační strategie

Referenční geny

GAPDH

Albumin

Aktin (γ)

Histon H3

Tubulin (γ)

Cyklofilin

Mikroglobuliny

Ubiquitin

18SrRNA

28SrRNA

GAPDH je regulovaná za nejrůznějších experimentálních i fyziologických podmínek			
Experimentální podmínky	Tkáň	Extracelulární faktory	Onemocnění
Věk Apoptóza Buněčný cyklus Vývojové stádium Hladovění Hypoxie Oxidativní stres Těhotenství Sérum	Leukocyty Erytrocyty Střevní biopsie Endothelie T-lymfocyty Thyrocyty	UV IL2 NO TPA Dexamethason Cholinergní agonisté Kreatin Inzulín Retinová kyselina Růstový hormon Vitamin D Mn ^{II+}	Karcinom - prsu - cervixu - kolorekta - plic - jater - prostaty - slinivky Neurodegenerativní onemocnění

Pseudogeny – specifická amplifikace nezávislá na mRNA

Referenční geny

Programy geNorm a BestKeeper (freeware)

Určení expresních profilů více housekeepingových genů,
zhodnocení jejich variability (pairwise correlation),
geometrický průměr více opakování

Vyhodnocení nejstabilnějšího housekeepingového genu za definovaných podmínek.

Jak na to?

$$\text{BestKeeper Index} = \sqrt[n]{CP_1 \times CP_2 \times CP_3 \times \dots \times CP_z}$$

Tkáňové kultury

- normalizace vůči počtu buněk, referenčnímu genu, RNA...
- replikáty

Mononukleární krevní buňky

- heterogenní populace
- FACS – normalizace vůči počtu buněk definovaného typu
- kvantifikace vůči expresi genu pro příslušný CD (CD-19 B-lymf.)
- totální RNA

Kvantifikační strategie

Jak na to?

Biopsie solidních tkání

- Nádorová tkáň
- Heterogenita
- Otázkou je, zda-li je vůbec objektivně možné relativně kvantifikovat klasické biopsie (problémy s referenčním genem a jeho expresí v daném místě, počtem buněk...)

Laser Capture Microdissection

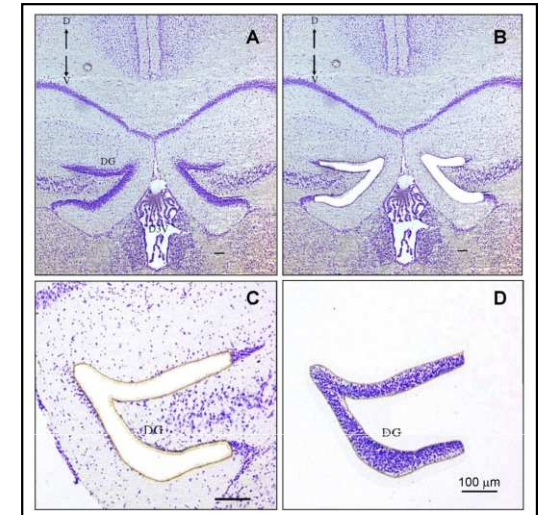
- Normalizace exprese vůči referenčnímu genu
- Výhodou je histologická informace a znalost počtu buněk

Celková RNA

- Nutné přesné určení koncentrace RNA
- Nereflektuje RT a PCR krok

rRNA

- Jiný charakter exprese, jiné polymerázy, atd.
- Její hladina je ale ovlivněna méně než v případě mRNA (s výjimkou krevních buněk)
- Otázka volby subpopulace (28S, 18SrRNA)



Design experimentu

Jak navrhnout správný experiment?

- Definovat jej před vlastním začátkem experimentu
- Brát v úvahu hypotézu
- Být maximálně jednoduchý (co nejméně komplexní)
- Maximálně kontrolovatelný
- Technicky a ekonomicky proveditelný, statisticky vyhodnotitelný

Variabilita dat

Nežádoucí

Technická: zpracování vzorku (sampling, izolace, RT-PCR)

Řešení: replikáty, normalizace k internímu standardu

Biologická: rozdíly mezi vzorky (bazální exprese, odpověď na treatment)

Řešení: opakovaná měření, normalizace ke kontrolní skupině

Hledaná

Rozdíly mezi testovanými skupinami

Náhodný sampling, velký soubor

Kvantifikační strategie

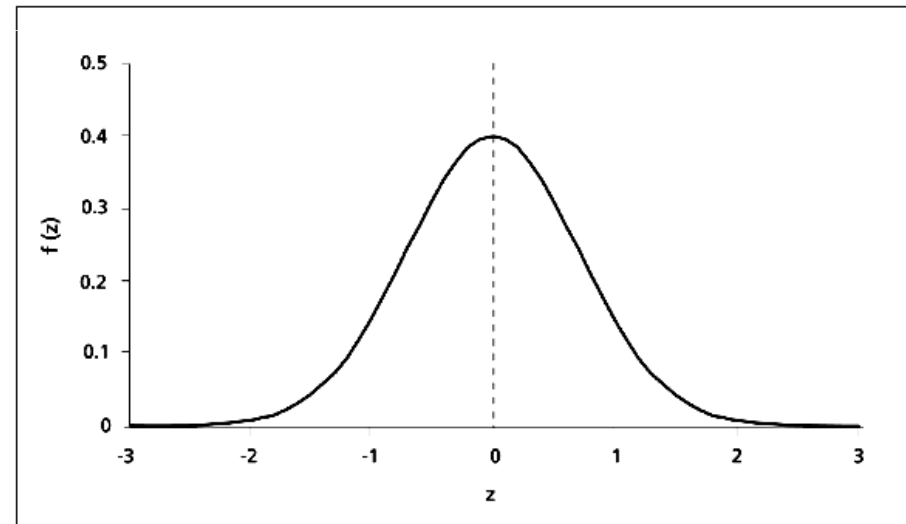
Statistické vyhodnocení

Nulová hypotéza (není rozdíl), kterou se test buď potvrdí nebo vyvrátí

Základní statistické parametry – průměr \pm SD nebo medián \pm x-percentil

Parametrické testy

- Normální rozložení
- Stejný rozptyl
- **Dva vzorky** t-test (one/two tailed)
- **Různé nezávislé proměnné** - ANOVA (i tehdy, není-li rozložení úplně Gaussovské)



Genová exprese (expresní poměry) mívá obvykle Normální rozložení, pokud je vyjádřena v \log_2 měřítku.

Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení

Neparametrické testy

- Neznáme parametry rozložení

- Testování rozdílů mezi nezávislými skupinami (Independent samples)

dva vzorky, u kterých porovnáваме průměry některé z proměnných

- Mann-Whitey U test; Kolmogorov-Smirnov test

více skupin

- Kruskal-Wallis test; Mediánový test

- Testování rozdílů mezi závislými skupinami

- Porovnávání proměnných, zjišťovaných na jednom vzorku

- Wilcoxonův test (parametrická alternativa – t-test/ANOVA)

- Hodnoty typu „mRNA přítomná/nepřítomná“ (dichotomické hodnoty) – McNemarův χ^2 test

- Testování vztahů mezi proměnnými

- Regrese a korelace (Spearmanův/Pearsonův korelační koeficient) R^2

- Standardní křivky

Statistické vyhodnocení

Kdy použít který test

Parametrické vs. neparametrické testy

RT-PCR

Obvykle malý počet hodnot, s velkým rozptylem, většinou nesledujících normální rozložení

-> **neparametrické testy**

V případě většího počtu hodnot (>100), lze použít parametrické testy

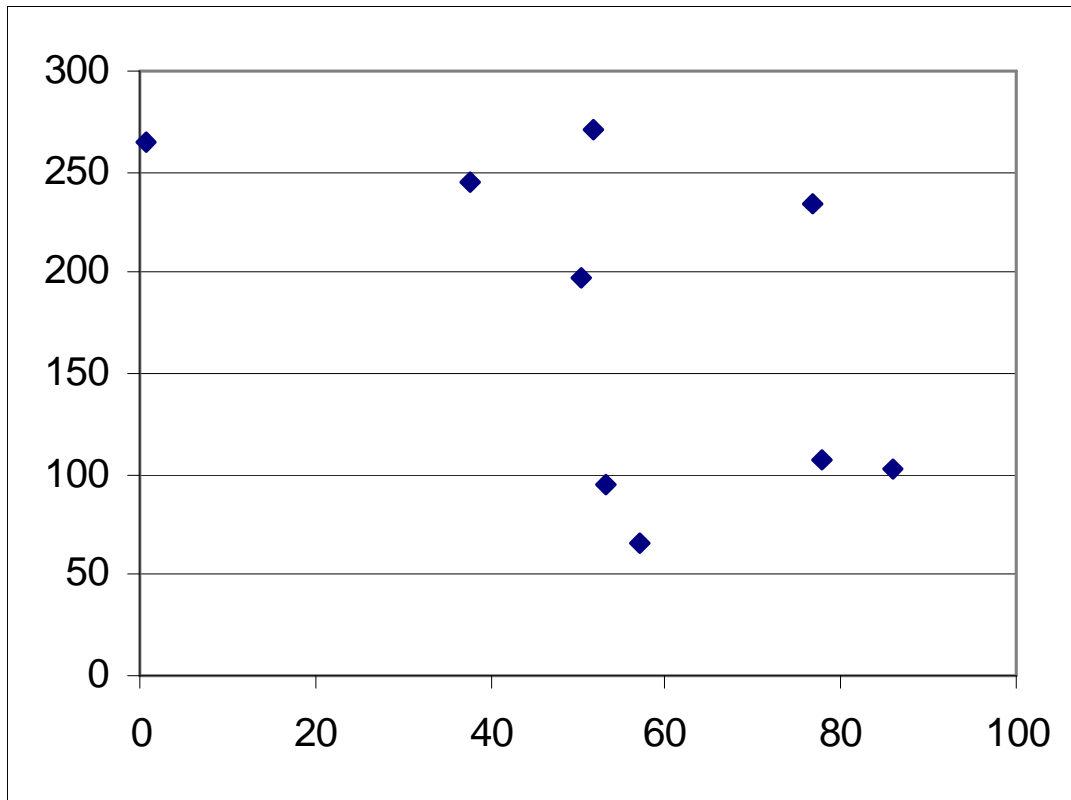
Neparametrické testy jsou méně náchylné k α -chybám (nesprávné zamítnutí nulové hypotézy), ale jsou méně citlivé než parametrické (např. srovnání p u para < p u neparametrických testů), jako signifikantní najdou větší rozdíl než parametrické testy.

Kvantifikační strategie

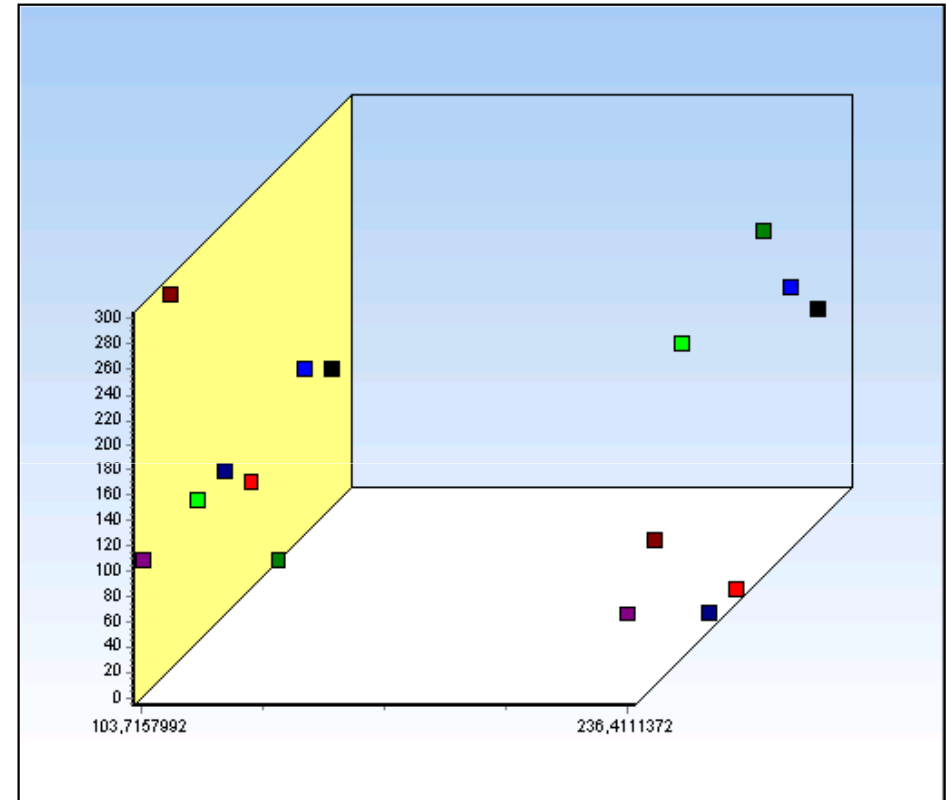
Statistické vyhodnocení

Analýza více genů/vzorků (clustering)

Dvourozměrný graf



Třírozměrný graf



Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení

Analýza více genů/vzorků (hledání trendů, clustering)

N různých genů – n různých proměnných – n rozměrný graf ?

Př. 10000 genů... (microarray)

Principal component analysis (PCA)

Redukce počtu rozměrů (dimenzionality) na základě výpočtu kovariance mezi jednotlivými vzorky.

Původní osy jdou nahrazeny tzv. komponentami

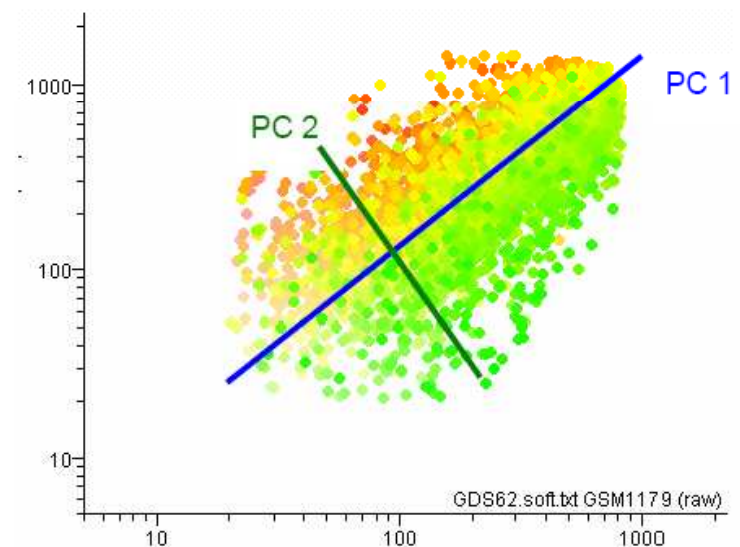
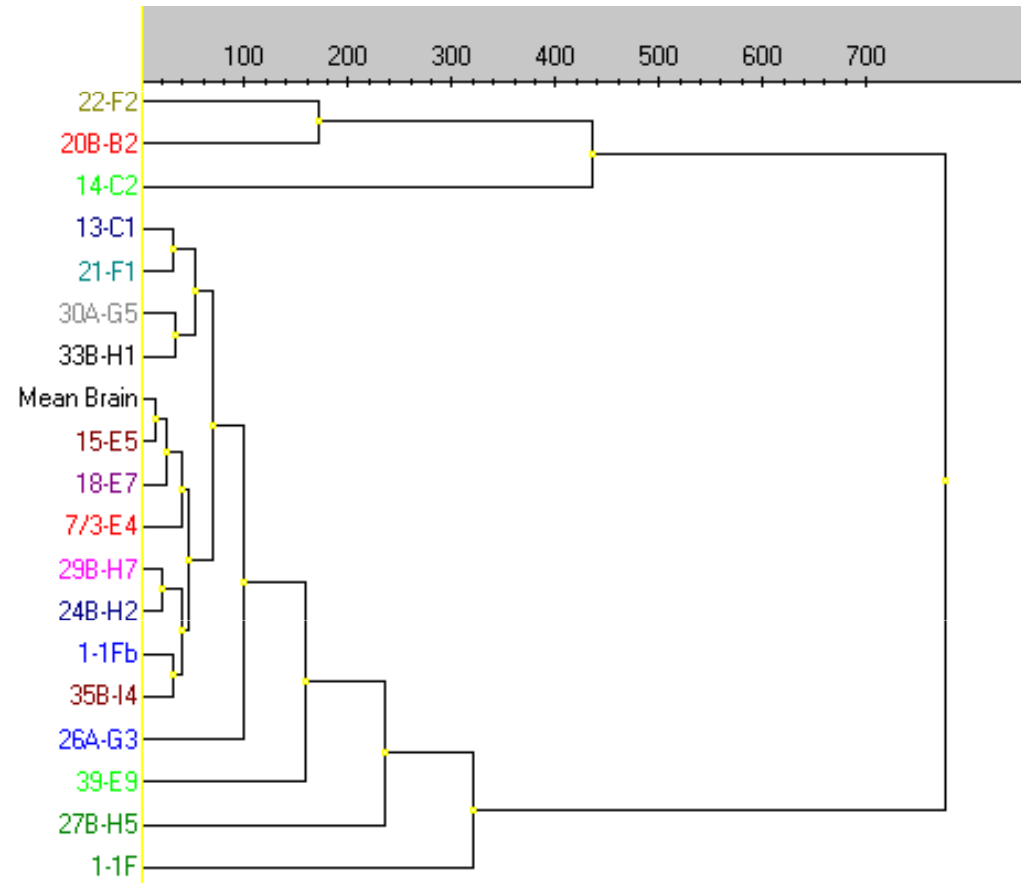
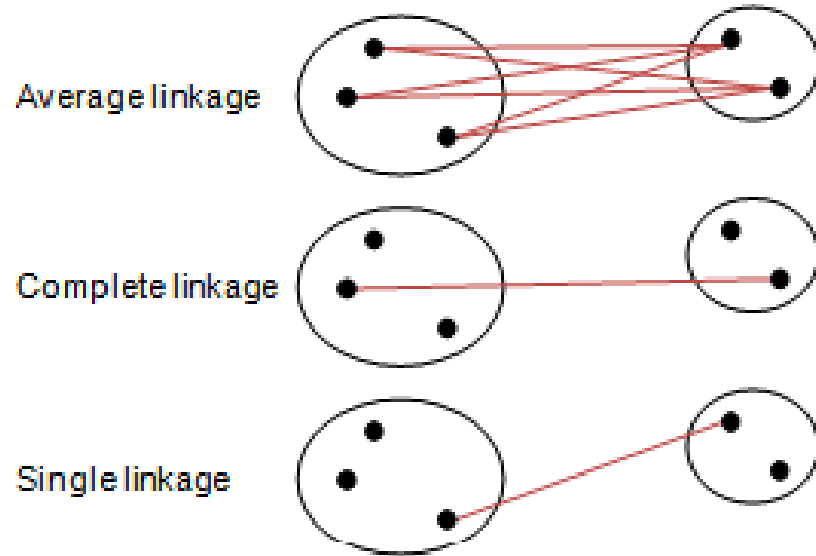


Fig 1: Football-shaped data set with two main components.

Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení – shluková (clusterová) analýza

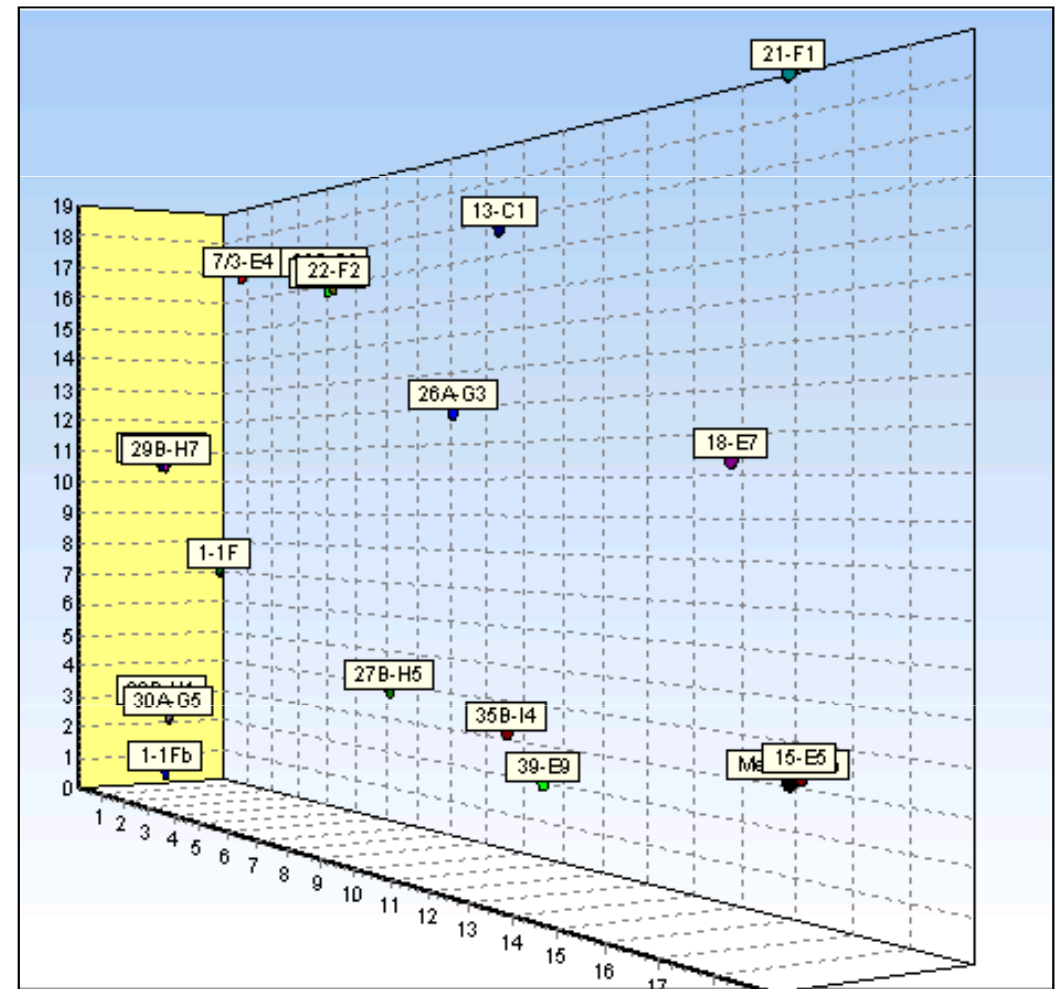
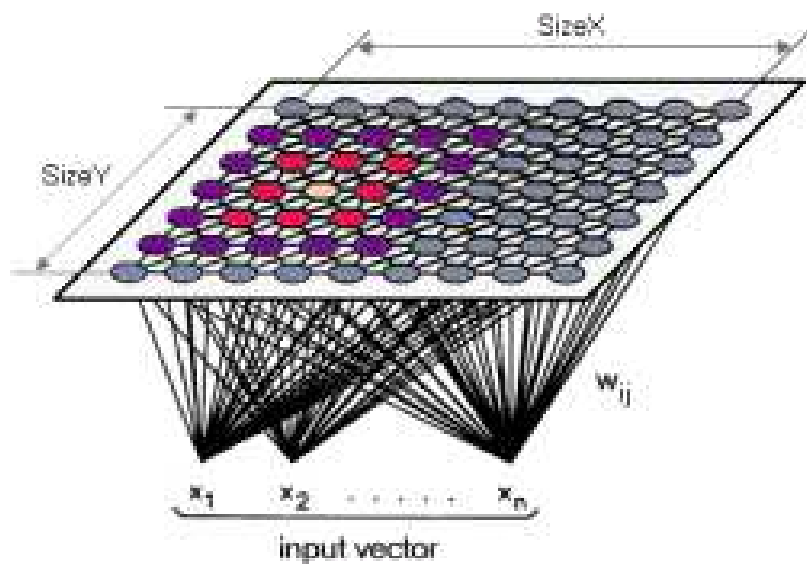
Dendrogramy



Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení – shluková (clusterová) analýza

Self organizing maps (ANN, Kohonen)



Shrnutí - práce s daty

Kontrola dat (outliers)

Úprava efektivity PCR

Kompenzace variability mezi jednotlivými PCR (inter-plate calibration)

Normalizace na stejné množství vzorku (RNA/DNA)

Průměrování technických replikátů

Výpočet množství/poměrů

Statistická analýza variability

Shrnutí

Umíte odpovědět na následující otázky?

- design experimentu, např. je vzorek tkáně reprezentativní? Jaké biologické kontrolní vzorky musím použít?
- volba metody, jaký templát bude vstupovat do mých reakcí?
mám použít pouze poly-A RNA nebo celkovou RNA? Má dostatečnou kvalitu? One step nebo two step PCR?
- s jakou účinností běží moje PCR?
- absolutní nebo relativní kvantifikace?
- je zvolený housekeepingový gen vhodný?
- proběhla má real-time PCR správně? Jsou Ct stanoveny správně?
- mám představu o statistickém vyhodnocení mých dat
- jaký má výsledek mého experimentu biologický význam?

