



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

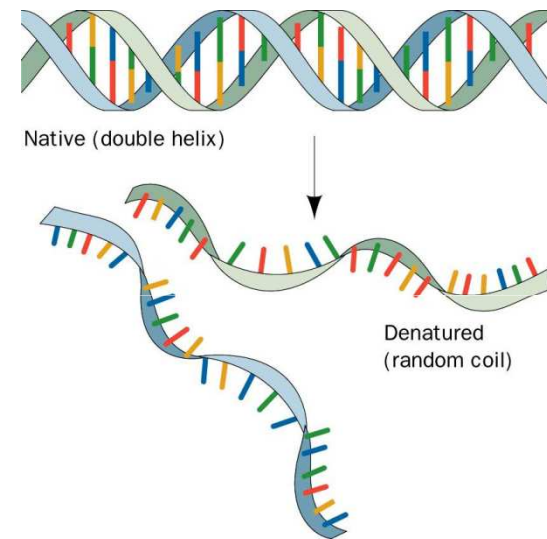


V. Návrh primerů a sond

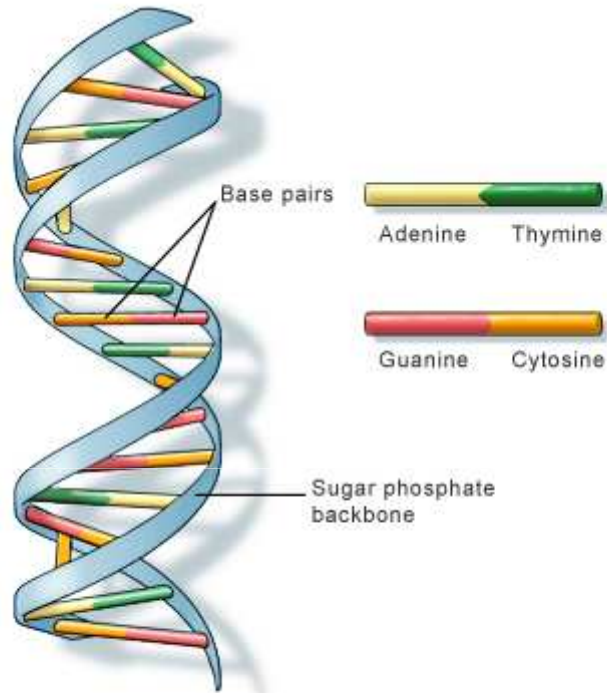
Design primerů a sond

Hybridizace

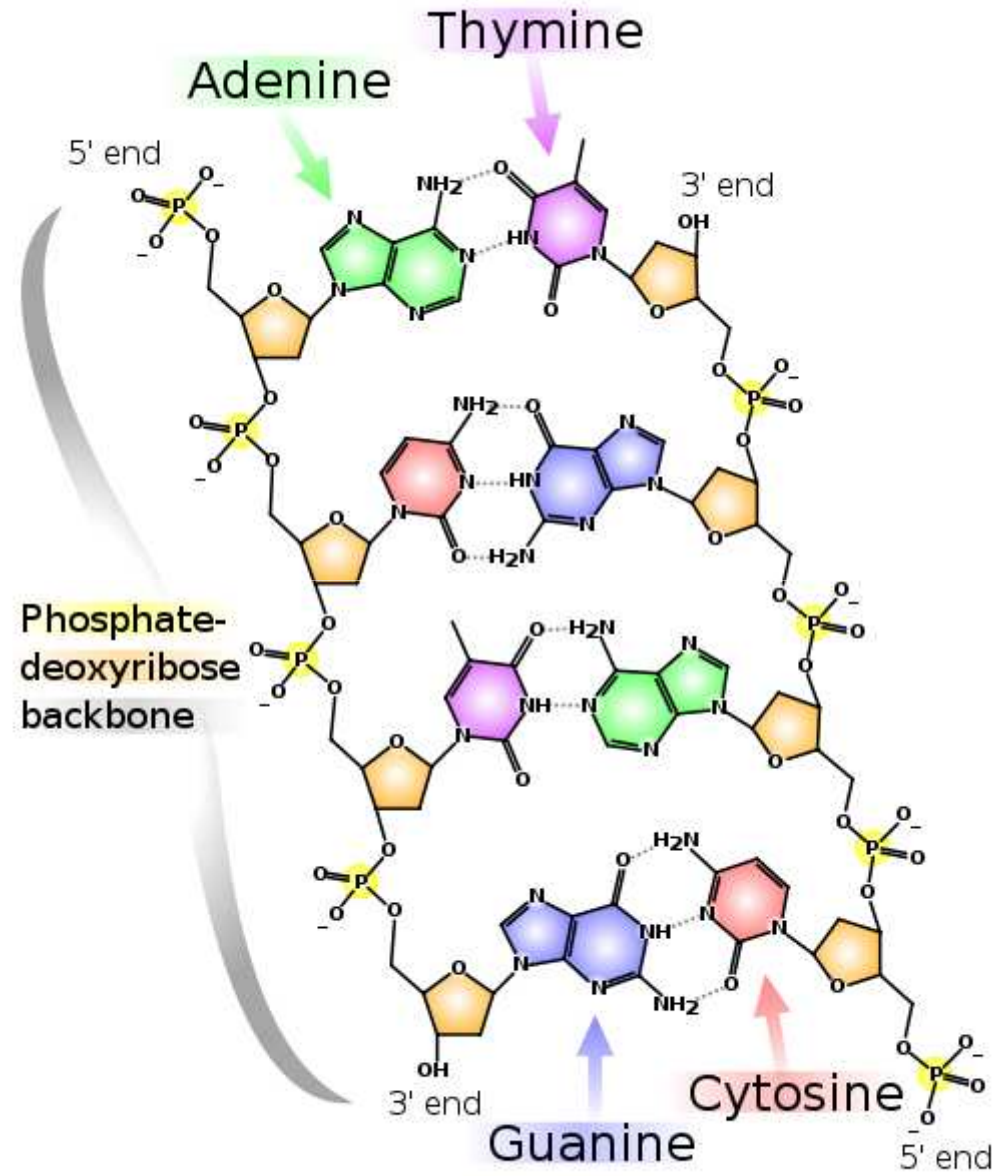
- Úspěšný annealing sondy a primerů je kritický předpoklad úspěšné PCR
 - Sekvence
 - Koncentrace solí
 - Tvorba heterodimerických stabilních struktur
 - Párování bazí - nejen Watson a Crick
 - Sekundární struktura
 - Teplota tání DNA T_m



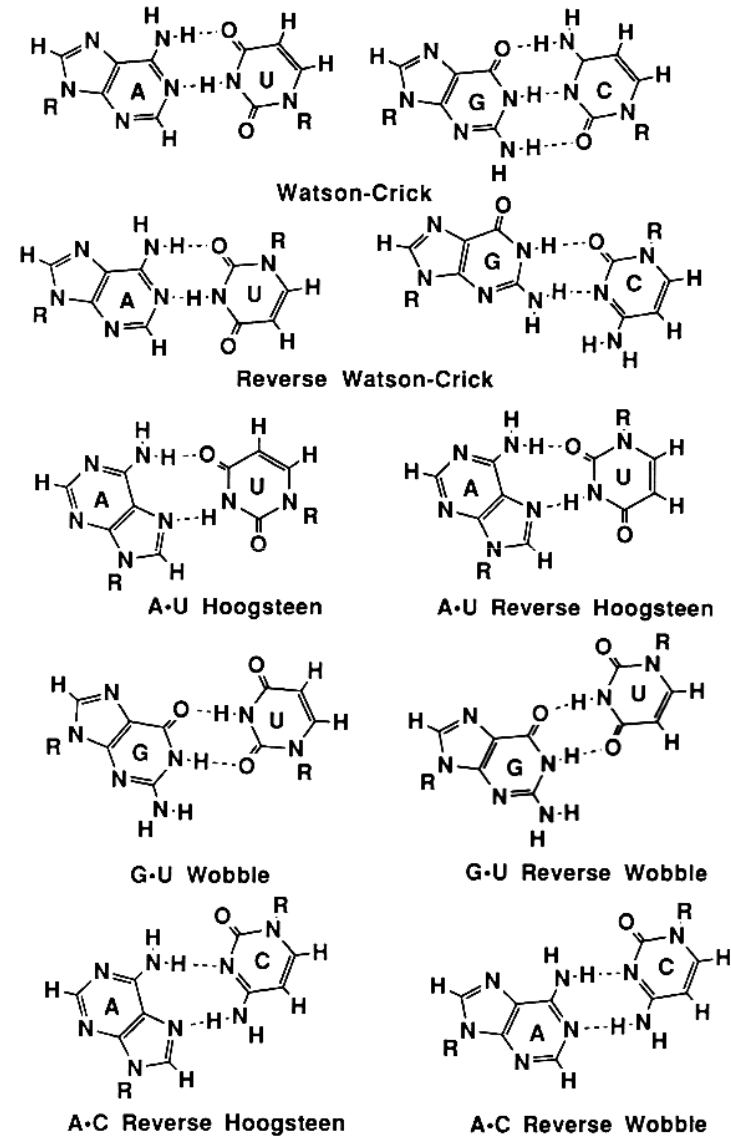
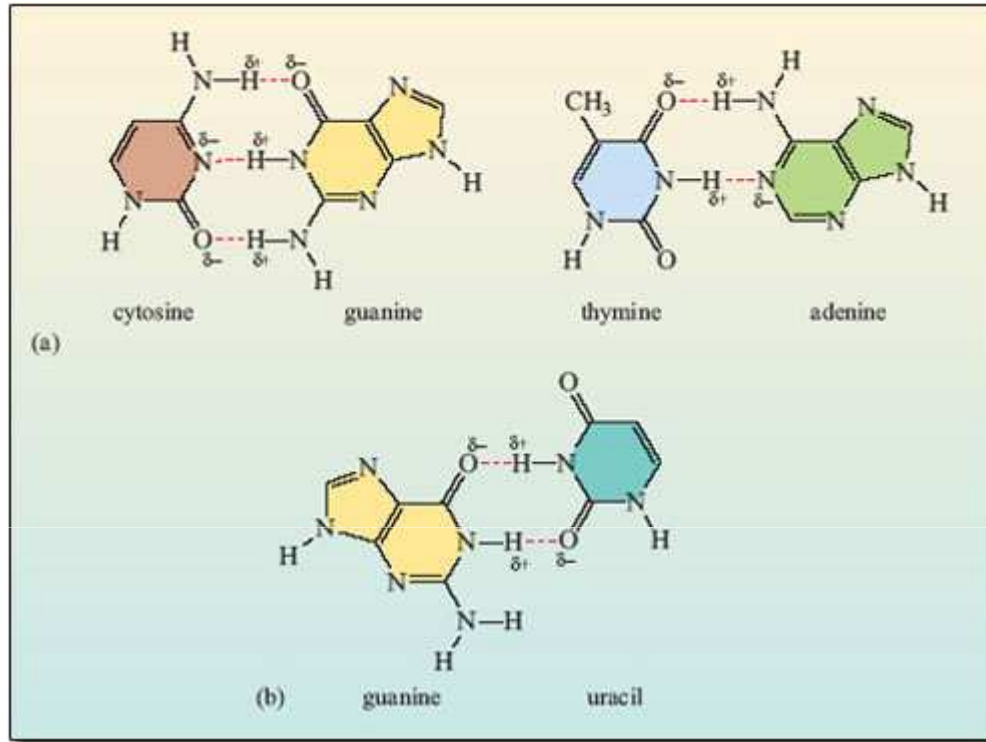
Design primeru a sond



U.S. National Library of Medicine

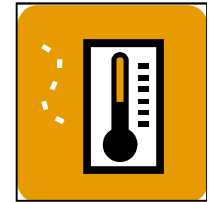


Design primeru a sond



Design primerů a sond

Melting temperature T_m



- jeden z nejdůležitějších parametrů, determinující annealingovou teplotu
- T_m – teplota, při které je 50% daného oligonukleotidu denaturováno
- „cooperativní melting“ – usnadněná denaturace po disociaci prvního páru bazí
- Sekvence: A=T < G≡C

- Rychlost renaturace (a tedy i T_m) přímo úměrná délce řetězce a jeho koncentraci a nepřímo úměrná komplexitě molekuly (struktura)

- Elektrostatické interakce mezi fosfátovými molekulami
- kationty maskují náboje fosfátů - vyšší iontová síla vede k vyšší T_m

Oligonukleotidy kratší než 20bp

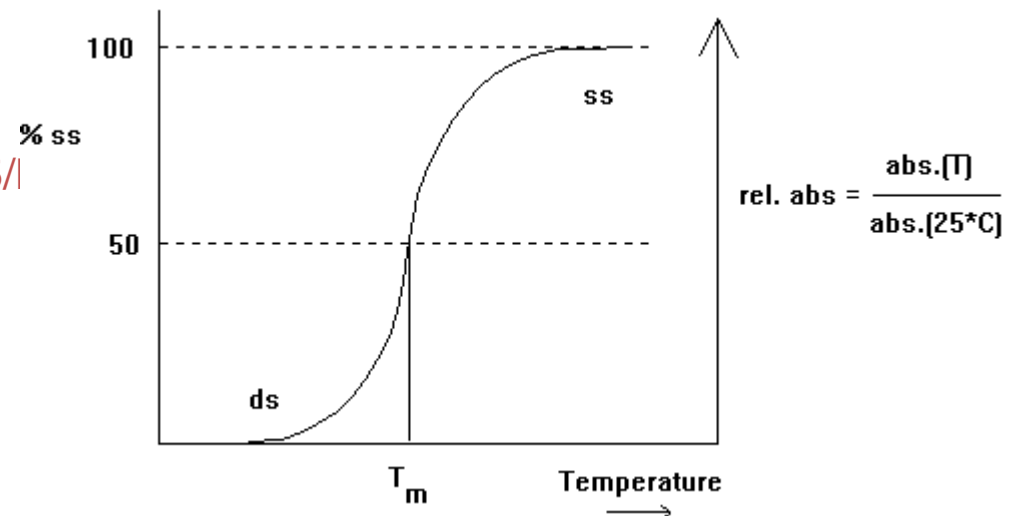
$$T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

Iontová síla, %GC a délka řetězce (N)

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+] + 0,41(\%GC) - (625/N))$$

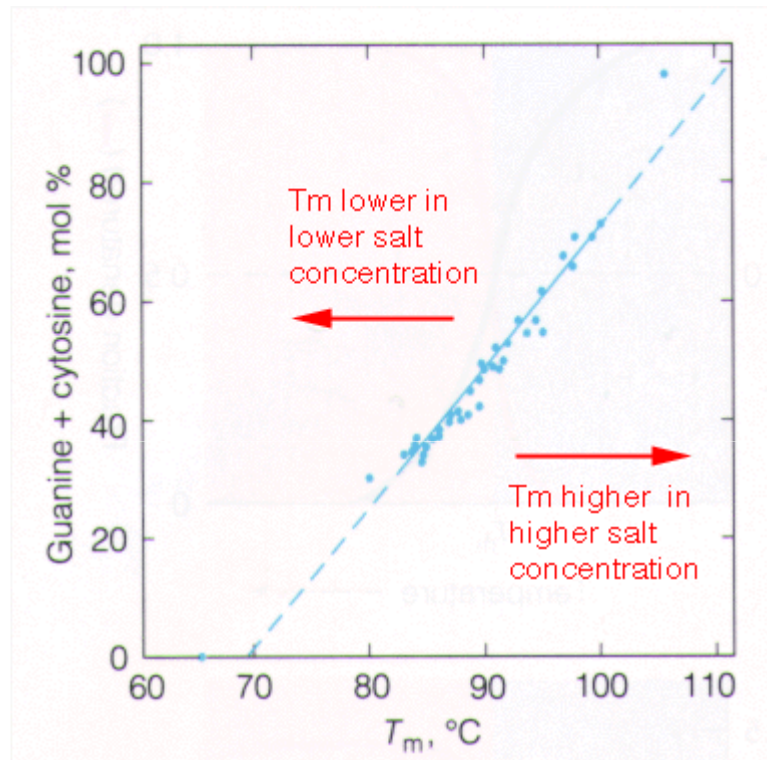
Web-based kalkulátory

<http://insilico.ehu.es/tm.php>



Design primerů a sond

Melting temperature T_m



GCTATTCAACTGAAGAGGGCACAGC

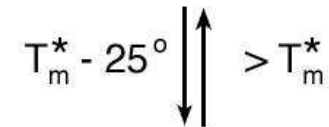
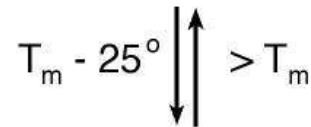
GCTATTCAACTG^GAGAGGGCACAGC

+

+

CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG

CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG



GCTATTCAACTGAAGAGGGCACAGC
CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG

GCTATTCAACTG^GAGAGGGCACAGC
CGATAAGTTGAC_TTCTCCCGTGTCG

note: T_m^* is 4° lower than T_m

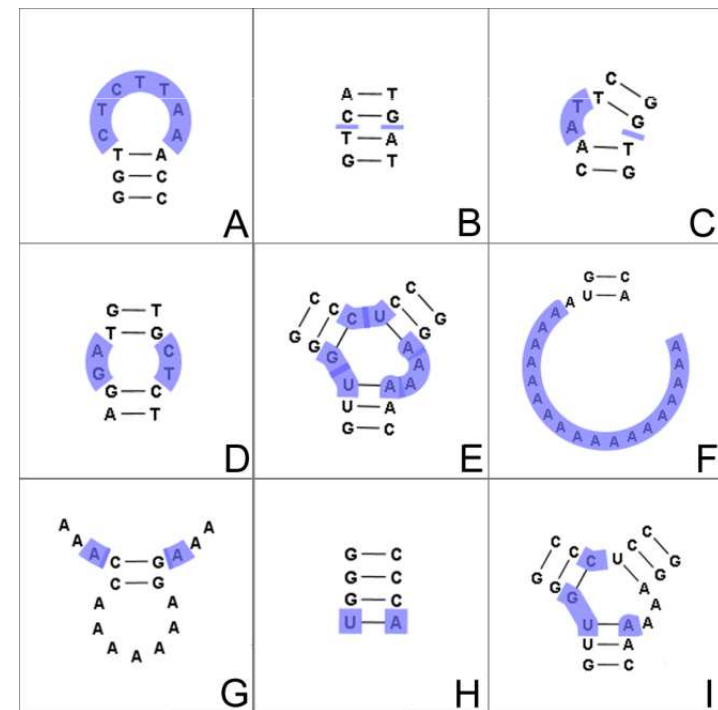
(In general, there is a 1° drop for every 1% mismatch)

Design primerů a sond

Gibbsova (volná) energie a její změna (ΔG , ΔG^0)



- Sekundární struktura DNA
- Na rozdíl od T_m , ΔG závisí na změně vnitřní energie a entropie
- Změna volné energie ΔG^0 (množství energie uvolněné nebo absorbované během reakce za stejné teploty a tlaku) - spontánní reakce - $\Delta G < 0$
- Znalost termodynamického příspěvku párování bazí, mismatches, volných konců, vlásenkových struktur a smyček – predikce parametrů hybridizace
- Predice sekundární struktury - *nearest neighbor*
 - *helix initiation factor* (GC/AT)
 - *helix propagation* energie nutná pro vytvoření následujícího hybridizačního páru
 - symetrie sekvence (duplexu)
 - *Loop regions* – smyčky, vlásenky, výdutě atd.



Design primerů a sond

Faktory ovlivňující stabilitu DNA DNA/RNA duplexu

1. Počet odpovídajících párů bází

- Kombinace vodíkových můstků a hydrofobních interakcí
- Pozice a typ neodpovídajícího páru (*mismatch*)

2. Sekvence – *nearest neighbor*

3. Sekundární struktura

- Charakter cílové sekvence
- Kompetice primeru nebo sondy s komplementárním řetězcem cílového duplexu

4. Volné konce

- Interakce mezi 5' a 3' konci hybridizovaného oligonukleotidu a nejbližší sousedící báze

- Příklad:

$$\Delta G^0 \text{ (GC)} -0,96 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^0 \text{ (AT)} -0,50 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^0 \text{ W-C (TA/AT)} -0,58 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^0 \text{ W-C (GC/CG)} -2,24 \text{ kcal/mol}$$

GTAGACAATCTCCATCTCCTATCCTGATTAGAG

GTTAGAGGTAGAGGATAGGA

Faktory ovlivňující stabilitu DNA DNA/RNA duplexu

5. Iontová síla

- Koncentrace iontů, zejména Mg^{II+}
- Kationty kompenzují negativní náboj fosfátových skupin a usnadňují formování duplexu
- Stabilita duplexu (T_m) je úměrná koncentraci iontů

6. Teplota

- Se stoupající T je udržení duplexu energicky náročnější, po překročení určité T je preferována ssDNA – vyšší entropie celého systému

Není tedy nutná shodná T_m , ale shodná účinnost hybridizace obou primerů.

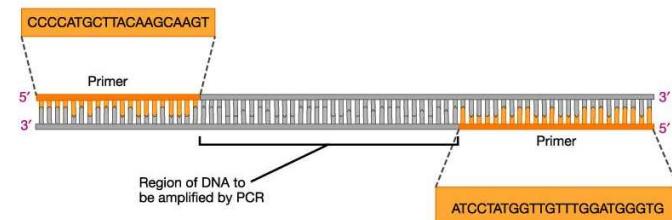
Primery se stejnou T_m , ale rozdílnou ΔG^0 , mohou vykazovat rozdílnou úspěšnost při tvorbě duplexu než primery s odpovídající ΔG^0 .

Design primerů a sond

Design primerů

- Optimálně: primery jejichž 5'konce tvoří stabilní duplex, $\Delta G^0 < 10$ kcal/mol/37°C
- Plynulý přechod ΔG^0 směrem k 3'konci až k cca -6kcal/mol.
- Eliminace misprimingu (vzniklého hybridizací pouze 3'konce)
- Vyloučení repetitivních oblastí, které mohou tvořit sekundární struktury
- Komplementarita primerů – primer dimery
- Specifita – hybridizace k jedinečnému místu v genomu (BLASTn)

Vliv reakčního prostředí – i ideálně navržené primery mohou měnit své vlastnosti v závislosti na použitém PCR pufru a dalších parametrech PCR – vždy je nutná optimalizace jednotlivých PCR



Design primerů a sond

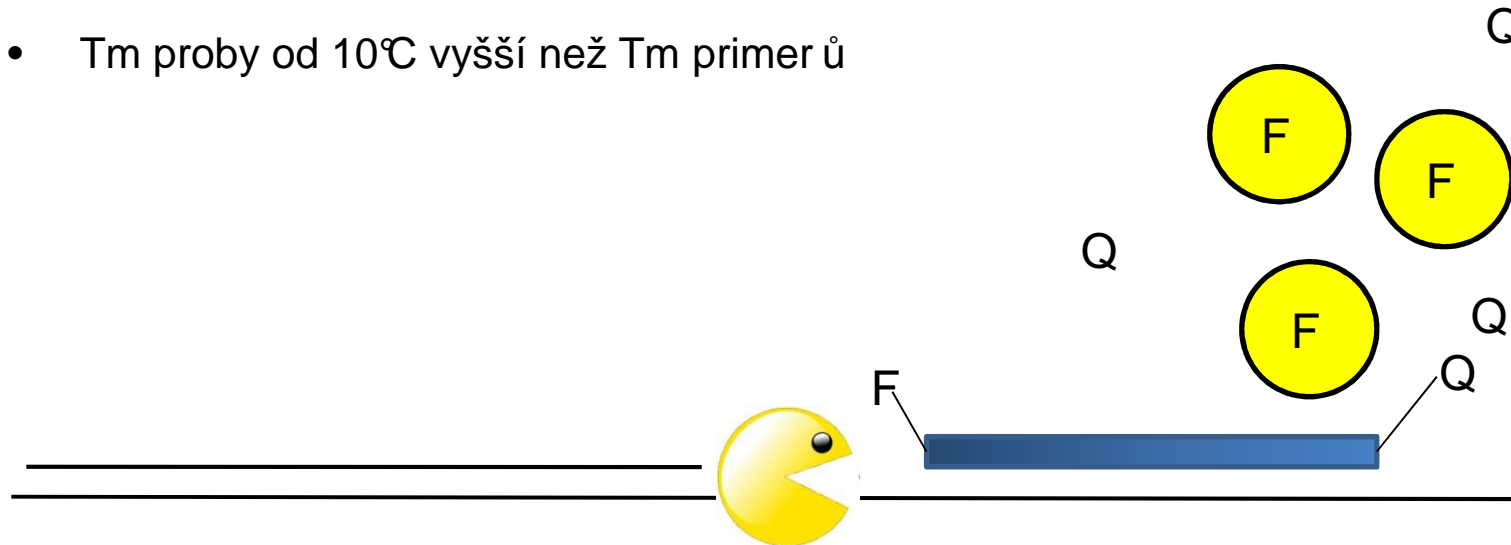
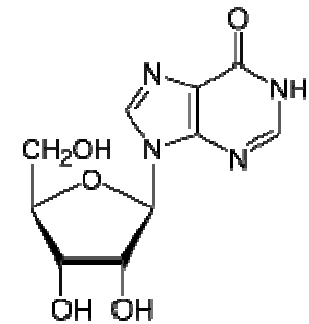
Design sond

- Různý design podle toho, zda je cílem kvantifikace DNA, mRNA nebo provedení alelické diskriminace nebo SNP
- Použitá chemie
- Detekce DNA, RNA nebo obou zároveň? Rozlišení HIV RNA od DNA začleněné do genomu
- Kombinace fluoroforu a zhášeče
- Modifikace sondy – LNA, PNA, MGB atd.
- Multiplex assay

Design primerů a sond

Design hydrolyzačních sond

- qPCR TaqMan - dvoukrokový proces – denaturace a annealing/extension
- Co nejnižší Ct a nejvyšší ΔR (ΔR_n)
- Umístění 5' konce sondy v rámci stanovované sekvence co nejbližše 3' konci jednoho z primerů – účinné štěpení sondy
- Optimální délka do 30 nukleotidů, obsah GC do 30%
- AT bohaté sekvence – začlenění LNA, PNA nebo MGB
- G – účinný quencher – neumisťovat fluorofor na G
- Minimum repeticí, zejména GGGG, začlenění inosinu do repetice
- T_m probe od 10°C vyšší než T_m primerů

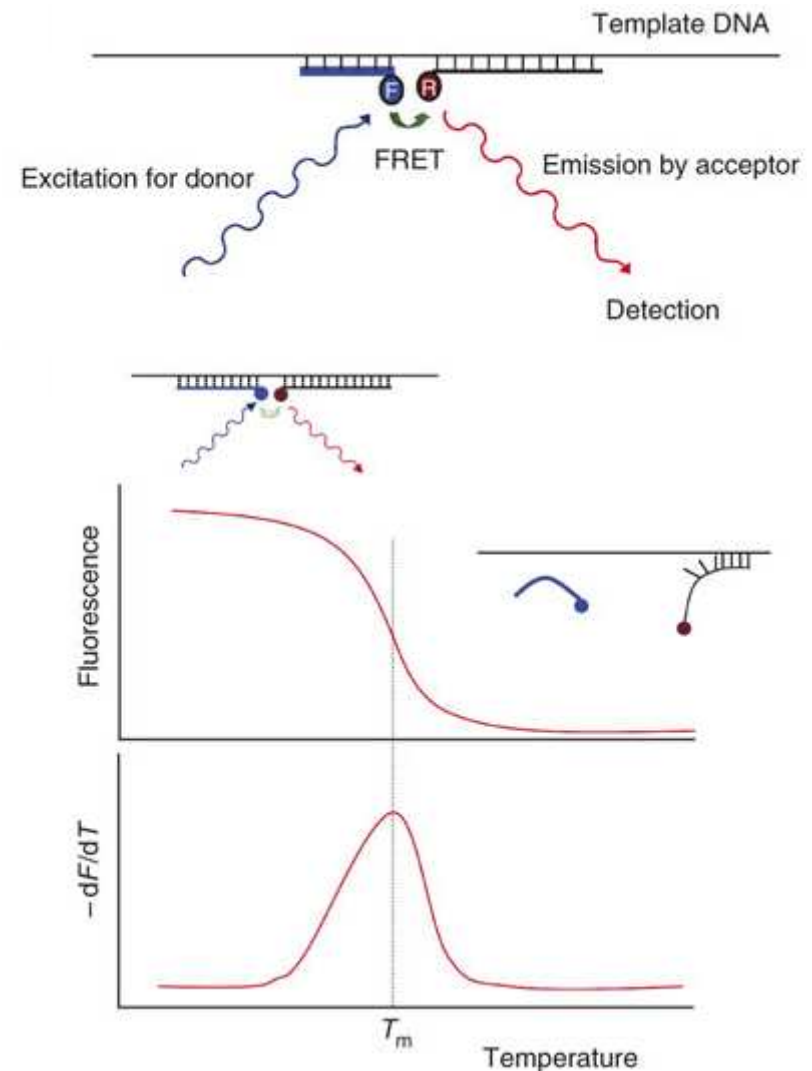


Design primerů a sond

Design hybridizačních sond

- Sondy by měly být umístěny co nejdál od primeru 5' – odečet fluorescence v annealingové fázi
- GC 50%
- Každá sonda má délku 23-35bp
- Sondy o stejné T_m – musí se vázat současně ; T_m sond o 5-10°C vyšší než T_m primerů
- 3' konec akceptorové sondy fosforylován
- Donor FAM, akceptor Cy5 nebo Lightcycler Red 640/705
- Vzdálenost mezi sondami 1-5 bází (zajištění FRET)

(Lightcycler probes)



Design primerů a sond

Design molekulárních majáků

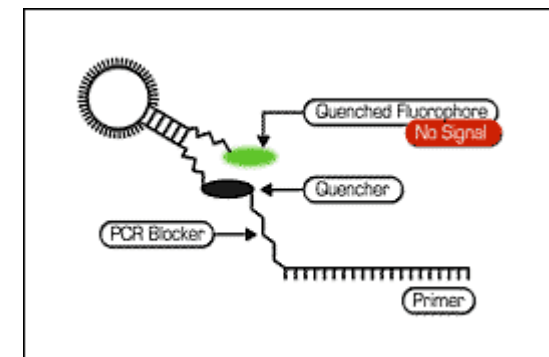
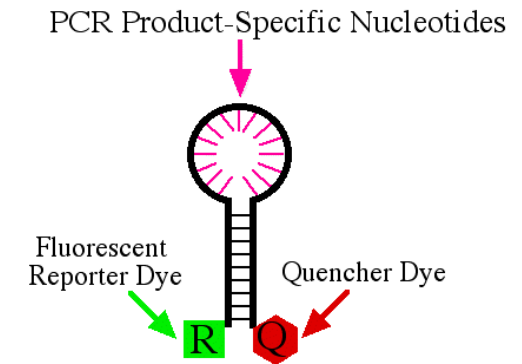
- Vazba majáku ideálně uprostřed ampliconu
- T_m komplementárních ramen o 7-10°C vyšší než T_m primerů
- Délka do 39 bp - omezení sekundárních struktur

Design scorpion primers

Sonda připojena k 5' konci primeru a je komplementární k nově syntetizovanému řetězci

- vlastní hybridizace sondy je intramolekulární událost
- 17-27bp; T_m sondy $< T_m$ primeru
- Cíl sondy – 0-20bp od 3' konce primeru
- Hairpin struktura
- výpočet ΔG pro uzavřenou i hybridizovanou formu

– MFold <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>



Design primerů

- Délka amplikonu, T_m , účinnost amplifikace i výtěžek
- Správná sekvence – BLASTn
- Sestřih – rozhraní exon/intron
- 3' konec – klíčový pro eventuální mispriming G/C
- Repetice (zejména GC)
- Sekundární struktura, intraprimer homology
- Obsah GC 35-65%
- Délka 15-25bp
- T_m 55-60°C
- ΔG do -10kcal/mol
- V případě převažujících AT – vhodné začlenění LNA
- Eventuální modifikace - na 5'konci

Design primerů a sond

Design primerů – web resources

Nový pár primerů

- Nízká komplexita sekvence (repetice)
- T_m mimo rozsah
- GC% mimo rozsah
- Vysoká stabilita 3' konce
- Vnitřní nebo vzájemná komplementarita
- Vysoké BLAST skóre
- Primer – dimery

Ne

Ano

OK

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
NM_005252.2	Homo sapiens v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), mRNA	40.1	40.1	100%	0.014	100%
XM_001718466.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
XM_001717510.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
XM_001716725.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
NM_017780.2	Homo sapiens chromodomain helicase DNA binding protein 7 (CHD7), mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
NM_182923.3	Homo sapiens kinesin light chain 1 (KLC1), transcript variant 2, mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
NM_005552.4	Homo sapiens kinesin light chain 1 (KLC1), transcript variant 1, mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
XM_001726819.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100131402 (LOC100131402), mRNA	28.2	28.2	70%	55	100%
XM_001725069.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100131402 (LOC100131402), mRNA	28.2	28.2	70%	55	100%
Genomic sequences [show first]						
NW_001838113.2	Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_11	40.1	901	100%	0.014	100%
NT_026437.11	Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, reference assembly	40.1	3647	100%	0.014	100%
NW_001838847.2	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_110	34.2	258	100%	0.89	100%

Design primerů a sond

Design primerů – web resources

- Primer Bank

<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>

- RTPrimerDB

<http://medgen.ugent.be/rtpprimerdb/>

- Real Time PCR Primer Set

<http://www.realtimeprimers.org/>

- QPPD

<http://web.ncifcrf.gov/rtp/gel/primerdb/default.asp>



Primer Bank

PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification

[Home/Search](#) [PCR Protocol](#) [Primer Statistics](#) [Comments](#) [Links](#) [Citation Policy](#) [Help/FAQ](#)

Primer Search

Search for PCR Primers

Search where

Species

For text:

You can blast your sequence against the primerbank sequence DB [here](#).

Order Oligos

You can have primers synthesized and PCR reaction products sequenced at:

DNA Core Facility

Center for Computational and Integrative Biology

Real Time PCR Primer Sets

Validated Primer Sets for Quantitative Real Time PCR

Are you normalizing gene expression to just one housekeeping gene?

Set of 10 Validated Housekeeping Gene Primer Sets - **Only \$79.95**
Available at www.realtimeprimers.com

Real Time PCR Primer Configure Sequence Detection Primers Online To Fit Your Needs. www.AppliedBiosystems.com
Real-Time PCR Training For Scientists and Professionals in Europe, USA and Asia. www.tataa.com
Real Time PCR Assays Highest quality gene. Highest quality validation process. www.primersdesign.co.uk
qPCR MasterMix qPCR MasterMix for Real-time PCR TaqMan and Sybergreen based assays. www.biocchain.com

[SYBR Green Primers](#) [Hybridization Probes](#) [Hydrolysis Probes](#)

[Molecular Beacons](#) [Submit Primers/Probes](#) [Links](#)

Design primerů a sond

Design primerů a sond– web resources

- Primer 3

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi

- Primer Express

<http://www.appliedbiosystems.com>

- Premier Biosoft International

<http://www.premierbiosoft.com>



Primer3: WWW primer tool

Put a primer from a DNA sequence

Primer source sequence below (5' to 3', using of ACOINaigu – other letters treated as N – numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALLs, LINs, etc.) or use a Multiple Libraries (vector/Primer)

NONE

Pick left primer or use left primer below | Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below | Pick right primer or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)

Pick Primers | Reset Form

A string to identify your output

Sequence ID: _____

Targets: _____ E.g. 502 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the primer sequence with [and] e.g. ...ATCTCCCTTCAT... means that primers must flank the central CCCC.

Excluded Bases: _____ E.g. 401,768,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the primer sequence with < and > e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT... forbids primers in the central CCCC.

Product Size: Min: 100 | Opt: 200 | Max: 1000

Number of Primers: Min: 1 | Opt: 2 | Max: 10

Max. Mispriming: 1200 | Pair. Max. Mispriming: 2400

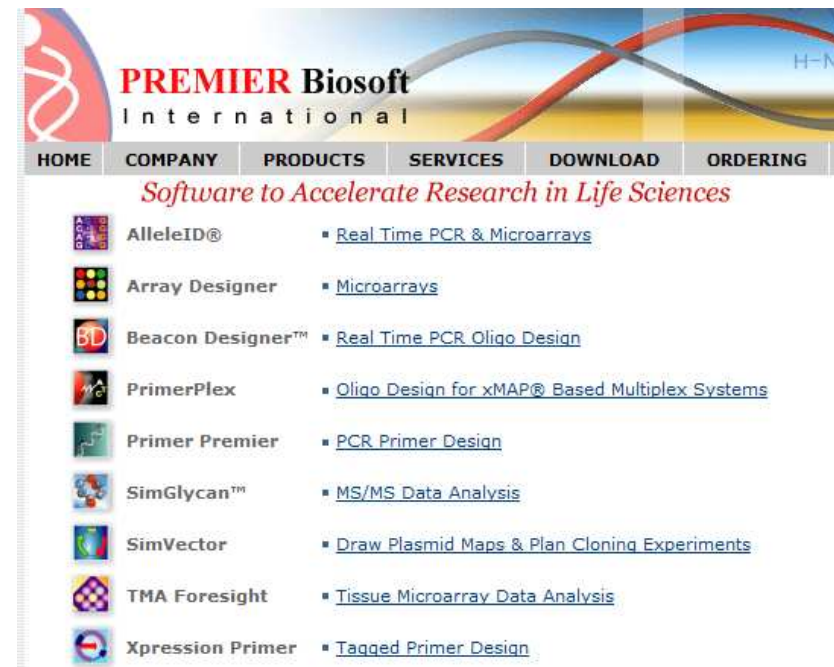
Pick Primers | Reset Form

General Primer Picking Conditions

Primer Size	Min: 18	Opt: 20	Max: 27	
Primer Tm	Min: 57.0	Opt: 60.0	Max: 63.0	Max. Tm Difference: 100.0
Product Tm	Min: _____	Opt: _____	Max: _____	
Primer GC%	Min: 20.0	Opt: _____	Max: 80.0	
Max Self-Complementarity	0.00	Max. Self-Complementarity	0.00	
Max. GC%	0	Max. GC%	5	
Inside Target Priority	_____	Outside Target Priority	0	Set Inside Target Priority to allow primers inside a target
Fast Base Index	1	GC Clamp	0	
GC Concentration	90.0	Intermediate GC Concentration	90.0	(Note the concentration of oligos in the reaction mix, not of those annealing to template)

Liberal Base: Show Debasing Info

Pick Primers | Reset Form



PREMIER Biosoft
International

HOME | COMPANY | PRODUCTS | SERVICES | DOWNLOAD | ORDERING

Software to Accelerate Research in Life Sciences

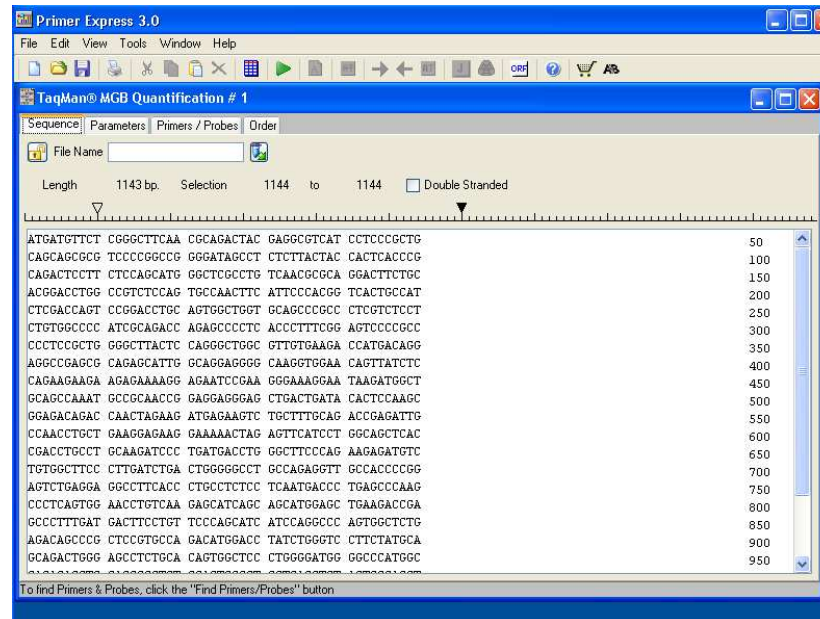
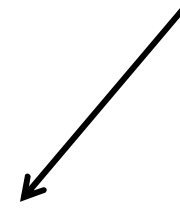
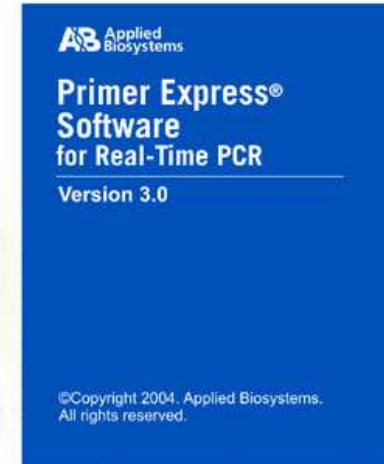
- AlleleID® | [Real Time PCR & Microarrays](#)
- Array Designer | [Microarrays](#)
- Beacon Designer™ | [Real Time PCR Oligo Design](#)
- PrimerPlex | [Oligo Design for xMAP® Based Multiplex Systems](#)
- Primer Premier | [PCR Primer Design](#)
- SimGlycan™ | [MS/MS Data Analysis](#)
- SimVector | [Draw Plasmid Maps & Plan Cloning Experiments](#)
- TMA Foresight | [Tissue Microarray Data Analysis](#)
- Xpression Primer | [Tagged Primer Design](#)

Design primerů a sond

Návrh primerů a TaqMan sond – Primer Express

```
STS /db_xref="UniSTS:477413"  
1090..>1143  
/gene="FOS"  
/gene_synonym="AP-1"  
/gene_synonym="C-FOS"  
/standard_name="BP25001511069"  
/db_xref="UniSTS:519218"  
  
ORIGIN  
1 atgatgttct cgggcttcaa cgcagactac gaggcgtcat cctcccctg cagcagcggc  
61 tccccggccg gggatagcct ctcttactac cactcaccgg cagactcctt ctcagcagtg  
121 ggctcgccctg tcaacgcgca ggacttctgc acggacctgg ccgtctccag tgccaacttc  
181 attccccagg tcactgccat ctccgacctg ccggacctgg agtggtggtt gcaagccggc  
241 ctgctctctc ctgtggcccc atcgcagacc agagcccctc acccttctgg agtccccggc  
301 cccctccgctg gggcttactc caggctgggc gttgtgaaga ccatgacagg aggcgcaggg  
361 cagagcattg gcaggagggg caaggtggaa cagttatctc cagaagaaga agagaaaagg  
421 agaatccgaa gggaaaggaa taagatggct gcaagcaaat gccgcaaccg gaggaggggag  
481 ctgactgata cactccaagc ggagacagac caactagaag atgagaagtc tgctttgcag  
541 accgagattg ccaacctgct gaaggagaag gaaaaactag agttcaactc ggcagctcac  
601 cgacctgcct gcaagatccc tgatgacctg ggcttcccag aagagatgtc tgtggcttcc  
661 cttgatctga ctgggggccc gccagaggtt gccaccccgg agtctgagga ggccttcaac  
721 ctgctctccc tcaatgaccc tgagcccgaag cctcagtggg aacctgtcaa gagcatcagc  
781 agcatggagc tgaagaccga gccctttgat gacttctctg tcccagcatc atcccaggccc  
841 agtggctctg agacagcccg ctccgtgcca gacatggacc tatctgggtc cttctatgca  
901 gcagactggg agcctctgca cagtggctcc ctggggatgg ggcccattgc cacagagctg  
961 gagccccctg gcactccggt ggtcacctgt actcccagct gcactgctta caagtcttcc  
1021 ttgctcttca cctaccgccg ggctgactcc ttcccagctg gtgcagctgc ccaccgcaag  
1081 ggcagcagca gcaatgagcc ttctctgac tgctcagct caccacagct gctggccctg  
1141 tga  
  
//
```

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)



Design primerů a sond

TaqMan® MGB Quantification # 1	
Sequence Parameters Primers / Probes Order	
Parameter	Value
<input type="checkbox"/> Primer Tm	
Min Primer Tm	58
Max Primer Tm	60
Max Difference in Tm of Two Primers	2
<input type="checkbox"/> Primer GC Content	
Min Primer %GC Content	30
Max Primer %GC Content	80
Max Primer 3' GC's	2
Primer 3' End Length	5
Primer 3' GC Clamp Residues	0
<input type="checkbox"/> Primer Length	
Min Primer Length	9
Max Primer Length	40
Optimal Primer Length	20
<input type="checkbox"/> Primer Composition	
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
<input type="checkbox"/> Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7
<input type="checkbox"/> Probe Tm	
Min Probe Tm	68
Max Probe Tm	70
<input type="checkbox"/> Probe GC Content	
Min Probe %GC Content	30
Max Probe %GC Content	80
<input type="checkbox"/> Probe Length	
Min Probe Length	13
Max Probe Length	25
<input type="checkbox"/> Probe Composition	
Max Probe G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Probe	0
No G at 5' End in Probe	<input checked="" type="checkbox"/>
Select Probe with more C's than G's	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Probe Secondary Structure	
Max Probe Consec Base Pair	4
Max Probe Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Amplicon	
Min Amplified Region Tm	0
Max Amplified Region Tm	85
Min Amplified Region Length	50
Max Amplified Region Length	150
<input type="checkbox"/> General	
Max Primers / Probes	50

Design primerů a sond

TaqMan® MGB Quantification # 1

Sequence Parameters Primers / Probes Order

Candidate Primers & Probes

#	Fwd Start	Fwd Stop	Fwd Len...	Fwd Tm	Fwd %GC	Fwd Seq	Rev Start	Rev Stop	Rev Len...	Rev Tm	Rev %GC	Rev Seq	Probe
1	162	181	20	58	55	CGTCTCCA...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	183
2	161	180	20	59	60	CCGTCTCC...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	182
3	161	180	20	59	60	CCGTCTCC...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	183
4	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
5	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
6	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
7	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
8	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
9	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
10	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
11	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
12	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
13	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
14	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
15	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
16	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
17	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
18	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
19	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
20	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
21	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
22	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	820
23	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	820
24	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	821
25	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	821
26	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	822
27	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
28	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
29	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
30	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	812	793	20	58	50	TCATCAA...	765
31	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	812	793	20	58	50	TCATCAA...	765

Click to show Locations
 Click to show Secondary Structures

Design primeru a sond

Name	Value
<input type="checkbox"/> Forward Primers	
Total primers tested:	35792
GC test passed:	35149
Ambiguity test passed:	963
Clamp test passed:	963
Tm test passed:	963
Avoid Excluded regions test passed:	963
Repeat test passed:	900
Self compare test passed:	741
Limit GC test passed:	214
Sequence compare passed:	84
Reverse sequence compare passed:	83

<input type="checkbox"/> Reverse Primers	
Total primers tested:	35296
GC test passed:	34657
Ambiguity test passed:	946
Clamp test passed:	946
Tm test passed:	946
Avoid Excluded regions test passed:	946
Repeat test passed:	861
Self compare test passed:	703
Limit GC test passed:	205
Sequence compare passed:	95
Reverse sequence compare passed:	95
<input type="checkbox"/> Primer Pairs	
Total pairs tested:	7885
Amplicon Length test passed:	691
Avoid Excluded regions test passed:	691
Tm Difference test passed:	691
Amplicon Tm test passed:	630

<input type="checkbox"/> TaqMan Probes	
Total probes tested:	14450
GC test passed:	14128
Ambiguity test passed:	1178
Tm test passed:	1178
Avoid Excluded regions test passed:	1178
Repeat test passed:	1126
Self compare test passed:	1076
Sequence compare passed:	475
Reverse sequence compare passed:	458
Probe start test passed:	351

Design primeru a sond

www.appliedbiosystems.com

Home Products Applications & Technologies Services Support Learning & Events Store Help

Log In or Register to see your product prices & to place orders. Enter search term All Categories

Products > Real-Time PCR > Gene Expression Assays, Plates & Arrays > Assays > TaqMan® Gene Expression Assays

TaqMan® Gene Expression Assays

Click a tab below to learn more about TaqMan Gene Expression Assays. To find and order assays, click the Search tab.

Ordering Information **Assay Search** Product Description Specifications Literature/Support Related Products

To begin, select a search method below

- **Keyword:** Search by gene symbol, gene name, public accession number, biological process, or molecular function.
- **Batch ID:** Search by uploading a file containing multiple assay IDs, RefSeq accession numbers, GenBank GI #s, LocusLink IDs, gene symbols, IMAGE Clone IDs, or species.

Keyword Search | Batch ID Search

Search for in

Disable wildcard search

[Advanced Keyword Search](#)

Choose Species

H. sapiens A. thaliana R. norvegicus D. melanogaster M. musculus C. elegans M. mulatta (Rhesus) C. familiaris (Canine) D. rerio (Zebrafish) B. taurus (Cow) G. gallus (Chicken) O. cuniculus (Rabbit) S. scrofa (Pig)

Filter by Amplicon Lengths

Amplicon length less than 70
 Amplicon length between 71 and 85
 Amplicon length between 86 and 100
 Amplicon length greater than or equal to 101

Choose Set Membership

Search All Assays (excludes Gene Copy Number Assays)
 Search Gene Copy Number Assays
 Limit Assay Sets to:

TARGET CLASS	ASSAY ATTRIBUTE	MICROARRAY VALIDATION	COLLABORATOR SETS
<input type="checkbox"/> Apoptosis	<input type="checkbox"/> Ambion siRNA	<input type="checkbox"/> 1700	<input type="checkbox"/> Immune Tolerance Network
<input type="checkbox"/> Fusion Transcripts	<input type="checkbox"/> Endogenous Controls	<input type="checkbox"/> 3' Most	<input type="checkbox"/> Mammalian Gene Collection

Ordering Information **Assay Search** Product Description Specifications Literature/Support Related Products

Your search for **C-Fos in All Text** returned 27 results. (Species: Homo sapiens Amplicon Length: ALL Set Membership: ALL) If you wish to refine your search results by product availability, click a radio button below, and then click Filter Results. To filter your results by other criteria, select from the categories list to the left of your results.

Previous | 1 | 2 | Next

View Results by Category

All Results/
Panther Classification:
 Panther Function (26)
 Panther Process (26)

Filter Results by availability

Inventoried Assays Made to order Assays Inventoried and Made to order Assays



Please Log In to add products to your Shopping Basket/Favorites, **configure a product**, or to view products available for purchase in your country.

25 items/page

Assay ID	Availability	Gene Symbol	Gene Name	Alias	RefSeq	GenBank mRNA	Species	Amplicon Length
1. Assay ID Details: Hs00170630_m1 Alignment Map siRNAs & Related Products	Inventoried	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	AP-1 C-FOS	NM_005252.2	5 GenBank mRNAs	Homo sapiens	77
2. Assay ID Details: Hs9999140_m1	Inventoried	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	AP-1 C-FOS	NM_005252.2	5 GenBank mRNAs	Homo sapiens	77

Assay ID	Availability	Gene Symbol	Gene Name	Alias	RefSeq	GenBank mRNA	Species	Amplicon Length
1. Assay ID Details: Hs00170630_m1 Alignment Map siRNAs & Related Products	Inventoried	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	AP-1 C-FOS	NM_005252.2	5 GenBank mRNAs	Homo sapiens	77
							Homo sapiens	78
							Homo sapiens	67


Design primerů a sond

Roche Applied Science  Czech Republic [Login](#) [Quick Order](#) [Shopping Cart](#) [Help](#) [Contact Us](#) 

[Home](#) [Products](#) [Special Interest Sites](#) [Support & Resources](#) [News](#)

[Home](#) > [Special Interest Sites](#) > [Genomic Systems](#) > [Real-Time PCR Systems](#) > **Universal ProbeLibrary System**

Universal ProbeLibrary



- Real-Time PCR Systems
 - LightCycler® Carousel-Based System
 - LightCycler® 480 System
 - Universal ProbeLibrary System**
 - System Description
 - Technology
 - Assay Design Center
 - User Statements and Application
 - Assay List
 - Performance
 - Product List
 - Support
 - Literature and References
 - Multimedia Presentations
 - Product Information and Pack Inserts

Gene Expression Quantification with Real-Time PCR - Simple and Fast

- ◆ Design real-time qPCR assays online in seconds.
- ◆ Rely on just 165 prevalidated probes for over five million qPCR assays for a large variety of organisms.
- ◆ Reduce the cost of gene expression analysis by performing multiplex qPCR assays with Universal ProbeLibrary Reference Gene Assays.

Universal ProbeLibrary for Human

Roche Applied Science

Specify your target(s):

[Advanced primer3 settings](#)

By sequence ID, gene name or keyword

e.g. ENST00000331789, NM_001101 or X00351 or beta-actin

or

By sequence

e.g.

```
>part of X00351 Human mRNA for beta-actin
CACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAAT
GAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCCGTGTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCC
AAGGCCAACCCGAGAGATGACCCAGATCATGTTGAGACCTTCAACACCCAGCCATG
TACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGCCTCTGGCCGTACCCTGSCATCGTG
ATGGACTCCGGTGACGGGGTACCCACACTGTGCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCC
```

Automatically select an intron spanning assay. Design multiplex PCR with reference gene.

www.universalprobelibrary.com

Design primeru a sond

Please choose the sequence(s) you would like to continue with. You can select up to 10 sequences.

- ▼ Real-Time PCR Systems
 - ▶ LightCycler® Carousel-Based System
 - ▶ LightCycler® 480 System
- ▼ Universal ProbeLibrary System
 - ▶ System Description
 - ▶ Technology
- ▼ Assay Design Center
 - ▶ Pack Inserts
 - ▶ Assay Design Guide
 - ▶ Quick Reference
 - ▶ Probe No. Conversion
 - ▶ Need Help?
 - ▶ User Statements and Application
 - ▶ Assay List
 - ▶ Performance
 - ▶ Product List
 - ▶ Support
 - ▶ Literature and References
 - ▶ Multimedia Presentations
 - ▶ Product Information and Pack Inserts

Name	Length	Description
<input type="checkbox"/> ENST00000400991.1	2669	AL139130.28-201 Clone_based_ensembl_transcri Transcriptional activator of the c-fos promoter CROC4 (CROC-4). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q8N964]
<input type="checkbox"/> ENST00000303562.2	2103	FOS-201 HOMO sapiens automatic transcript Proto-oncogene fos (G0/G1 phase) [Source:UniProt/SPTREMBL;Acc:Q8N964]
<input type="checkbox"/> ENST00000297904.2	2110	FIGF-001 HOMO sapiens endothelial cell (c-fos-inducible) [Source:UniProt/SPTREMBL;Acc:Q8N964]
<input type="checkbox"/> NM_003367.2	1732	Homo sapiens c-fos interacting mRNA.
<input type="checkbox"/> NM_207291.1	1531	Homo sapiens c-fos interacting mRNA.
<input type="checkbox"/> NM_003131.2	4343	Homo sapiens response element binding protein (SRF), mRNA.
<input type="checkbox"/> NM_004469.2	2128	Homo sapiens (vascular endothelial) mRNA.
<input type="checkbox"/> AB022275.1	300	Homo sapiens partial cds.
<input type="checkbox"/> AB022276.1	700	Homo sapiens partial cds.
<input type="checkbox"/> AB209128.1	5672	Homo sapiens (c-fos serum) transcription start site.
<input type="checkbox"/> AF126533.1	238	Homo sapiens

ProbeFinder has designed the optimal real-time PCR assay for:

[NM_003367.2](#) Homo sapiens upstream transcription factor 2, c-fos interacting (USF2), transcript variant 1, mRNA.

Assay details:

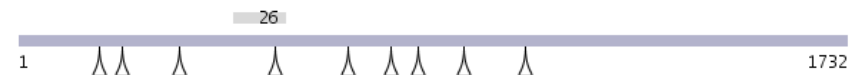
Use Universal ProbeLibrary probe: #26, cat.no. 04687574001

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	18	449 - 466	60	67	gtgaccacaggtgggtgtg
Right Primer	21	540 - 560	59	43	tgaaggatttttgatcacag

Amplicon (112 nt)

```
gtgaccacaggtgggtgtggaacggggcagcccagcggccggcccccgcctctgtg
ccccaggtcctgcagcccttcccgtggtgtgatccaaaatccctca
```

Transcript overview:



Detailed view:



Design primerů a sond



Shrnutí:

- Rozumíte vlastnostem primerů i základních typů sond a znáte faktory, které ovlivňují jejich hybridizaci a účinnost
- Umíte navrhnout optimální sekvenci primerů i hydrolyzační sondy pomocí dostupných programů a rozumíte parametrům designu





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



VI. Aplikace qRT-PCR

Aplikace

1. Detekce DNA

- Diagnóza infekčních onemocnění (přítomnost patogenů v krvi, séru, plazmě ...)
- Detekce patogenů v potravinách a v životním prostředí
- Detekce GMO
- Autenticita potravin

2. Detekce RNA

- Minimální reziduální onemocnění
(Her2 – karcinom prsu, Bcr-Abl – CML, ELAVL-4 – neuroblastom)
- Detekce RNA virů
- Diagnóza nádorových onemocnění (PSA – karcinom prostaty)
- Validace microarray experimentů

3. Detekce SNP a alelická diskriminace

4. High Resolution Melting Analysis

5. Kvantifikace množství (konkrétních) proteinů

Aplikace

Aplikace v klinické mikrobiologii

Diagnóza - rychlá, citlivá a přesná determinace patogenů

Klasické kulturační metody – časově náročné (24-48hod), nízká citlivost, omezené spektrum druhů

qRT-PCR – např. geny kódující 23S rRNA nebo 16S rRNA

Rutinní diagnostika

- *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*

Monitoring zneužitelných druhů - **biodefense**

- *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*

Výzkum – testování antibiotik – *multidrug resistant strains*

(analýza bodových mutací v genech zodpovědných za metabolismus ATB)

- *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*

Houbová a parazitární onemocnění

- *Aspergillus fumigatus*, *Candida* sp.

- *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*

Aplikace

Aplikace v klinické mikrobiologii

Příklad protokolu:
Detekce *Prevotella intermedia*

Stěr z úst

Resuspendovat stěr v 1xPBS
Vortex 30s, cfg. 20min/15 000g
Izolovat bakteriální DNA ze supernatantu



Návrh primerů (Primer Express) – oblast 16S rDNA

Např.:

Forward: 5'-AATACCCGATGTTGTCCACA-3'

Reverse: 5'-TTAGCCGGTCCTTATTCGAA-3'

Reakční směs

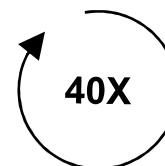
2x SYBR green Master Mix (Applied Biosystems)	26,0μl
Forward primer (10μM)	2,0μl
Reverse primer (10μM)	2,0μl
PCR grade H ₂ O	15,0μl
Vzorek DNA nebo standard	5,0μl

PCR

95°C 1min

95°C 15s

60°C 1min



Disociační křivka – 60-95°C

Aplikace

Aplikace v klinické virologii

Typizace virů (např. chřipka)

- nepřítomnost signálu - variabilita v sekvencích/falešně negativní výsledky
- Hydrolyzační (TaqMan) i hybridizační sondy

Kvantifikace – virový titr

- např. hepatitida B/C, HIV, EB, cytomegalovirus atd.
- Transplantace

Detekční limity – genomové ekvivalenty (ge)

- End-point analýza – detekční limit 5×10^1 ge; dynamický rozsah 10^1 - 10^4 ge
- Hybridizační analýzy - detekční limit 2×10^1 ge; dynamický rozsah 10^1 - 10^4 ge

Inter- a intra assay variabilita >40%

- qRT-PCR - detekční limit 1×10^1 ge; dynamický rozsah 10^1 - 10^8 ge

Inter- a intra assay variabilita <5-10%

Interní amplifikační kontrola

- Paralelní PCR známého standardu
- Tzv. „Spiking“ vzorků známými sekvencemi
- Paralelní analýza příbuzného viru (např. pro lidský HSV - tulení PhHV)

Aplikace

Aplikace v klinické virologii

Příklad protokolu:

Detekce viru chřipky (Influenza A) – 5' nukleázová assay

Stěr z nosohltanu

Resuspendovat stěr v 1xPBS

Vortex 30s,

Izolovat virovou RNA ze supernatantu

Návrh primerů a sondy (Primer Express) – oblast M1 (influenzaA matrix gene)

Např.:

Forward: 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3'

Reverse: 5'-GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA-3'

Sonda: Fam-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG-BHQ+

Reakční směs – One Step PCR (Qiagen)

Qiagen One Step RT-PCR Enzyme Mix 1,0 μ l

Qiagen One Step RT-PCR Buffer (5x) 5,0 μ l

Qiagen One Step RT-PCR dNTP mix (10mM) 1,0 μ l

Forward primer (10 μ M) 2,0 μ l

Reverse primer (10 μ M) 2,0 μ l

Sonda (20 μ M) 0,2 μ l

PCR grade H₂O 8,8 μ l

Vzorek DNA nebo standard 5,0 μ l

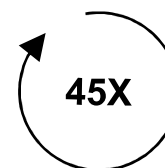
PCR

50°C 20min (Reverzní transkripce)

95°C 15min (Aktivace polymerázy)

95°C 15s

60°C 1min



Aplikace

Terénní qRT-PCR

- Detekce patogenů mimo laboratoř
- Komerční specializovaná řešení



<http://www.idahotec.com/BioDefense/>



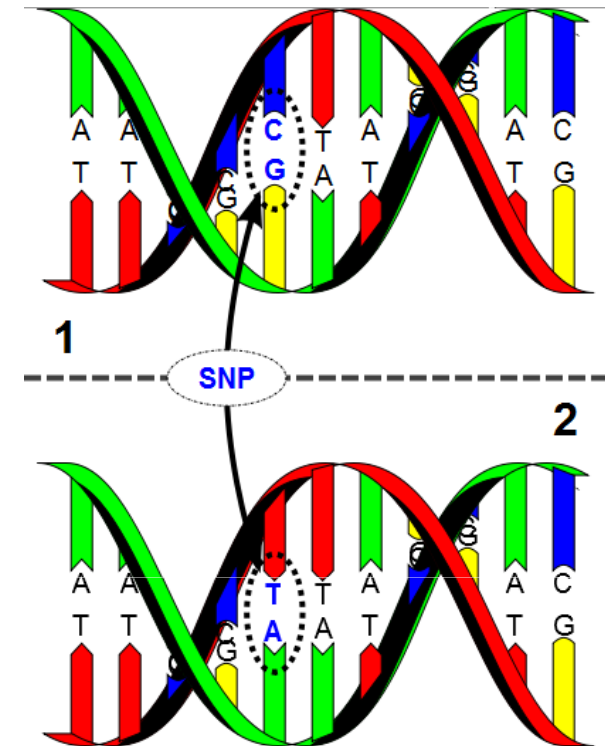
<http://www.rapidcycler.com/GSA/index.html>

Aplikace

Jednonukleotidové polymorfismy

SNP

- DNA sekvence lišící se v jediném nukleotidu
- Kódující i nekódující oblasti
- Záměna nukleotidu nemusí nutně vést k záměně AA
- Variabilita v odpovědi k patogenům, léčivům, atd.
- Senzitivita k onemocněním
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

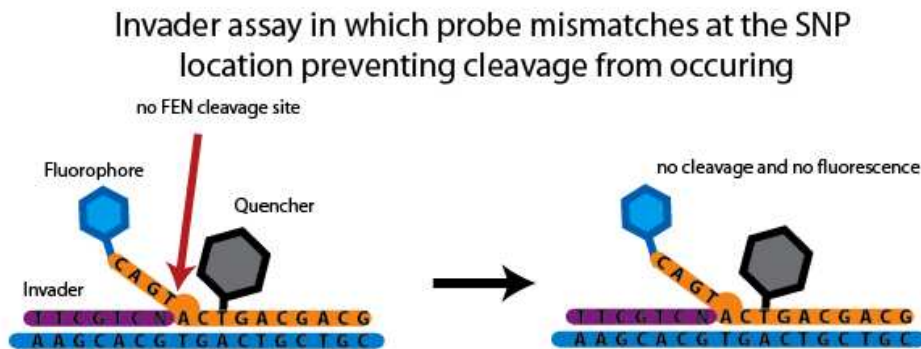
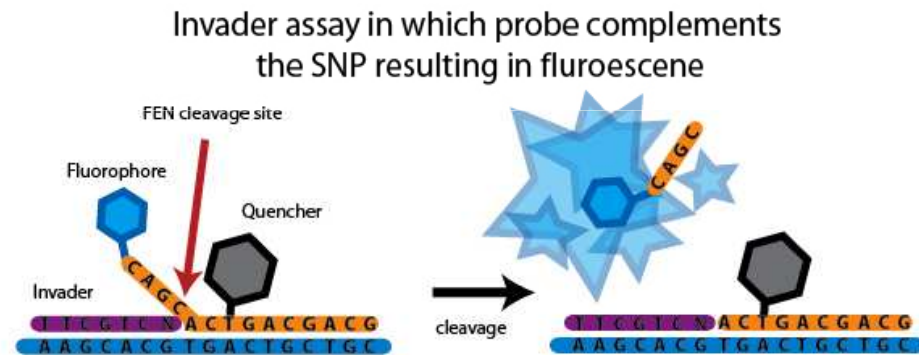


The screenshot shows the NCBI Single Nucleotide Polymorphism search interface. The NCBI logo is on the left, and the text 'Single Nucleotide Polymorphism' is in the center. Below the text are navigation links: PubMed, Nucleotide, Protein, Genome, Structure, PopSet, Taxonomy, OMIM, Books, and SNP. A search bar contains the text 'Search for SNP on NCBI Reference Assembly'. Below the search bar is a form with 'Search Entrez' on the left, a dropdown menu with 'SNP' selected, a 'for' label, and a 'Go' button on the right.

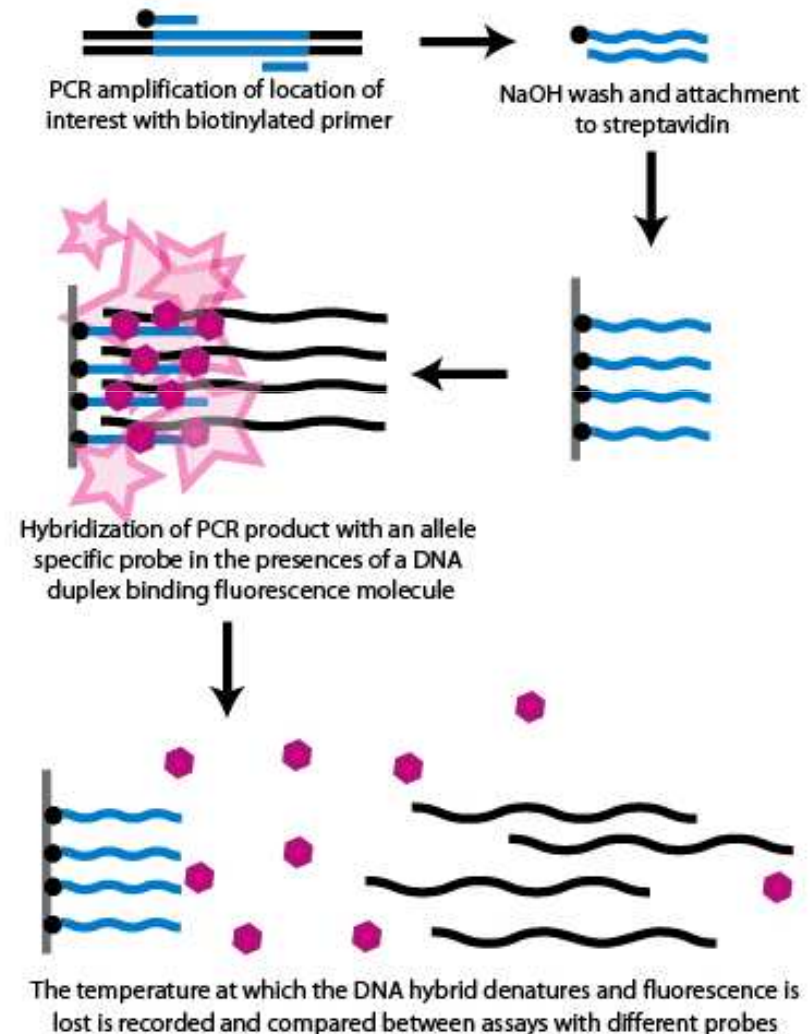
Aplikace

SNP genotypizace

- Invader assay (Flap endonukleáza)
- Denaturační gradientová gelová elektroforéza
- Sekvenování
- SNP microarray



Reference: Based on Olivier M. 2005. The Invader assay for SNP genotyping.

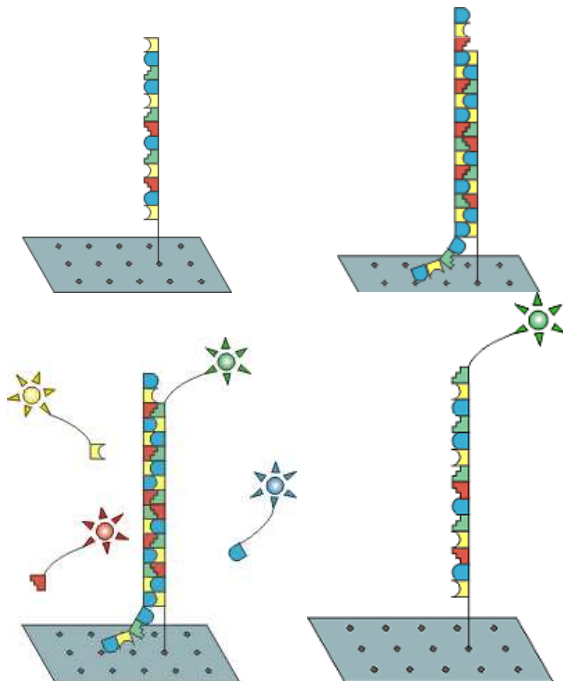


Aplikace

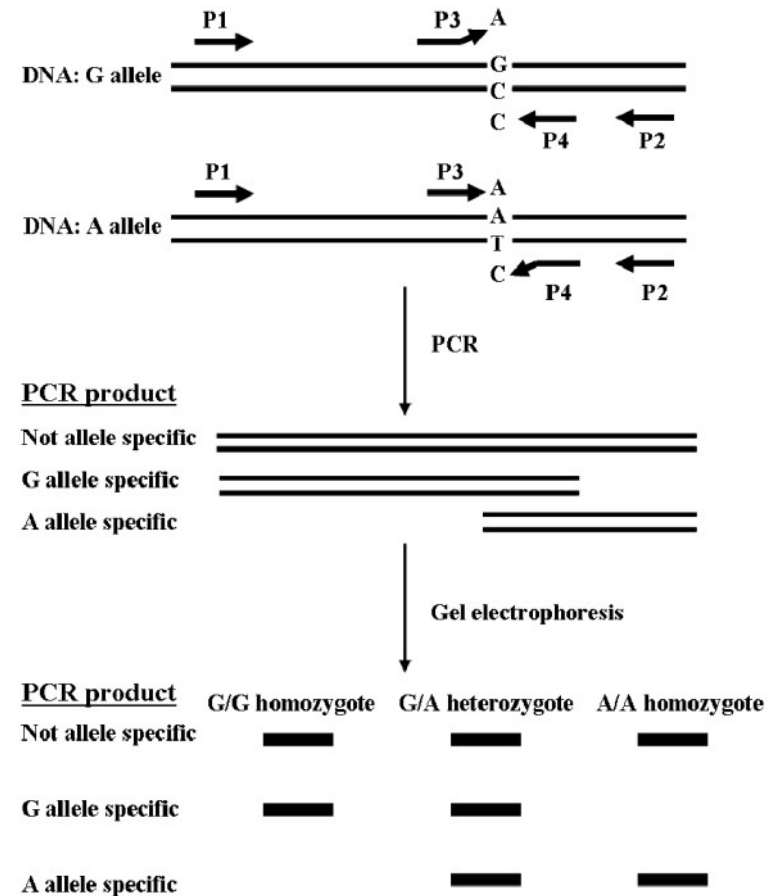
SNP genotypizace

APEX (Arrayed primer extension)

- 2D matice, oligonukleotidy imobilizované 5'koncem
- PCR produkt je hybridizován a prodloužen DNA polymerázou
- Fluorescenčně značené terminátorové nukleotidy



Tetra-primer based PCR

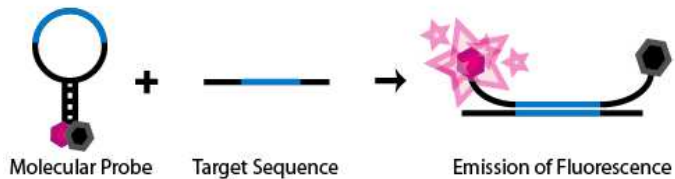
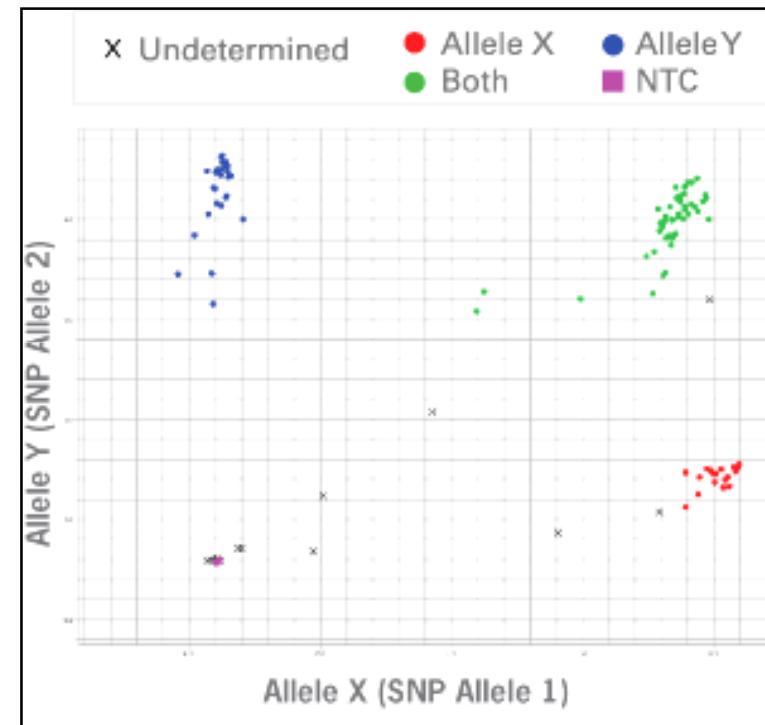
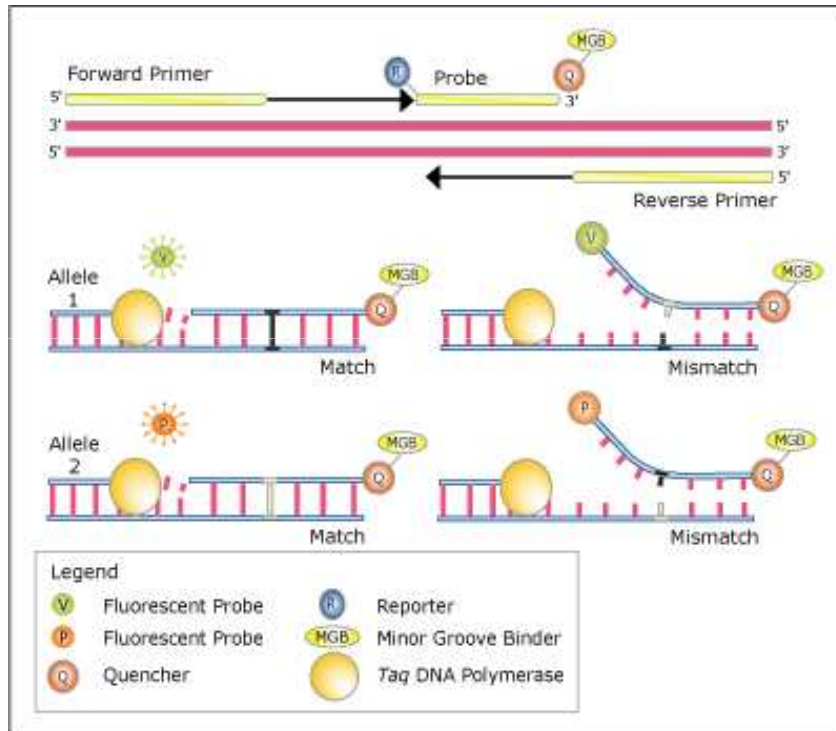


Aplikace

SNP genotypizace pomocí real-time PCR

Zejména molekulární majáky a TaqMan sondy

End-point analýza



Aplikace

Analýza křivek teplot tání = High resolution melting analysis

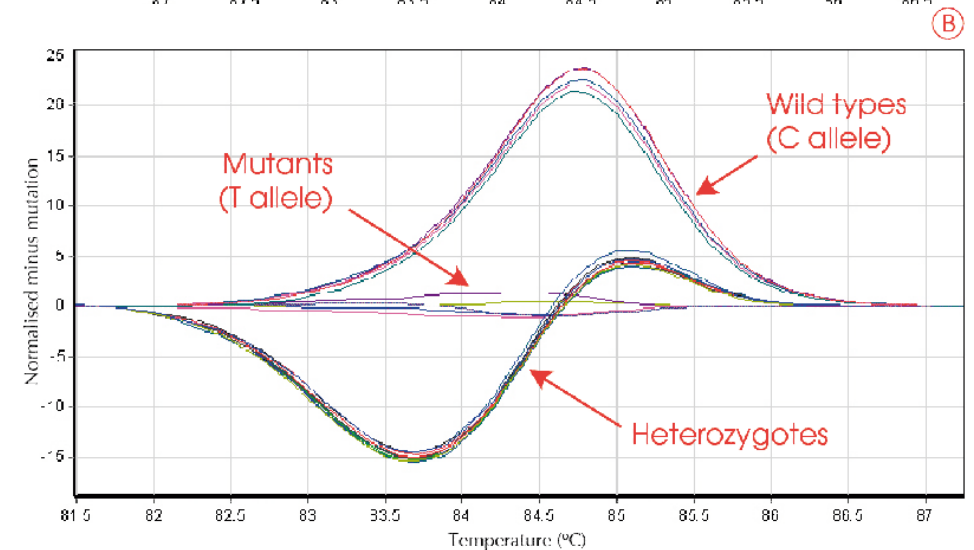
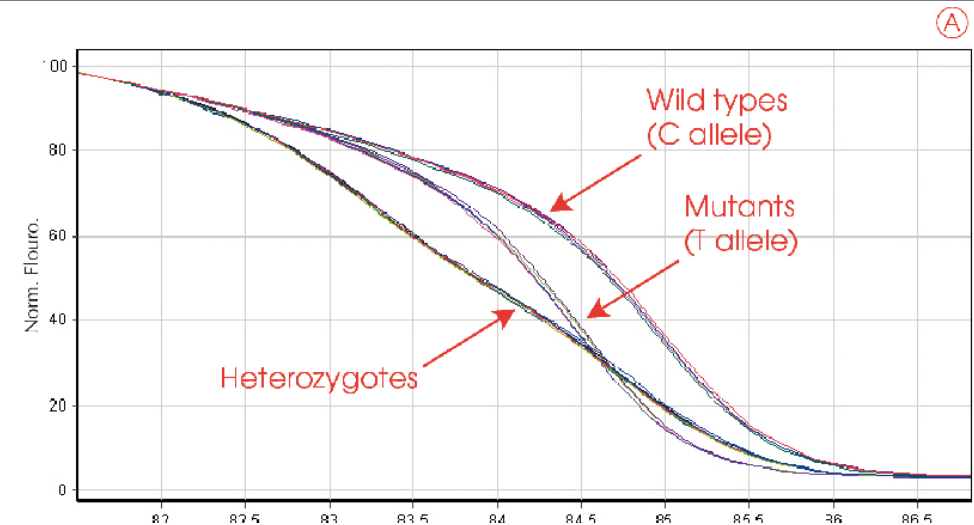
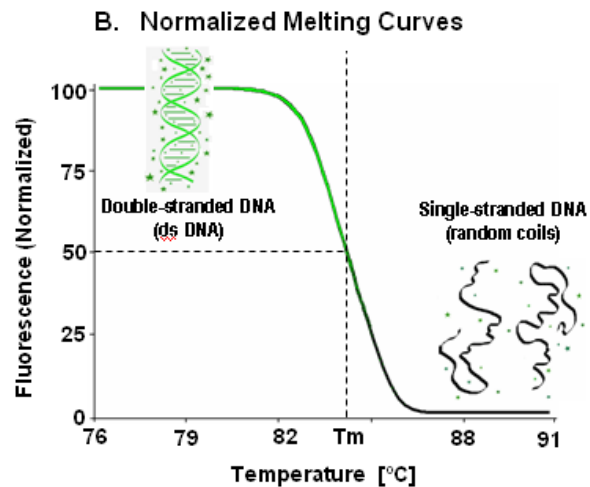
Analýza komplexních sekvencí
PostPCR analýza
Snadná analýza neznámých sekvencí
Sledování disociace řetězců DNA v závislosti na teplotě

Výhody:

- Univerzální primery
- Jediný fluorofor (SYBR Green)
- „High throughput“

Aplikace:

- SNP, mutace - genotypizace
- Typizace mikroorganismů

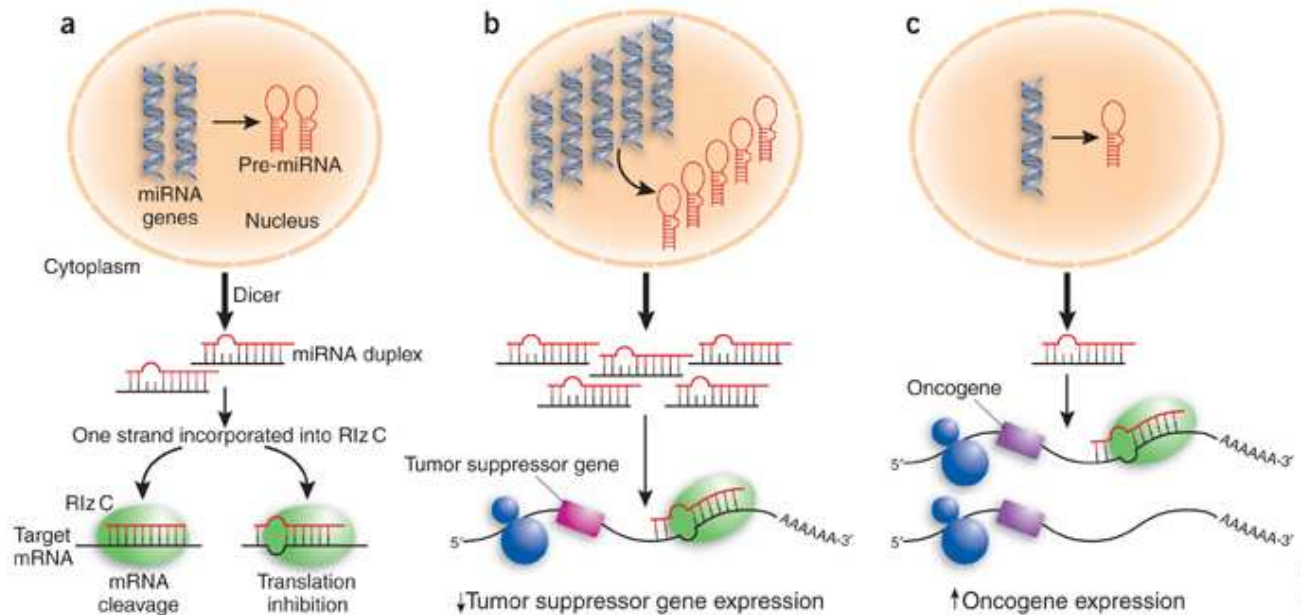
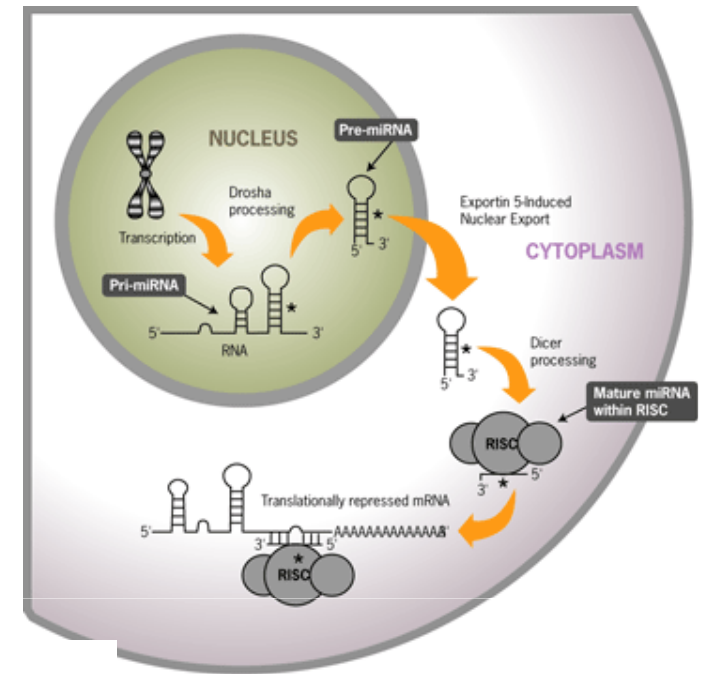


Aplikace

miRNA detekce

MikroRNA (miRNAs)

- Malé molekuly RNA
- rostliny i živočichové
- konzervativní sekvence
- 21mery
- regulují expresi genů vazbou na 3' nepřekládaný region mRNA (3'UTR)

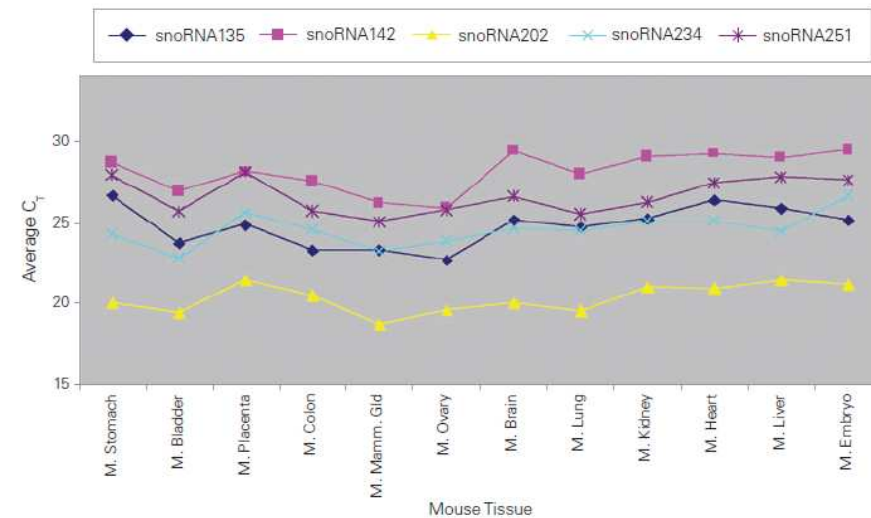
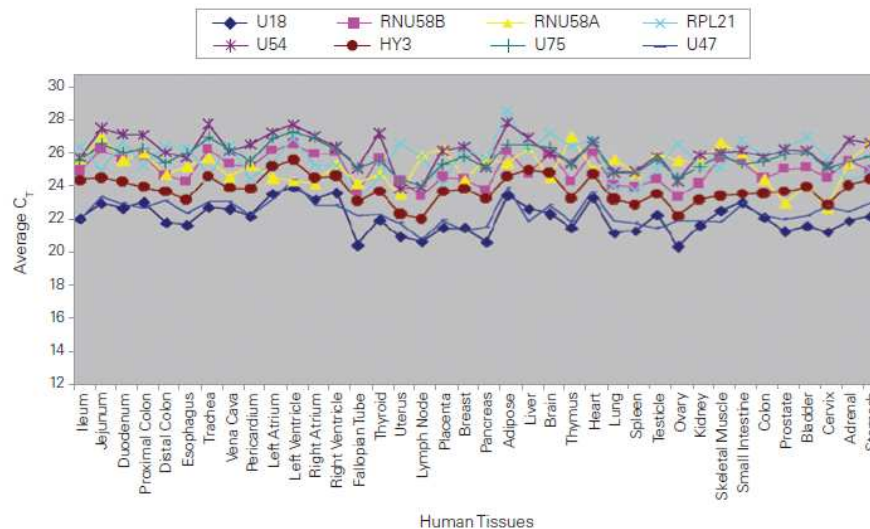
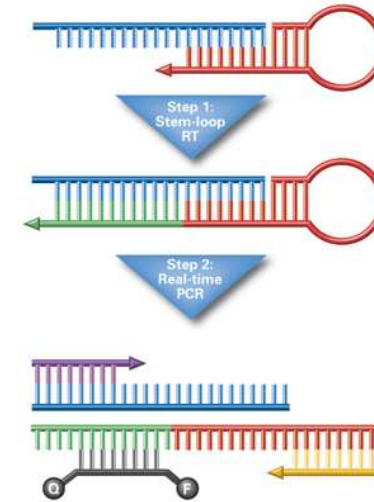


Aplikace

miRNA detekce

- Specifický primer pro RT
- 5' nuclease assay (TaqMan) PCR

Endogenní kontrola: malá jaderná RNA (snRNA)

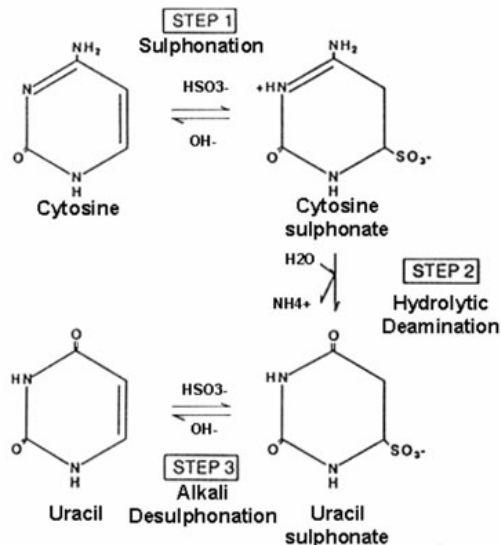


Aplikace

Analýza DNA metylací

- Více než 70% C lidského genomu v sekvenci CpG je metylováno
- Významná modifikace, regulující např. architekturu chromozomu i řadu dějů na buněčné úrovni
- regulační úseky genů - promotory

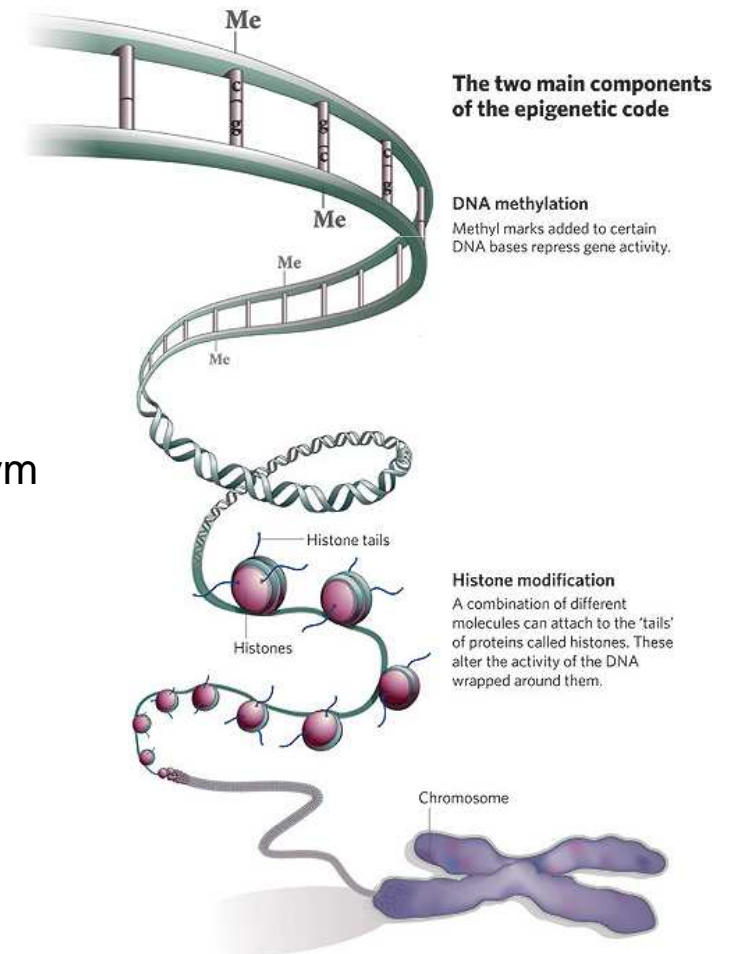
C + bisulfit = U
mC intaktní



mC vs. C

mC vs. C

Endonukleázy citlivé metylovaným sekvencím
BsoFI, HpaII, MspI and HhaI



Aplikace

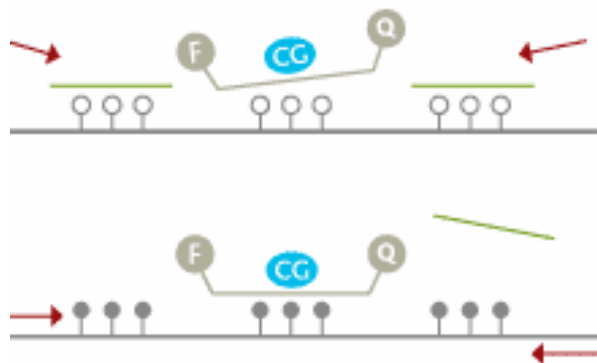
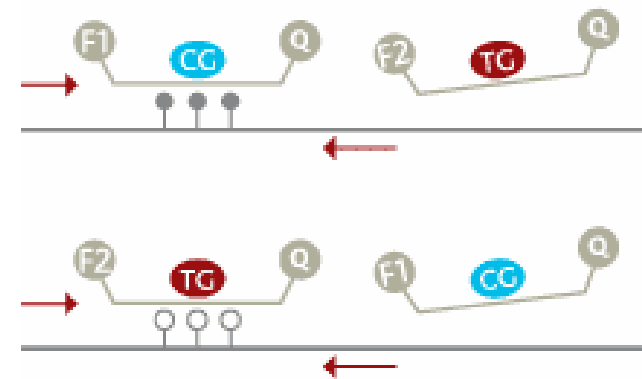
Kvantitativní analýza DNA metylací
pomocí real-time PCR

Nemetylované cytosiny jsou konvertovány na U
bisulfitovou metodou

1. Pro každou sekvenci dva páry primerů

nebo

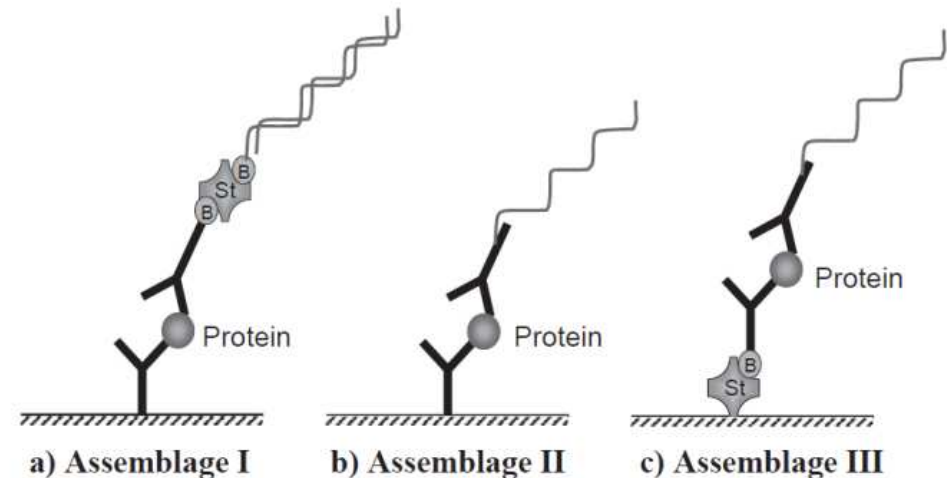
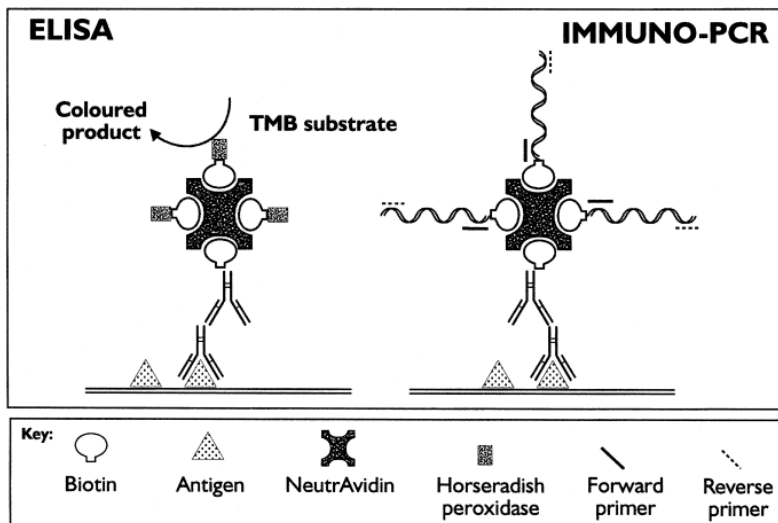
2. Jsou použity oligonukleotidy hybridizující k
nemetylovaným sekvencím a blokující PCR



Aplikace

ImunoPCR

- Vazba specifického oligonukleotidu k monoklonální protilátce
- Protein (Antigen) je imobilizován jinou monoklonální protilátkou
- Vzniká sendvič (assemblage) - podobně jako ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- tzv. PCR- ELOSA (Enzyme-Linked Oligonucleotide Sorbent Assay)
- Množství oligonukleotidu imobilizovaného prostřednictvím mAb je kvantifikováno PCR



Aplikace

ImunoPCR

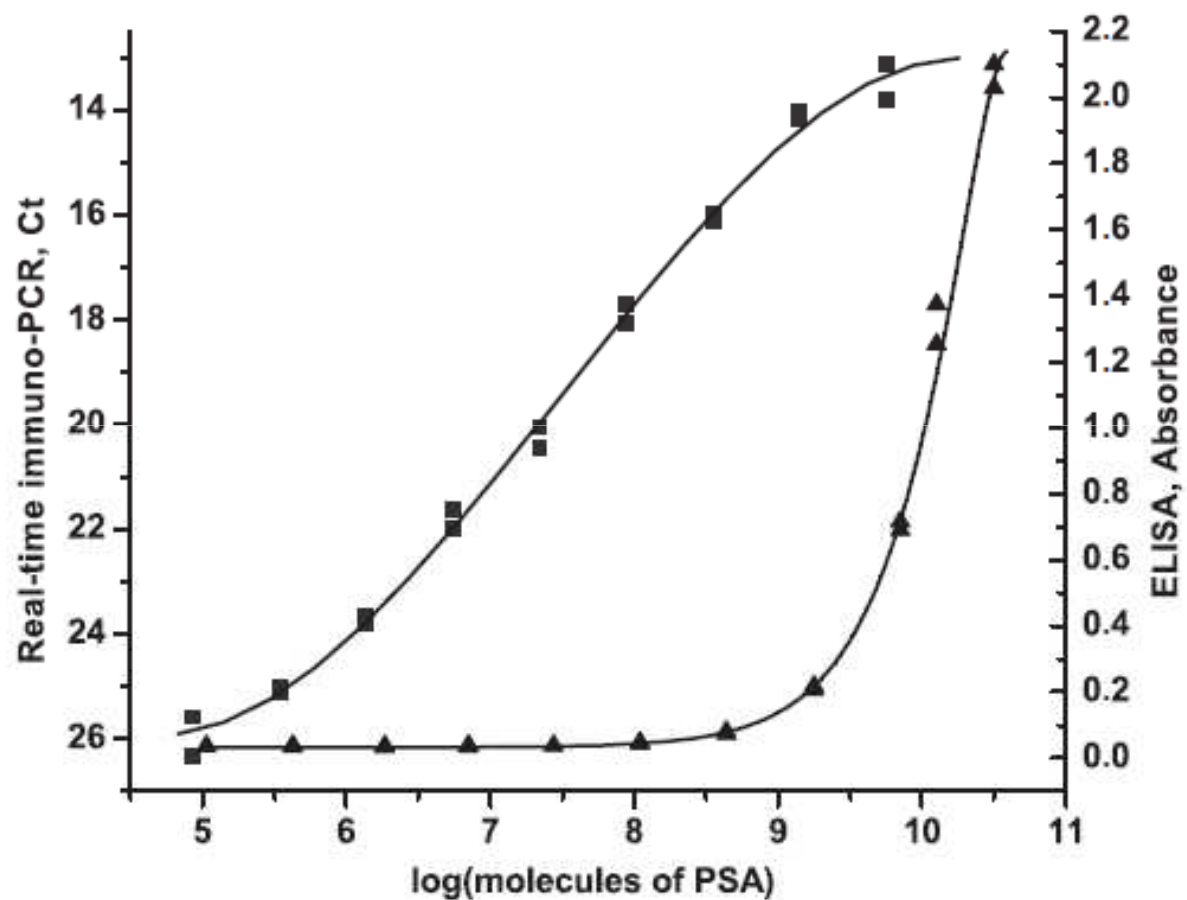


Fig. 5. Real-time immuno-PCR (assemblage II) (■) and ELISA (▲) readouts of standard samples (logarithmic scale).

Aplikace

ImunoPCR – stanovení PSA v laser-mikrodisekovaných buňkách

Human Pathology (2008) 39, 1474–1482



ELSEVIER

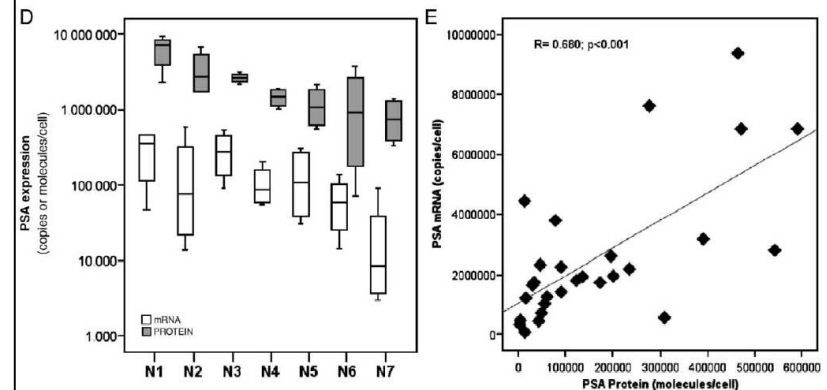
Human
PATHOLOGY

www.elsevier.com/locate/humpath

Original contribution

Prostate-specific antigen mRNA and protein levels in laser microdissected cells of human prostate measured by real-time reverse transcriptase–quantitative polymerase chain reaction and immuno–quantitative polymerase chain reaction

Pamela Pinzani PhD^a, Kristina Lind PhD^{b,d}, Francesca Malentacchi Gabriella Nesi MD^c, Francesca Salvianti PhD^a, Donata Villari MD^f, Mikael Kubista PhD^{d,e}, Mario Pazzagli PhD^a, Claudio Orlando PhD^a

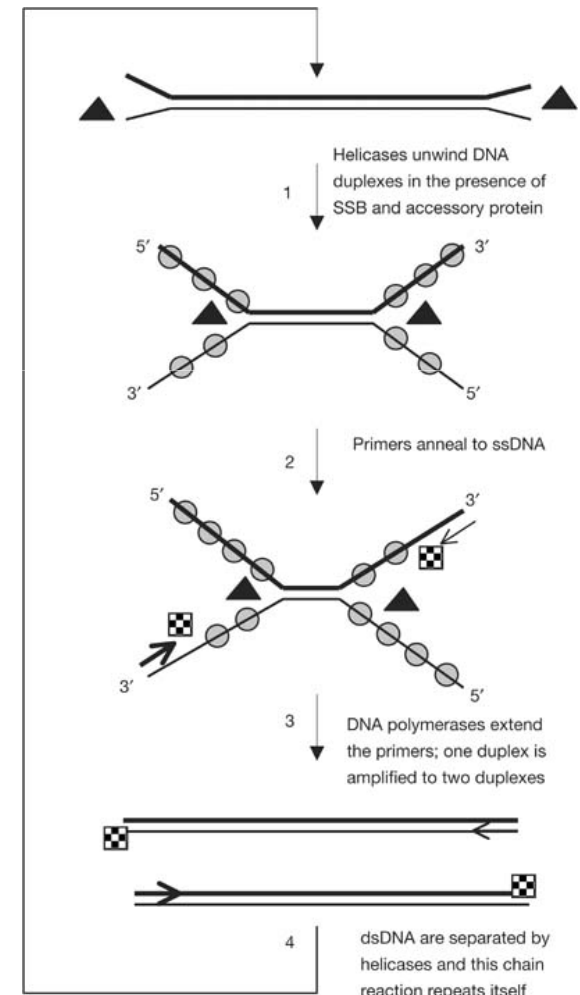
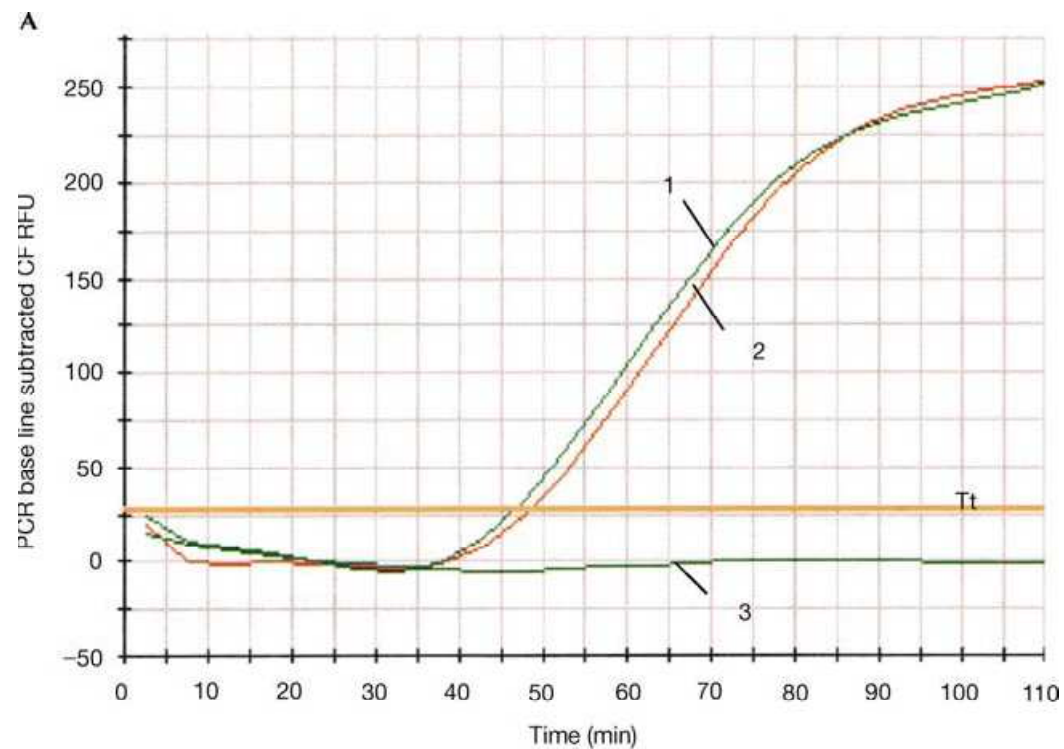


Aplikace

Amplifikace DNA bez PCR?

Helicase-dependent isothermal DNA amplification

1. dsDNA je denaturována pomocí helikáz a SSB proteinů
2. Primery hybridizují ke komplementární sekvenci
3. Polymeráza doplní ssDNA na dsDNA, která slouží jako substrát helikázám

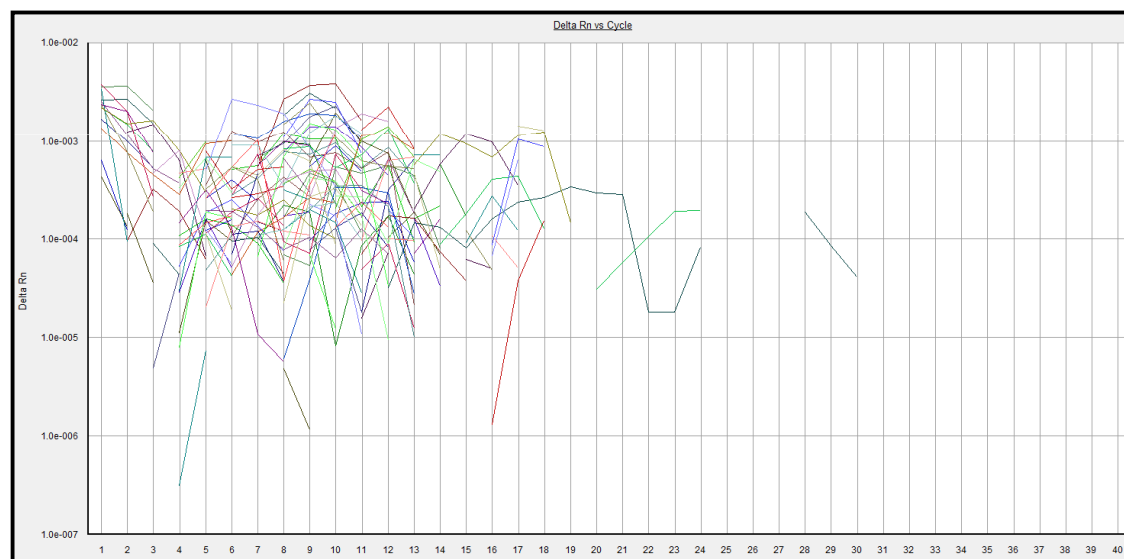


Aplikace

Po dnešní přednášce:

- Máte představu o základních aplikacích qRT-PCR
 - genová exprese, SNP, analýza miRNA, High resolution melting analysis, ImmunoPCR

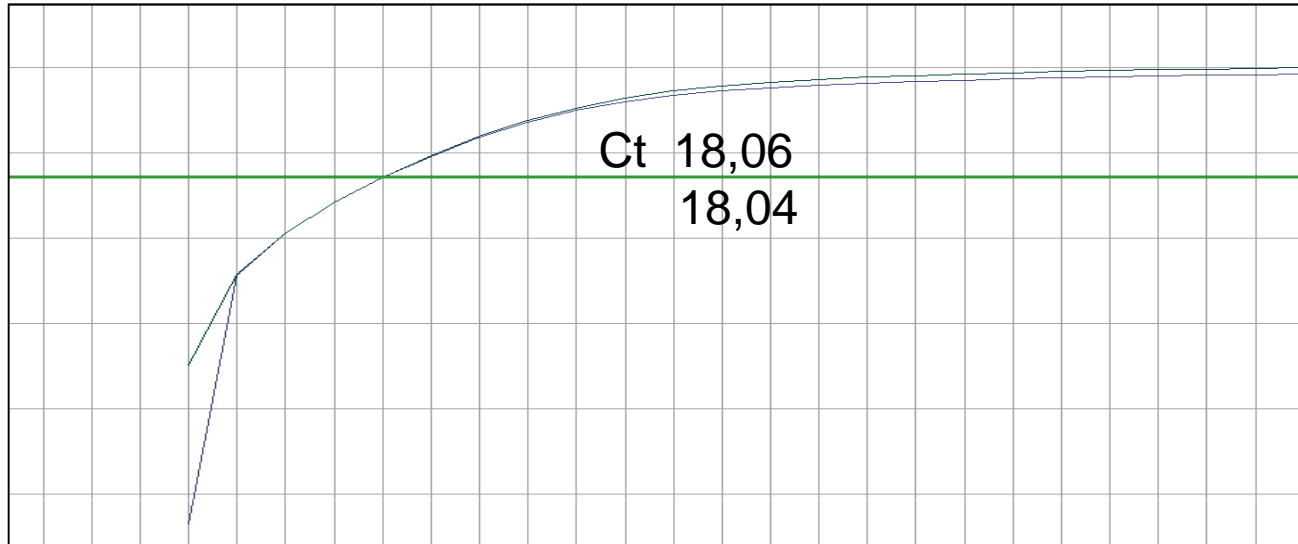
ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



VII. Troubleshooting

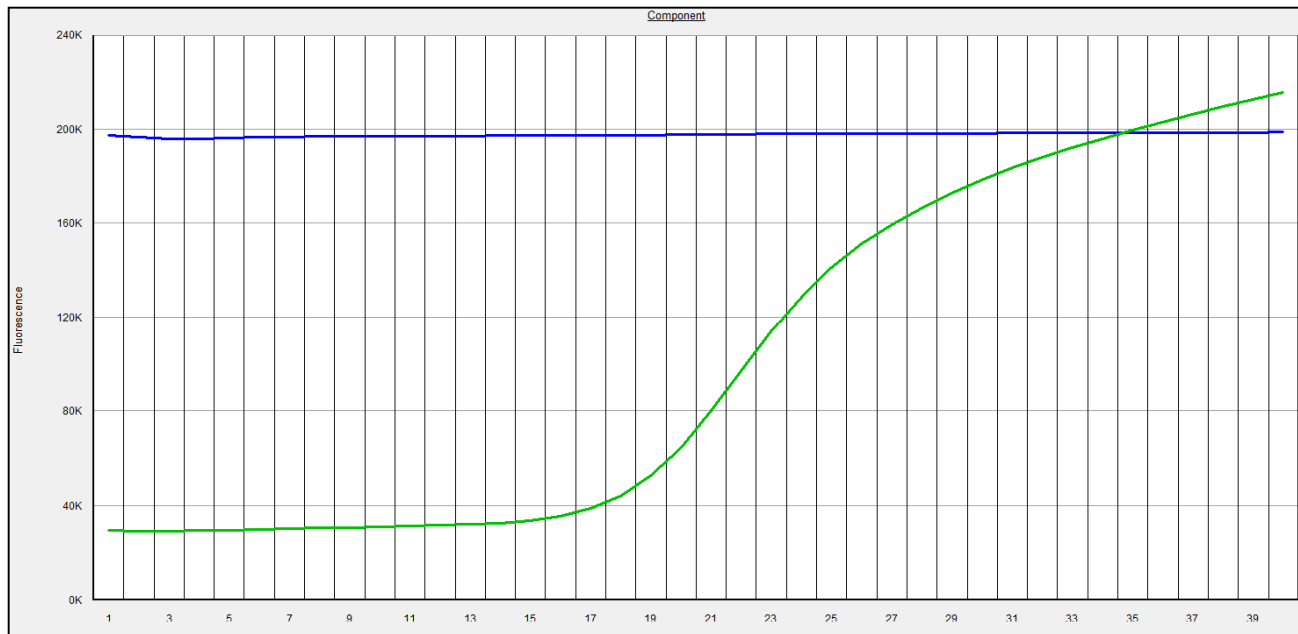
Problémy v qRT-PCR analýze

Jak vypadá správný amplifikační výstup?



Duplikátní reakce

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



Problémy v qRT-PCR analýze

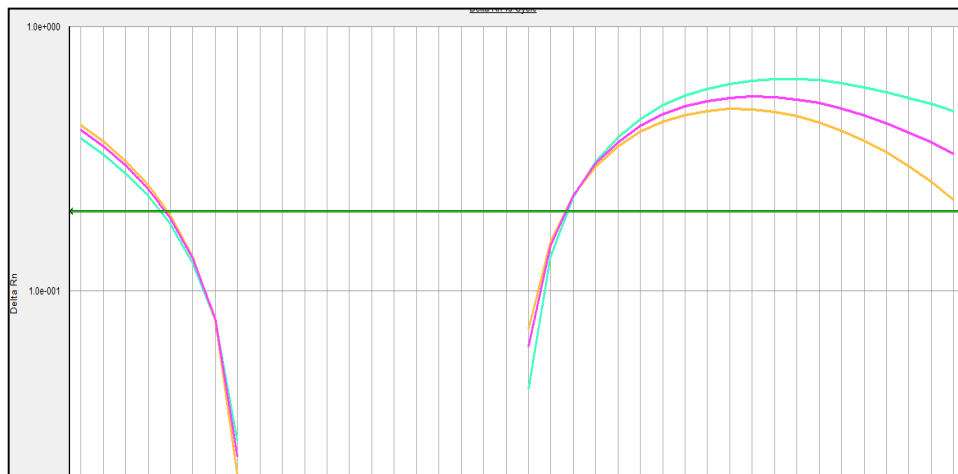
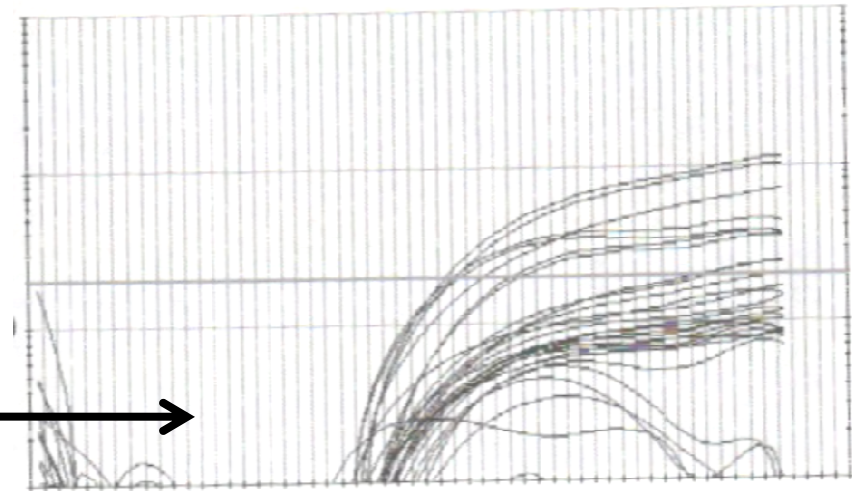
Problém 1:

Příliš mnoho templátu

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

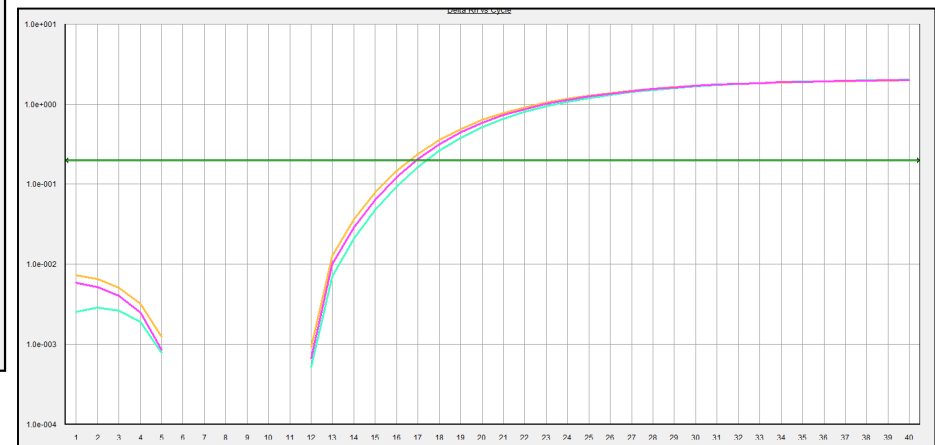
Řešení:

- 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

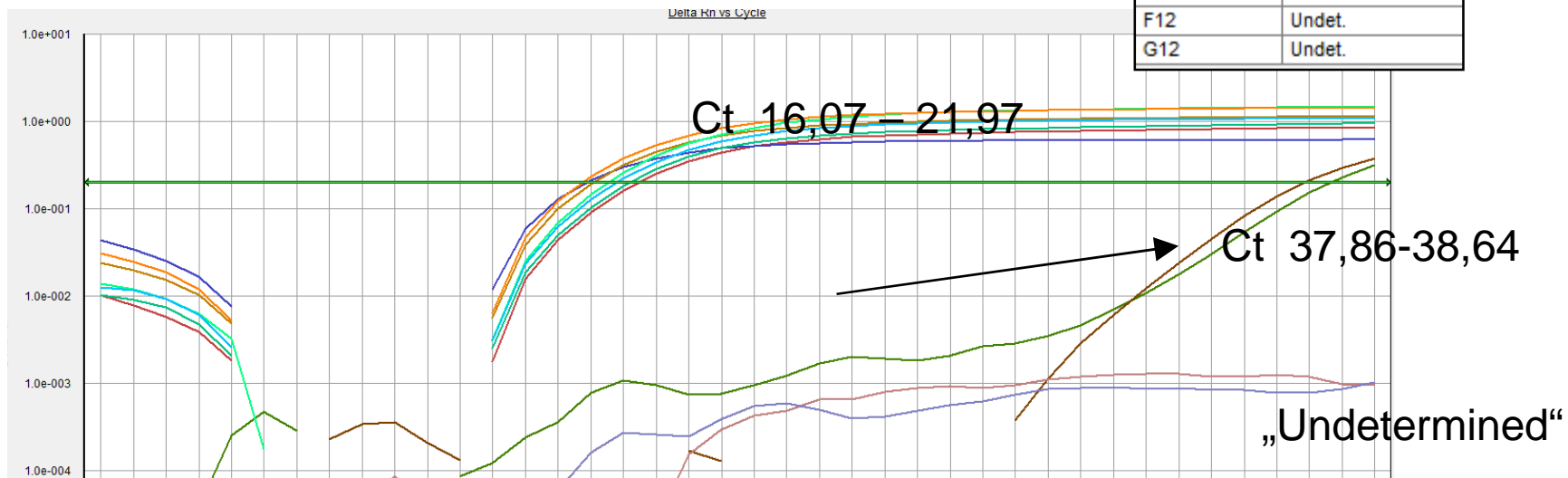
Problém 2:

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

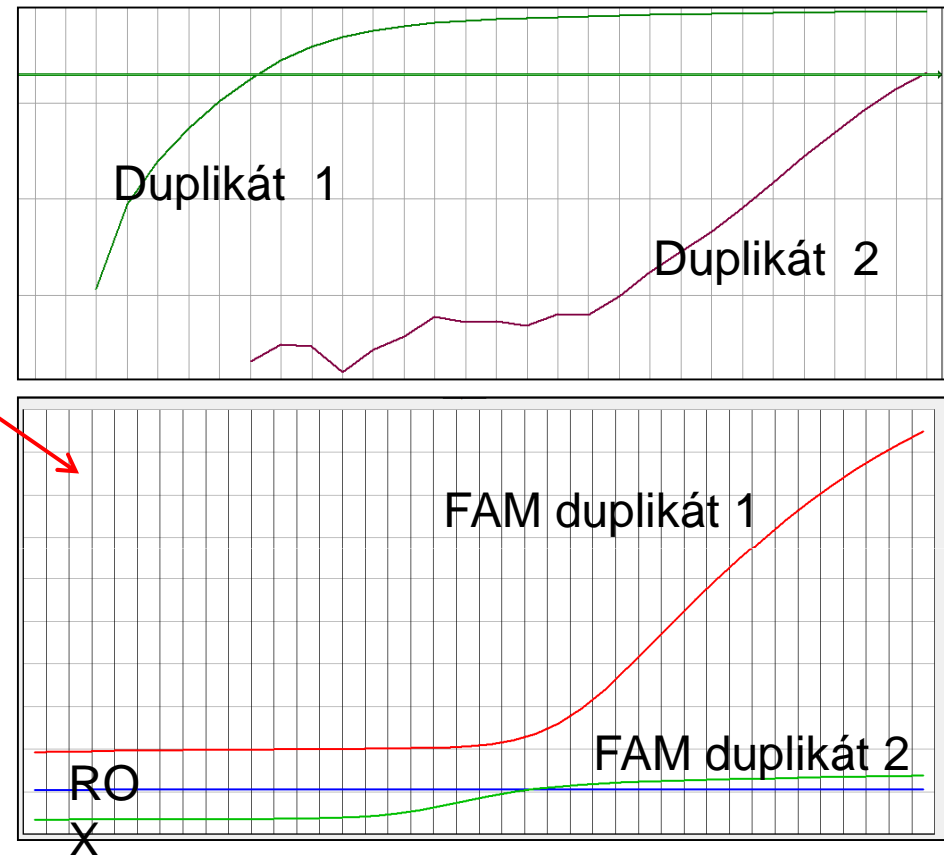
Problém 3:

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.)



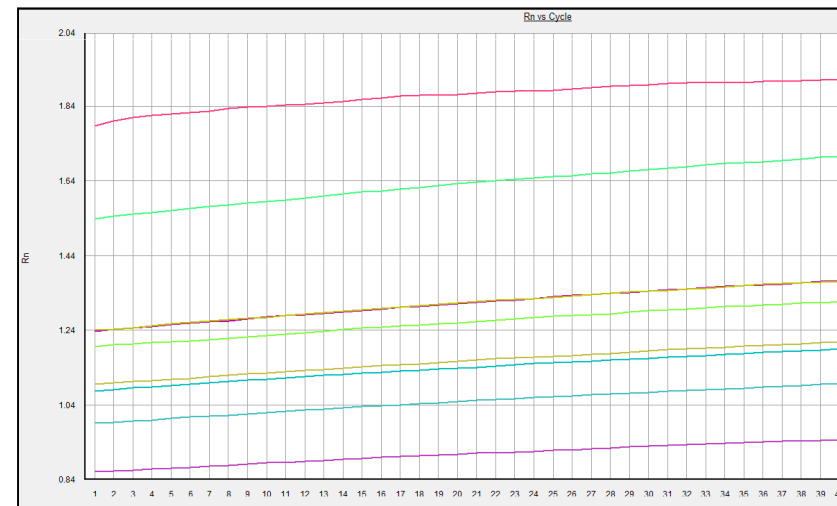
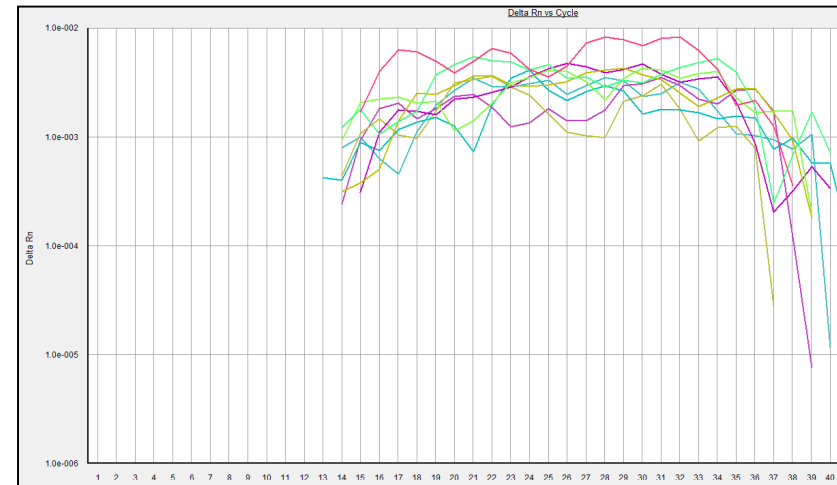
Problémy v qRT-PCR analýze

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:

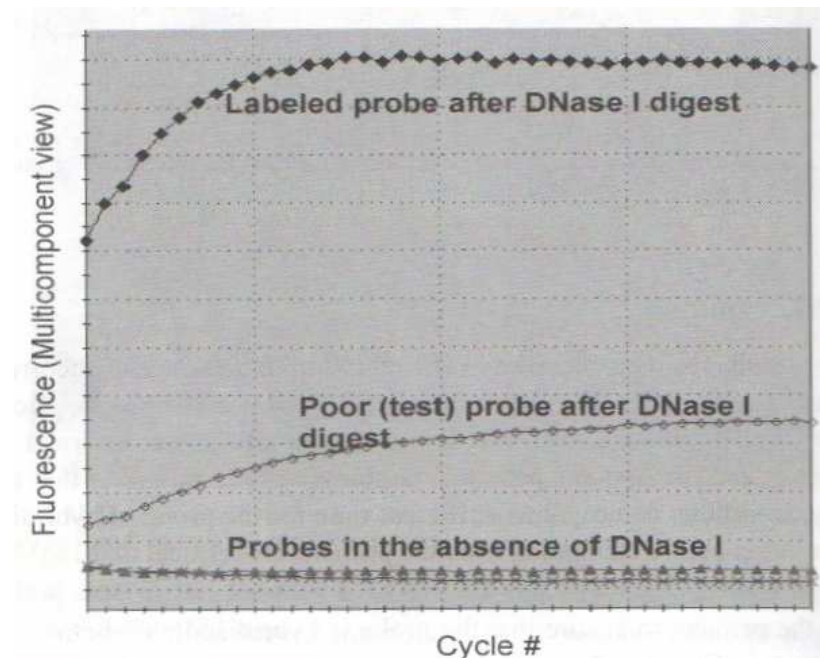
Nefunguje sonda

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**

DNázaI

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



Problémy v qRT-PCR analýze

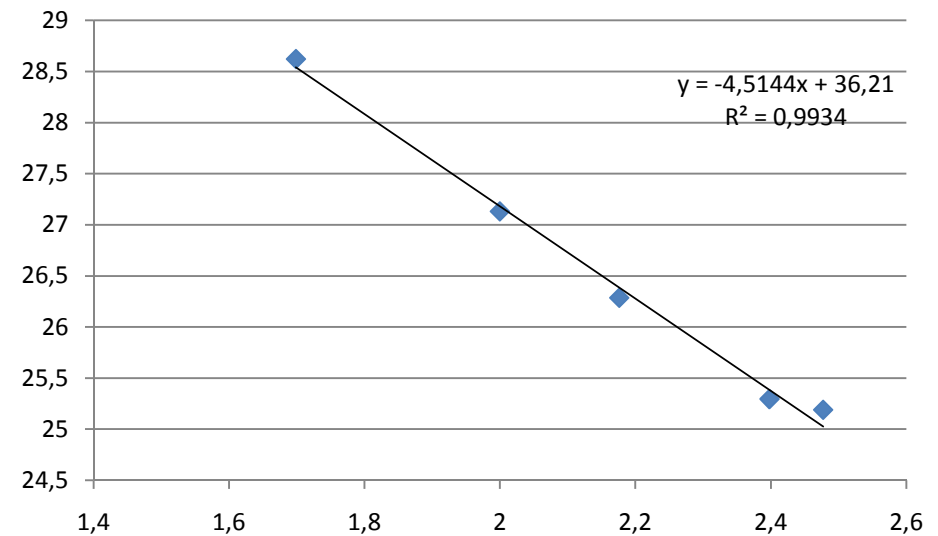
Problém 6:

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

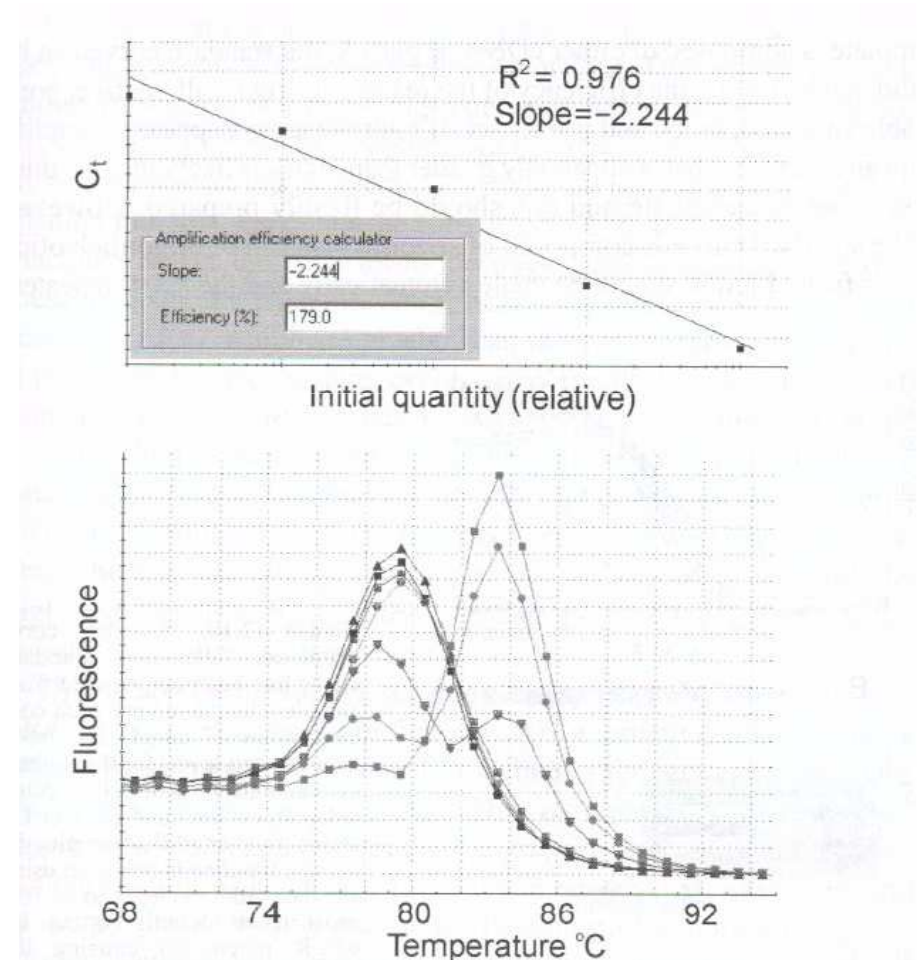
Problém 7:

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

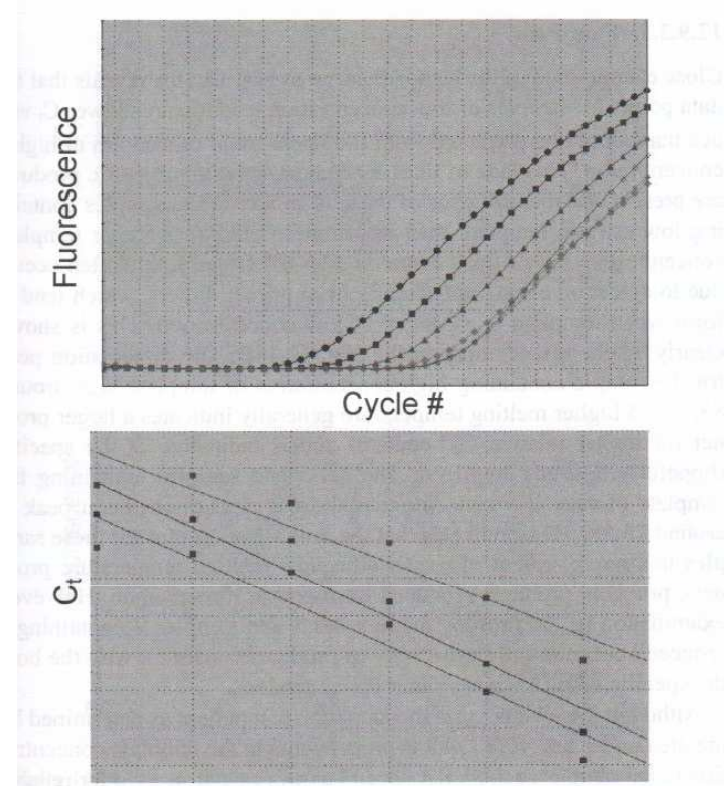
Problém 8:

Nelze naředit standardy na nižší koncentraci

- Přítomnost kontaminující DNA

Řešení:

- nové standardy
- ověřit čistotu RNA vstupující do procesu



Problémy v qRT-PCR analýze

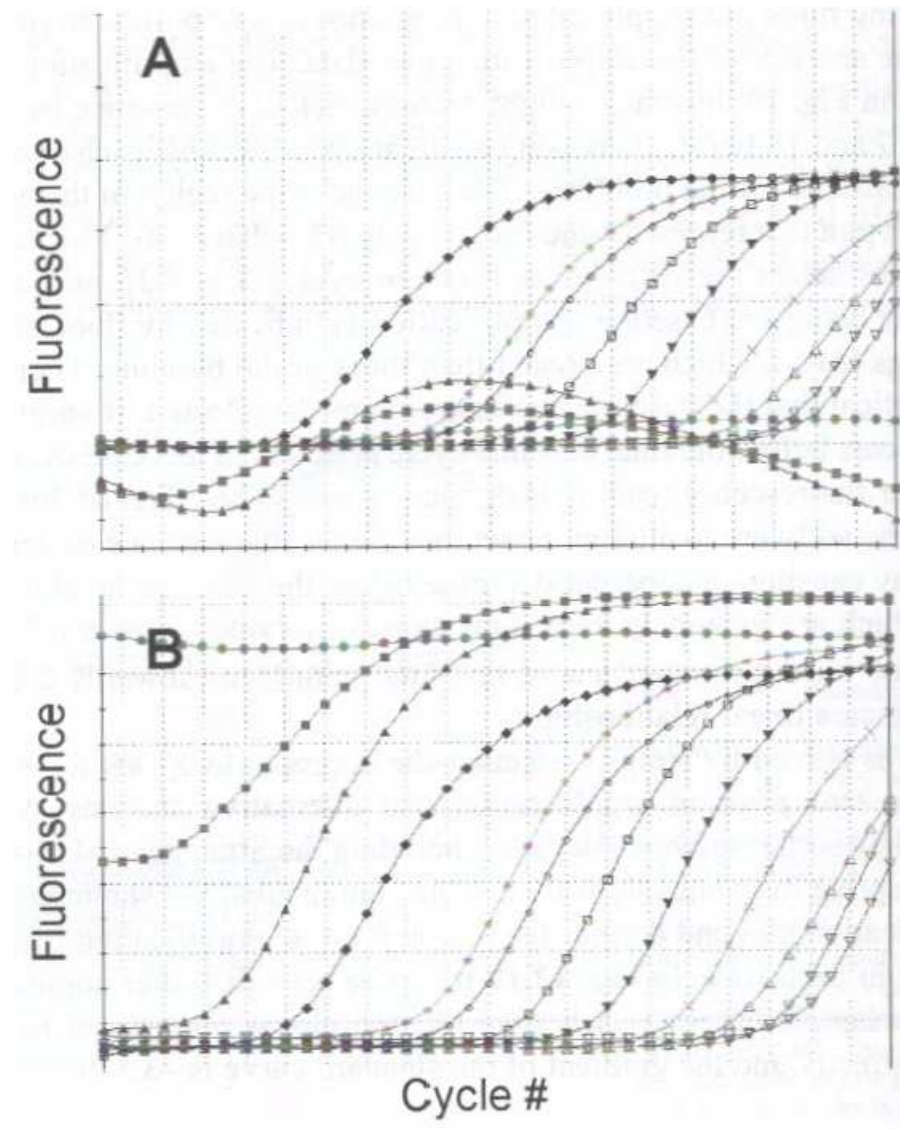
Problém 9:

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

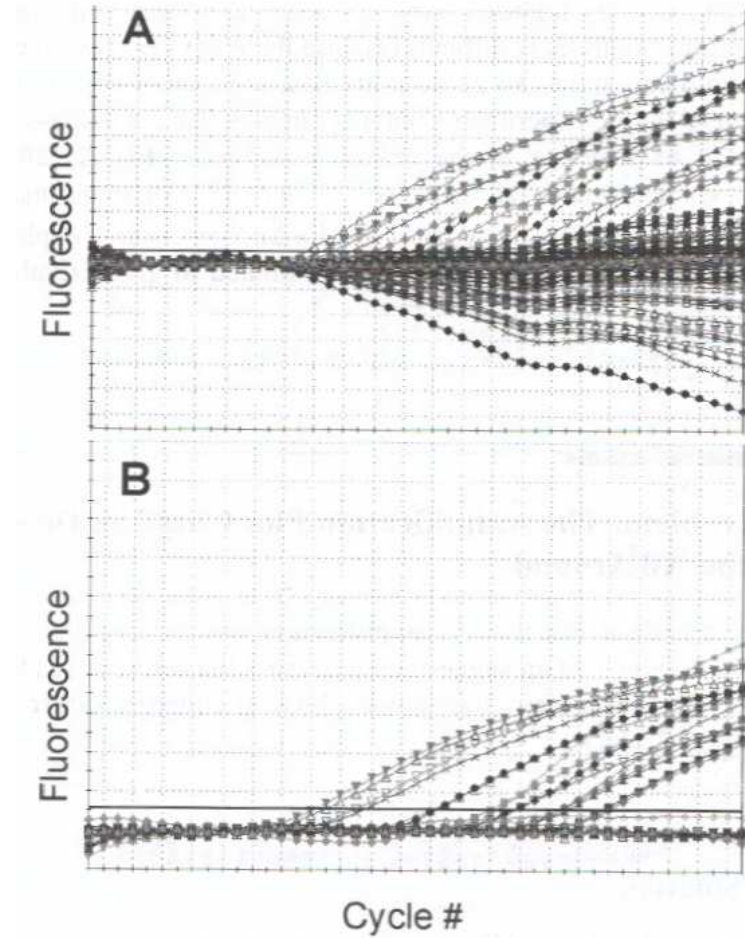


Problémy v qRT-PCR analýze

Problém 9:

Amplifikační grafy vypadají divně

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



Problémy v qRT-PCR analýze

Shrnutí:

- Jak má vypadat správný průběh real-time PCR?
- Jak nemají vypadat výstupy?
- Kdy nevěřit svým datům a jak je ověřit?
- Jak vyřešit některé běžné problémy s amplifikací?

Cvičení:

4.1. - 7.1.2010	(Petr Vaňhara)
11.1. - 14.1. 2010	(Sabina Ševčíková)
18.1. - 21.1. 2010	(Zdeněk Ručka)

Test:

Na konci cvičení (7.1., 14.1., 21.1.2010)
Výběr možností (vždy 1 správná) + příklady
Min. 75%



Merry Christmas

KONEC

Jizzy '07