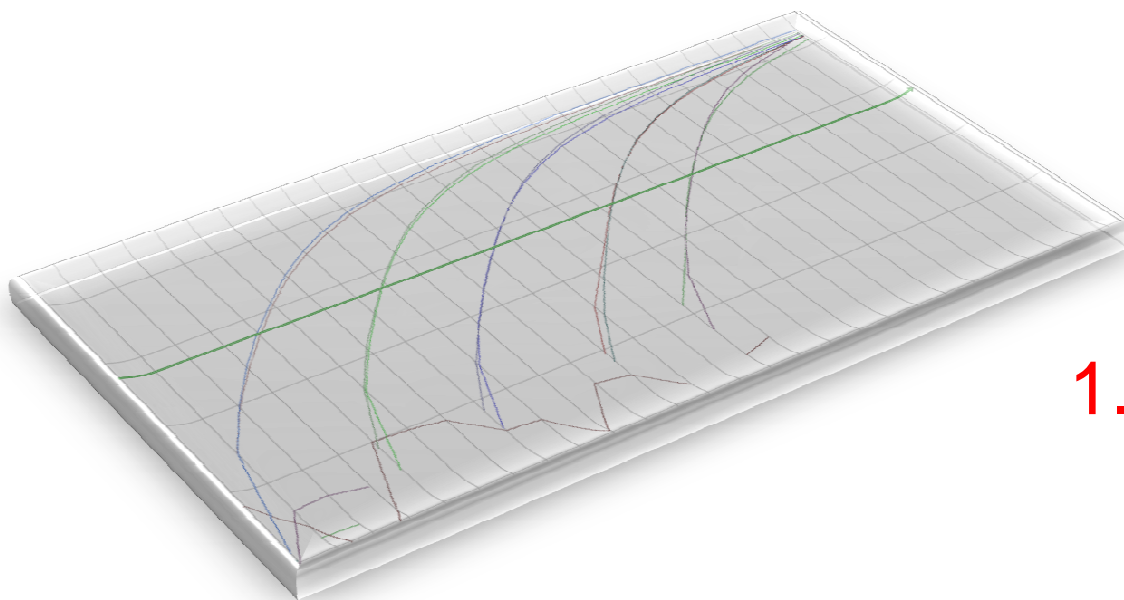


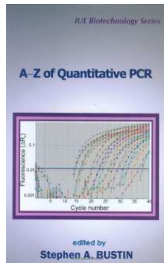
# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



## 1. Úvod do teorie PCR



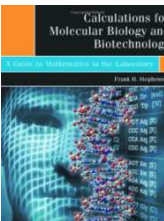
<http://www.gene-quantification.info/>



- Bustin SA: A-Z of quantitative PCR. IUL Biotechnology Series, Vol. 5, La Jolla, California, 2004-2006



- Dorak T: Real Time PCR. BIOS Advanced Methods, Taylor & Francis Group, NY, 2007




- Stephenson FH. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory. Academic Press 2003.



- Pfaffl MW. Methods (in Enzymology), The ongoing Evolution of qPCR. 50(4), 2010

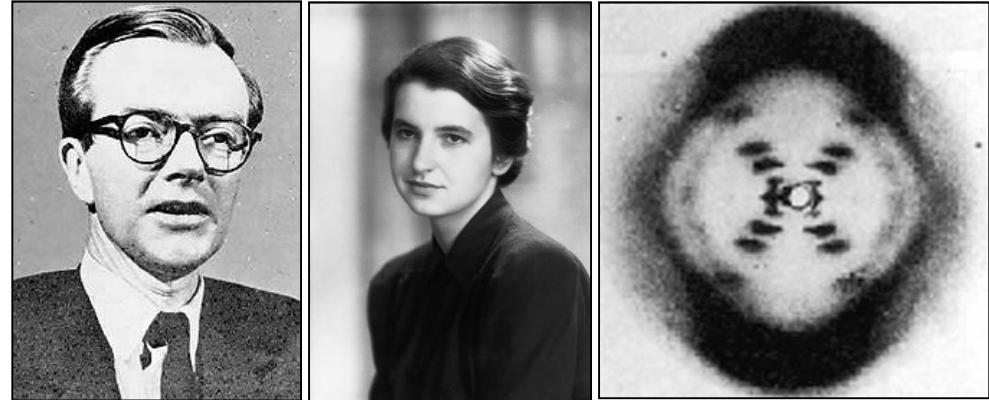
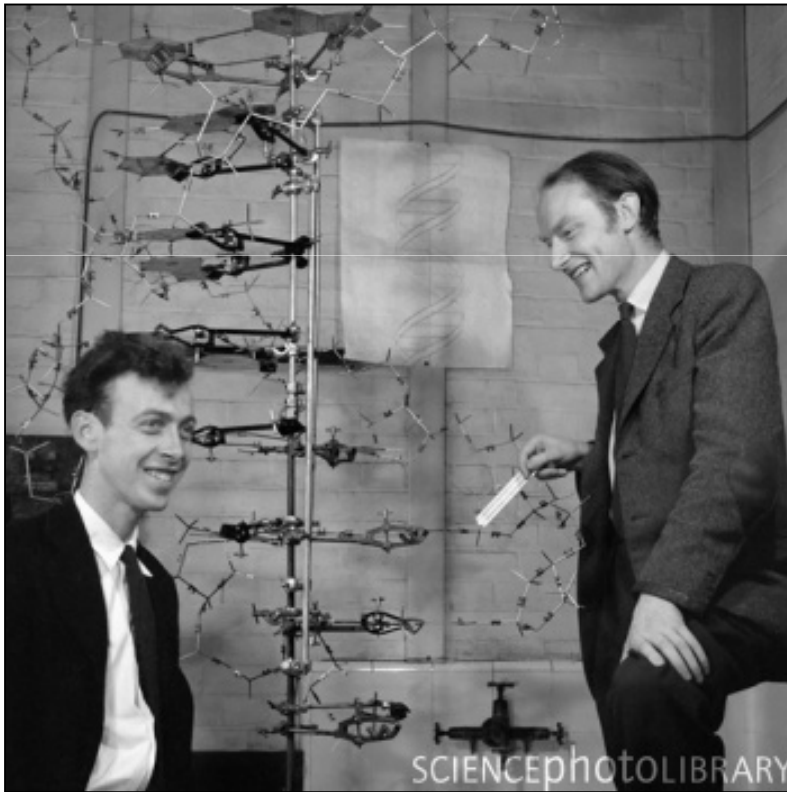
## Molekulární technologie

1952	Elektroforéza
1967	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rekombinantní DNA</li> <li>• Objev DNA ligázy</li> </ul>
1969	FISH
1970	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Restrikční endonukleázy</li> <li>• Reverzní transkriptáza</li> </ul>
1972	Klonování
1973	In vitro konstrukce bakteriálního plazmidu
1975	Southern blot
1977	Sekvenování DNA
1980	Koncept RFLP
1981	Western blotting
1982	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manipulace s genomem Drosophily – P elementy</li> <li>• Whole genome shotgun</li> </ul>

1984	Pulzní gelová elektroforéza
1985	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PCR</b></li> <li>• DNA fingertyping</li> </ul>
1987	<ul style="list-style-type: none"> <li>• YACs</li> <li>• Místně cílená mutagenese</li> </ul>
1988	Taq Polymeráza ChIP
1990	BLAST
1992	BACs
1995	Microarrays
1998	RNAi
2002	UCSC Genome Browser
2003	DNA assembly programs
2004	Anotace genů – ENSEMBL
2005	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Projekt HapMap</li> <li>• Ligační sekvenování</li> </ul>
2006	Celogenomové metylační mapy
2007	miRNA
2009	Next Generation Sequencing

## What about DNA?

- Maurice Wilkins-James Watson-Francis Crick-Rosalin Franklin, 1953
- Nobelova cena Wilkins-Watson-Crick, 1962
- model dsDNA



King's College London

### Jakým způsobem bez použití PCR:

1. zjistíte, zda pacient nese nějakou, klinicky významnou, bodovou mutaci, která např. určuje jeho další léčbu?
2. zjistíte, který ze dvou genů je v nějaké tkáni (např. nádorové) exprimován více než druhý ?
3. stanovíte druh patogenní bakterie ve vzorcích z nemocného pacienta?
4. zastoupení leukemických buněk v krvi pacienta před a po léčbě?

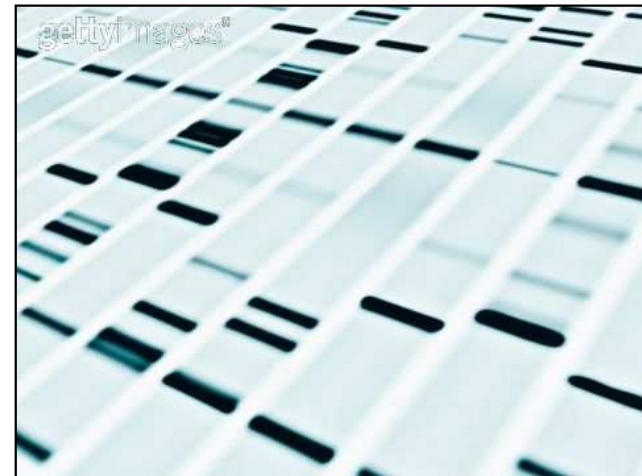


**Southern**

**Northern  
Flowcyt**

**Kultivace, biochemické analýzy**  
**PCR**

**Cytogenetické vyšetření**





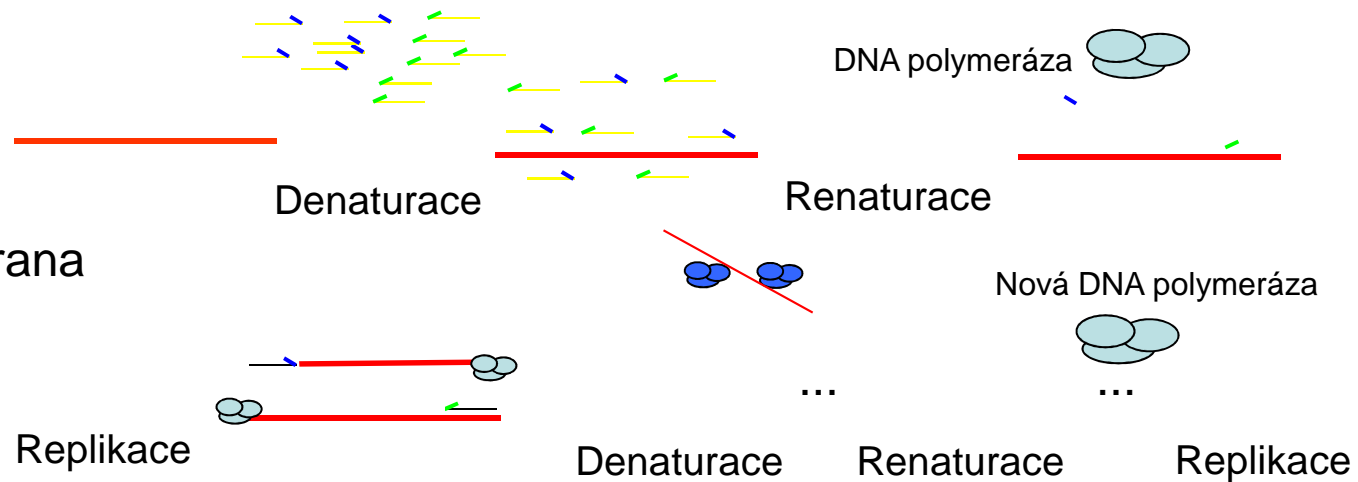
Kjell Kleppe



Har Gobind Khorana

## Studies on polynucleotides XCVL. Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases.

Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. (1971): J.Mol.Biol.56,341-361.



Práce popsala některé parametry reparativní replikace – účinnost replikace, minimální délky primerů a templátu, sekundární struktury atd.

**Proč se nerozšířila tato metoda už v 70.letech?**

Extrémně nákladná syntéza oligonukleotidů, nedokonalé sekvenování, termolabilita a nákladná purifikace DNA polymeráz, nedostupná instrumentace...

## Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

The logo for the journal Science, featuring the word "Science" in a red serif font and the acronym "AAAS" in a blue sans-serif font to its right.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Two new methods were used to establish a rapid and highly sensitive prenatal diagnostic test for sickle cell anemia. The first involves the primer-mediated enzymatic amplification of specific beta-globin target sequences in genomic DNA, resulting in the exponential increase (220,000 times) of target DNA copies. In the second technique, the presence of the beta A and beta S alleles is determined by restriction endonuclease digestion of an end-labeled oligonucleotide probe hybridized in solution to the amplified beta-globin sequences. The beta-globin genotype can be determined in less than 1 day on samples containing significantly less than 1 microgram of genomic DNA.

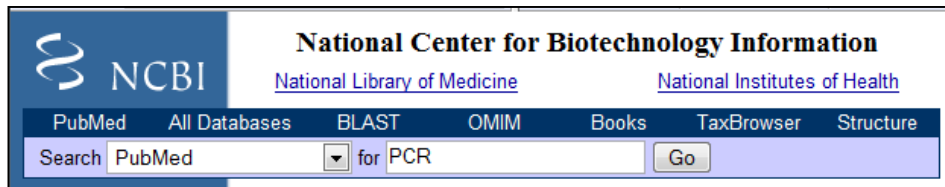
## Kary B. Mullis



Nobelova cena za chemii  
1993



- Použití termostabilní DNA polymerázy
- Rozvedení konceptu navrženého K. Kleppem
- Obrovský boom PCR díky technologickému pokroku



- 363 629 článků k 27.11.2008
- 399 022 k 1.12.2009

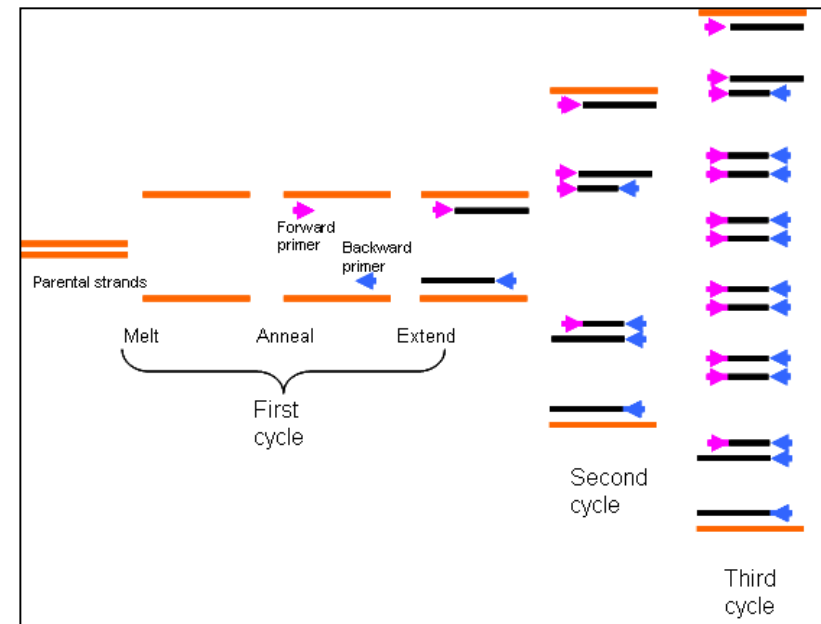
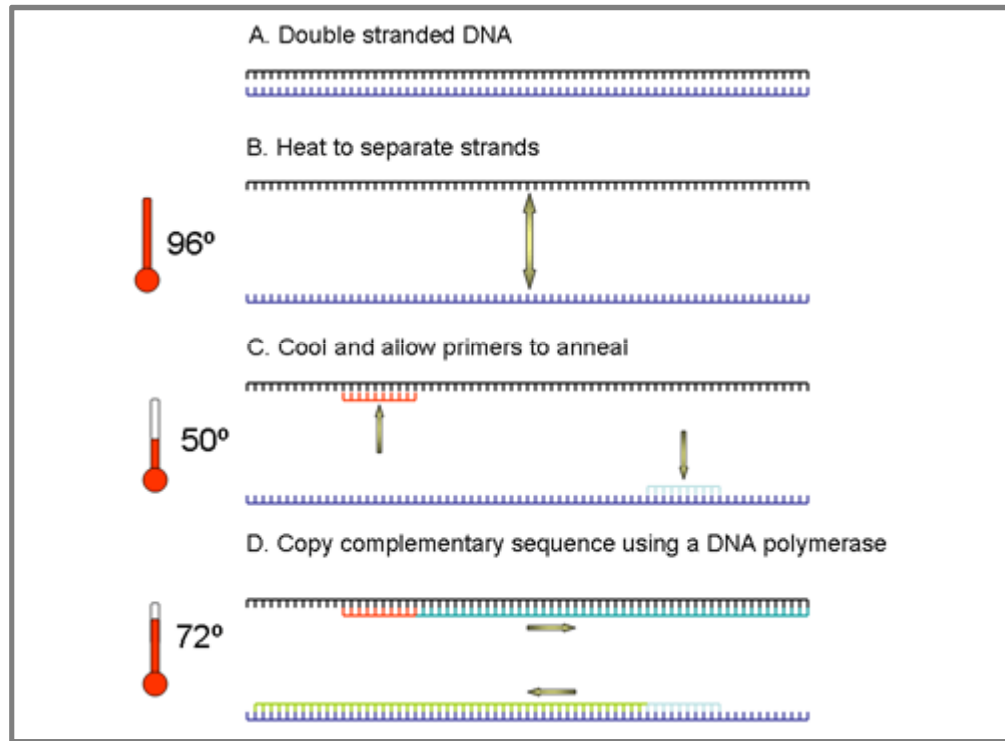




# PCR

Cyklické střídání fází denaturace, annealingu a extenze jednoduchou změnou teploty reakční směsi

Polymeráza využívá syntetické primery ohraničující amplifikovaný úsek DNA



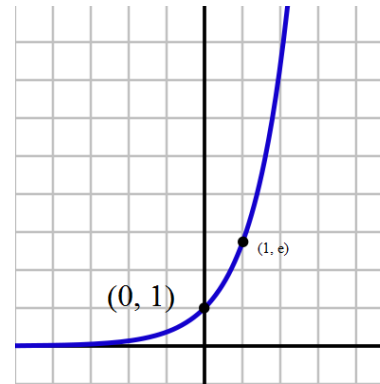
# PCR

Exponenciální proces

Amplikon, templát

Amplifikace  $(y) = N \times 2^n$

$N$ = počet molekul templátu,  $n$  počet cyklů PCR



Otázka:

1. Jedna molekula DNA je amplifikována v **25 cyklech**. Teoreticky, kolik molekul amplikonu ( $y$ ) je vytvořeno?
2. Počáteční množství molekul templátu je  **$N=600$** . Kolik molekul amplikonu je vytvořeno?
3. Reakce je provedena v  $100\mu\text{l}$ . Kolik molekul amplikonu bude přítomno v **1 nl** ( $0,001\mu\text{l}$ )?

Odpověď:

1.  $2^{25} = 33\,554\,432$
2.  $600 \times 2^{25} = 2 \times 10^{10}$
3.  $2 \times 10^{10}$  ve  $100\mu\text{l}$   
→ **v  $0,001\mu\text{l}$  bude  $2 \times 10^5$  (200 000) molekul amplikonu**

**KONTAMINACE JE PROBLÉM**

Jediná molekula DNA může způsobit velké problémy

(forenzní genetika, rutinní screening a diagnostika, GMO...)

## PCR

Otázka:

2 ng lidské genomové DNA byly použity jako templát pro PCR. Výsledkem je 100 ng DNA o délce 242bp. Jaká je míra amplifikace?

Odpověď:

1. Určení počtu kopií obsažených v daném množství DNA (2 ng genomové DNA; předpokládáme haploidní genom)

haploidní genom  $3 \times 10^9$   
průměrná MW báze: 660 g/mol

$$\rightarrow m = \frac{N}{N_a} M_w$$

$$m \text{ [g]} = \frac{3 \cdot 10^9 \cdot 660}{6,023 \cdot 10^{23}}$$

množství DNA obsahující jednu kopii:  $m \text{ [pg]} = 3,3 \text{ pg}$

počet kopií ve 2ng DNA: cca 600 (606)

## PCR

### 2. Určení hmotnosti 242bp. fragmentu

hmotnost (m) 242bp fragmentu:

$$m \text{ [pg]} = \frac{242 \times 660}{6,023 \cdot 10^{23}} \times 10^{12}$$

$$m \text{ [pg]} = 2,7 \times 10^{-7} \text{ pg}$$

počet kopií ve 100ng amplifikované DNA:

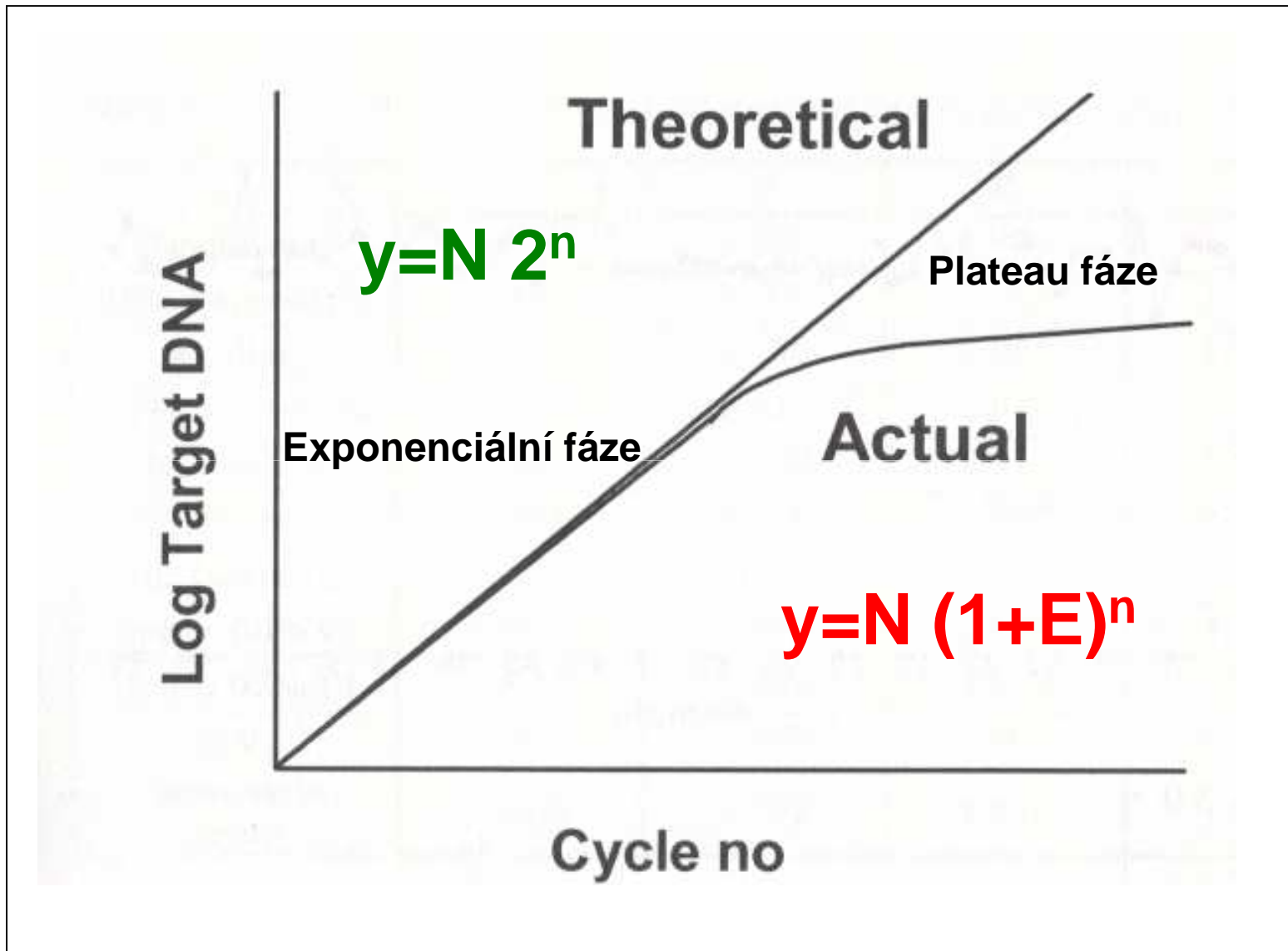
$$n = \frac{100 \text{ ng} \times 10^3}{2,7 \times 10^{-7} \text{ pg}} \quad m \text{ [pg]} = 3,7 \times 10^{11} \text{ kopií}$$

### 3. Určení míry amplifikace

$$y = \frac{3,7 \times 10^{11}}{600} = 6,2 \times 10^8$$

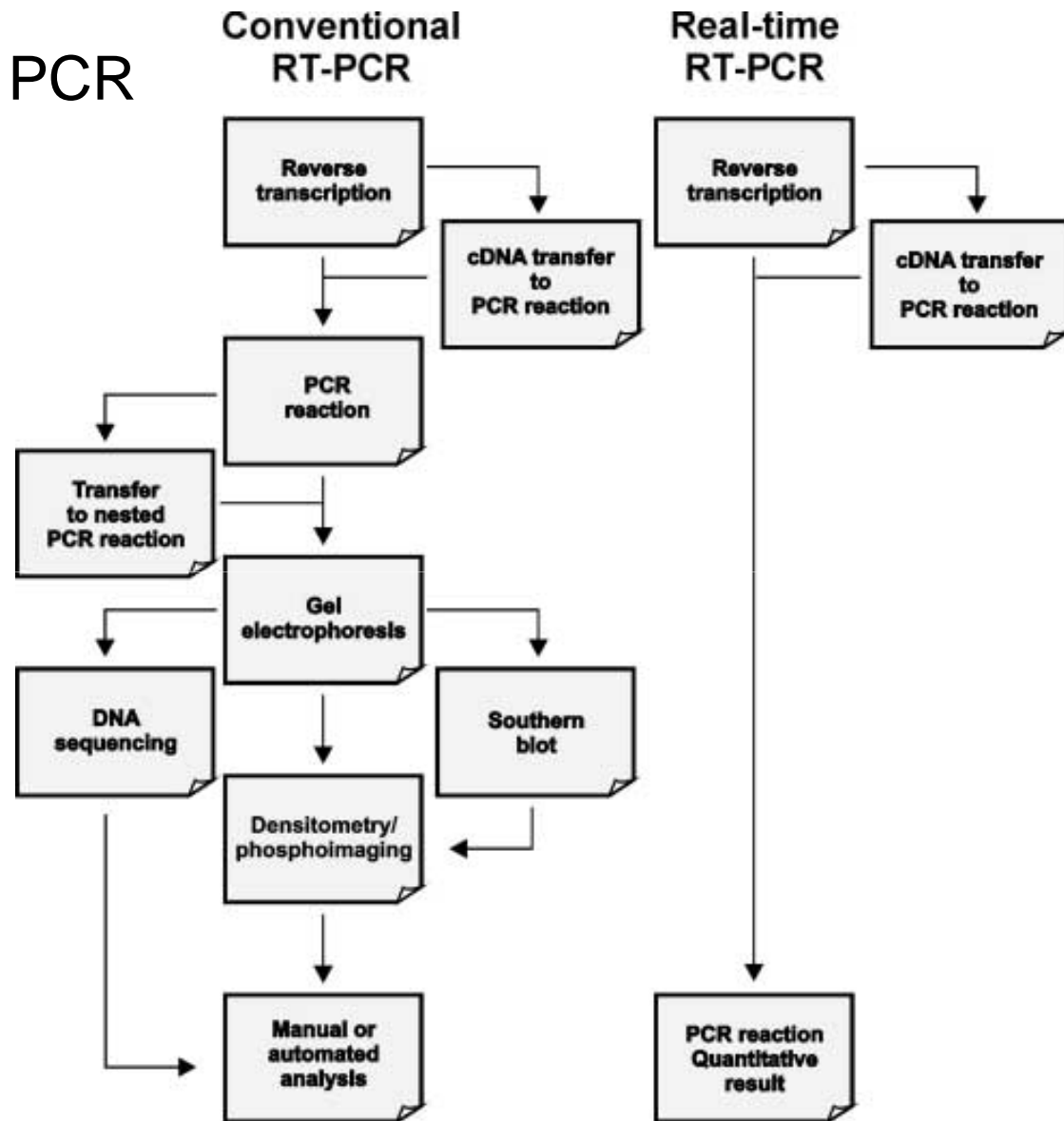
Bylo dosaženo  $6,2 \times 10^8$  nárůstu množství amplikonu

## Kinetika PCR reakce



# Kvantifikace pomocí PCR

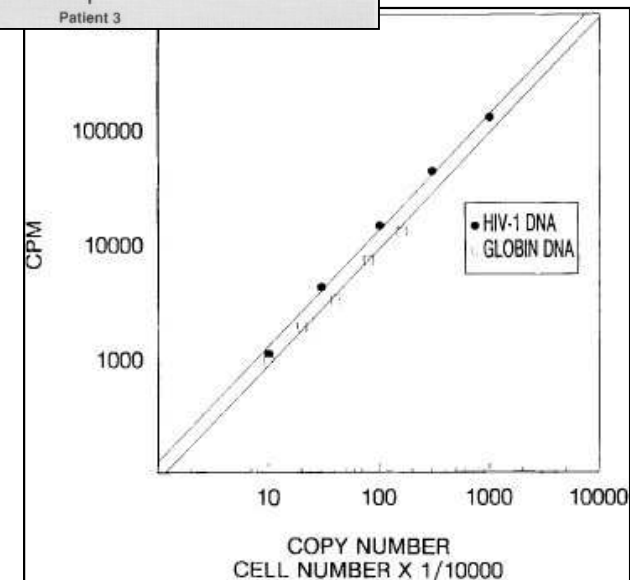
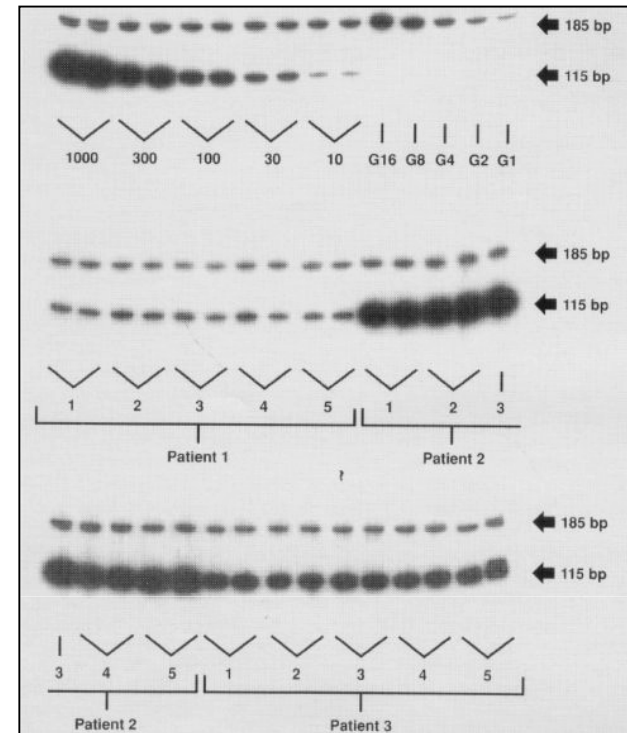
## Konvenční vs. Real-Time PCR



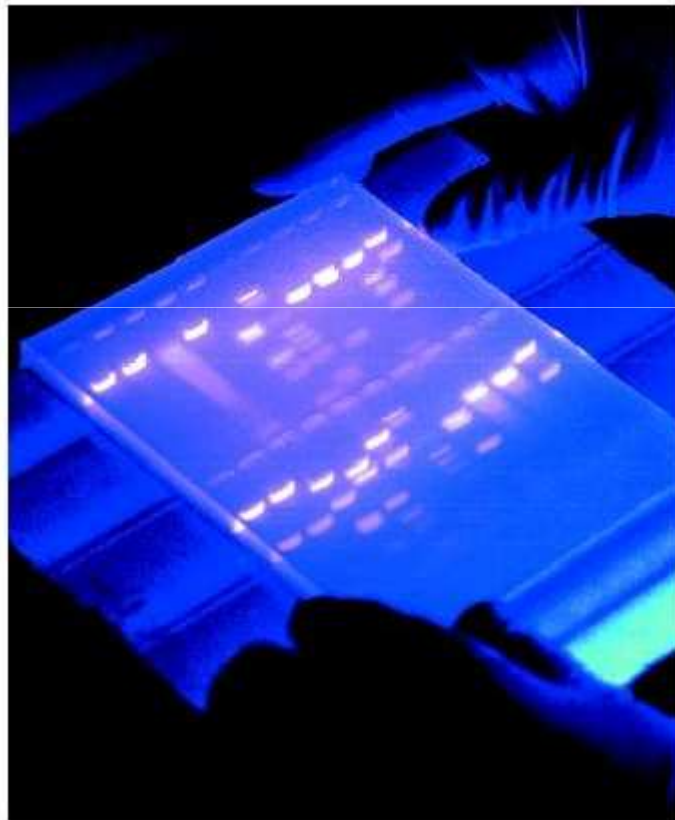
## Konvenční kvantitativní PCR

- „End point“ stanovení

- Kvalitativní odpověď YES/NO
- Extenzivní validace, kontroly
- Denzitometrie
- Minimální rozptyl v parametrech reakce má obrovský vliv na množství ampliconu
- Interní heterologní kontrola (housekeeping gene)
- Syntetický standard
- Kompetitivní PCR
- *Viral load* u HIV+ pacientů
- Výskyt minimální reziduální choroby u onkologických pacientů



## Zásadní omezení – gelová elektroforéza



- Nízká přesnost
- Nízká citlivost
- Malý dynamický rozsah – pouze 2log.
- Nízké rozlišení, založené pouze na délce amplikonu
- Není automatizovaná
- Výstup není numerický – subjektivní hodnocení
- EtBr – neváže se na DNA pravidelně
- Post PCR zpracování - kontaminace



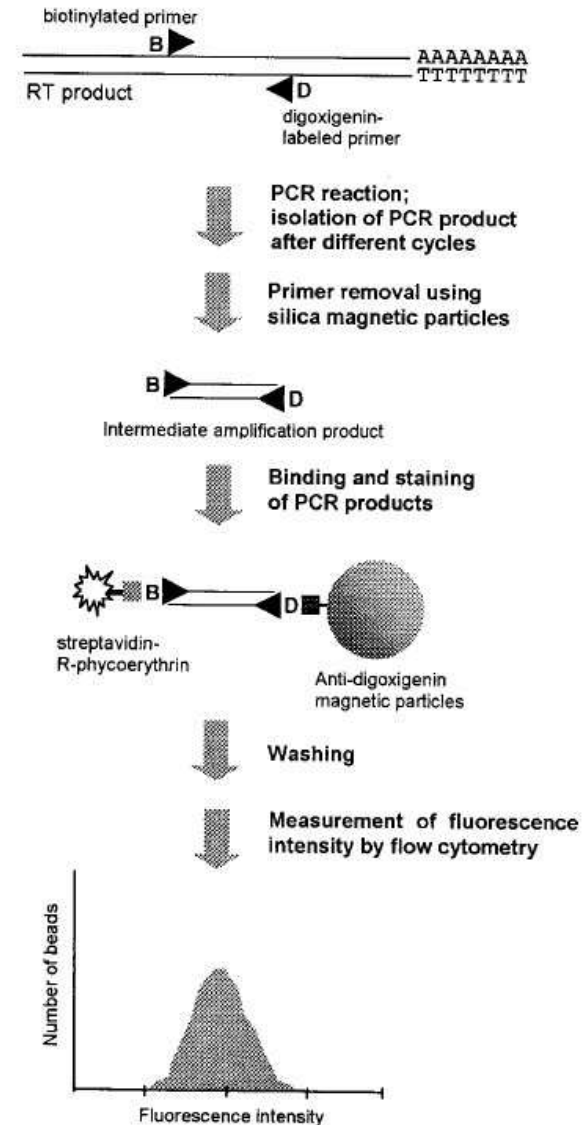
# Průtoková cytometrie

Clinical Chemistry 46:8  
1057-1064 (2000)

Molecular Diagnostics  
and Genetics

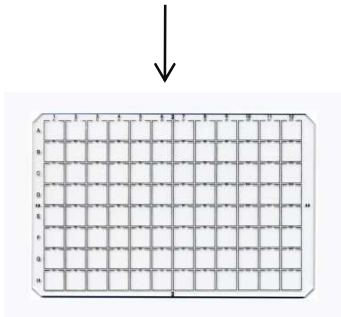
## Flow Cytometric Analysis of Reverse Transcription-PCR Products: Quantification of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and Proliferating Cell Nuclear Antigen mRNA

NIELS WEDEMEYER,\* WOLFGANG GÖHDE, and THOMAS PÖTTER

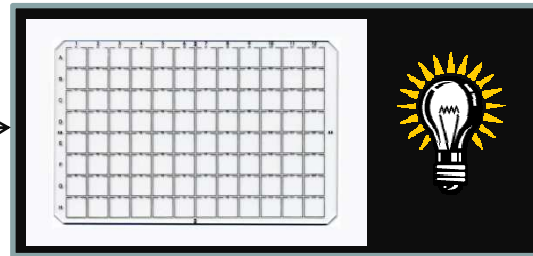


# Chemiluminiscence

PCR → DNA



Denaturace a hybridizace se specifickou sondou



Intenzita chemiluminiscenčního signálu v závislosti na množství amplifikované DNA

• Chemiluminiscence

PCR → Biotinylované primery → Biotinylovaný amplikon

Streptavidin + magnetické částice

Separace chemiluminiscence



# Fluorescence correlation spectroscopy

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
 Vol. 93, pp. 12805–12810, November 1996  
 Biochemistry

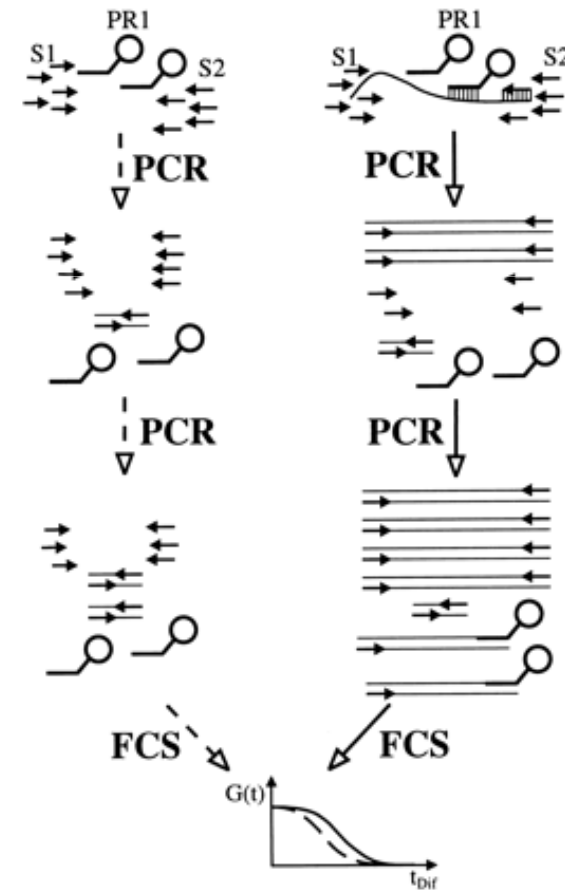
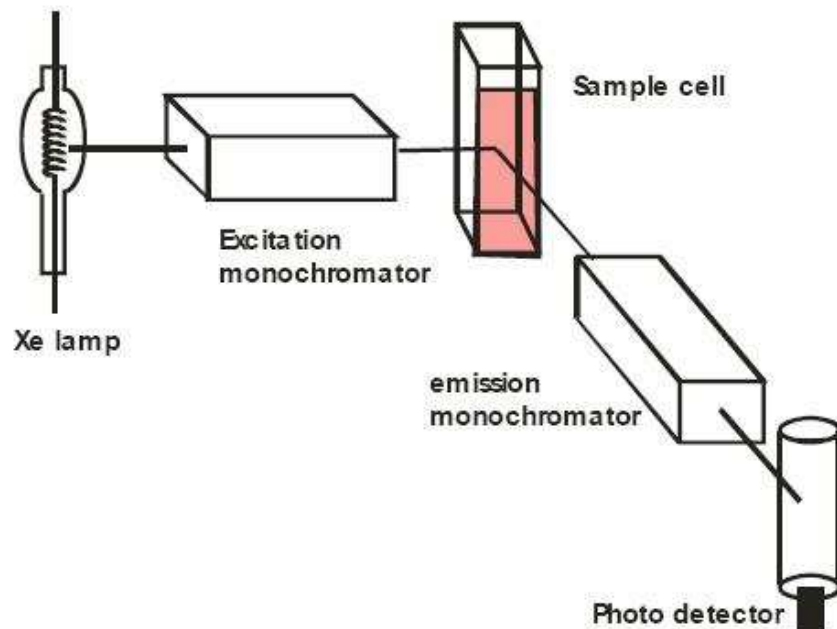
## Fluorescence correlation analysis of probe diffusion simplifies quantitative pathogen detection by PCR

(amplification/*Mycobacterium*/primer extension/tetramethylrhodamine/titration)

NILS G. WALTER\*, PETRA SCHWILLE, AND MANFRED EIGEN†

Department of Biochemical Kinetics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg, D-37077 Göttingen, Germany

Contributed by Manfred Eigen, August 26, 1996



## Real – time detekce amplifikace

# Real-time Fluorescence Based PCR

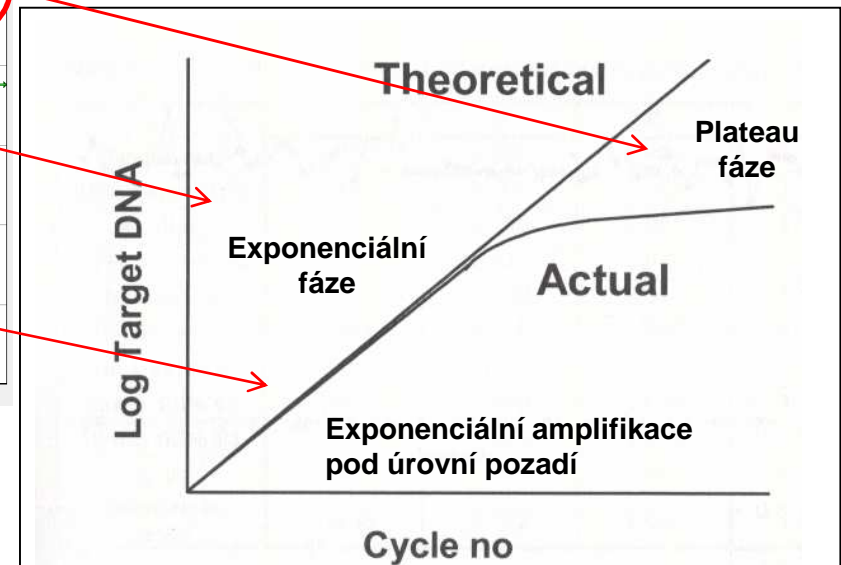
### Kvantitativní vztah mezi

Množstvím PCR produktu (amplikonu) a intenzitou fluorescence

- Amplifikační práh detekce (Ct)

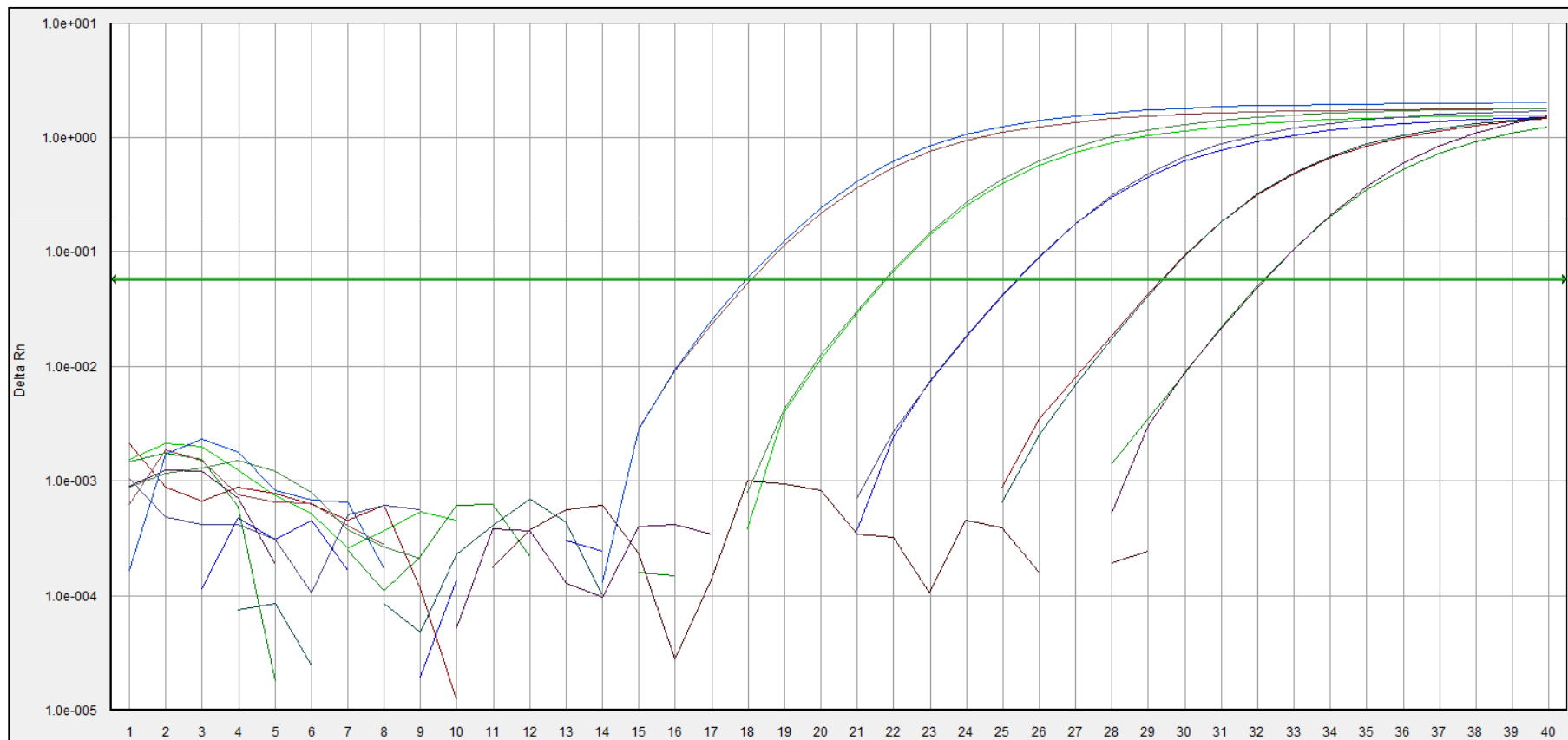


„end point“



### Real-time Fluorescence Based PCR

Fluorescence **R** je zajištěna např. vazbou fluorescenčního interkalačního barviva na DNA, použitím hydrolyzační sondy atd. Fluorescence reportérového fluoroforu je normalizována vůči pasivnímu fluoroforu (Rox) - **Rn**. Změnu fluorescence v čase vůči pozadí udává  $\Delta Rn$ . ( $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$ ).



### Reportérový fluorofor

Intenzita jeho fluorescence závisí na amplifikaci templátu během PCR

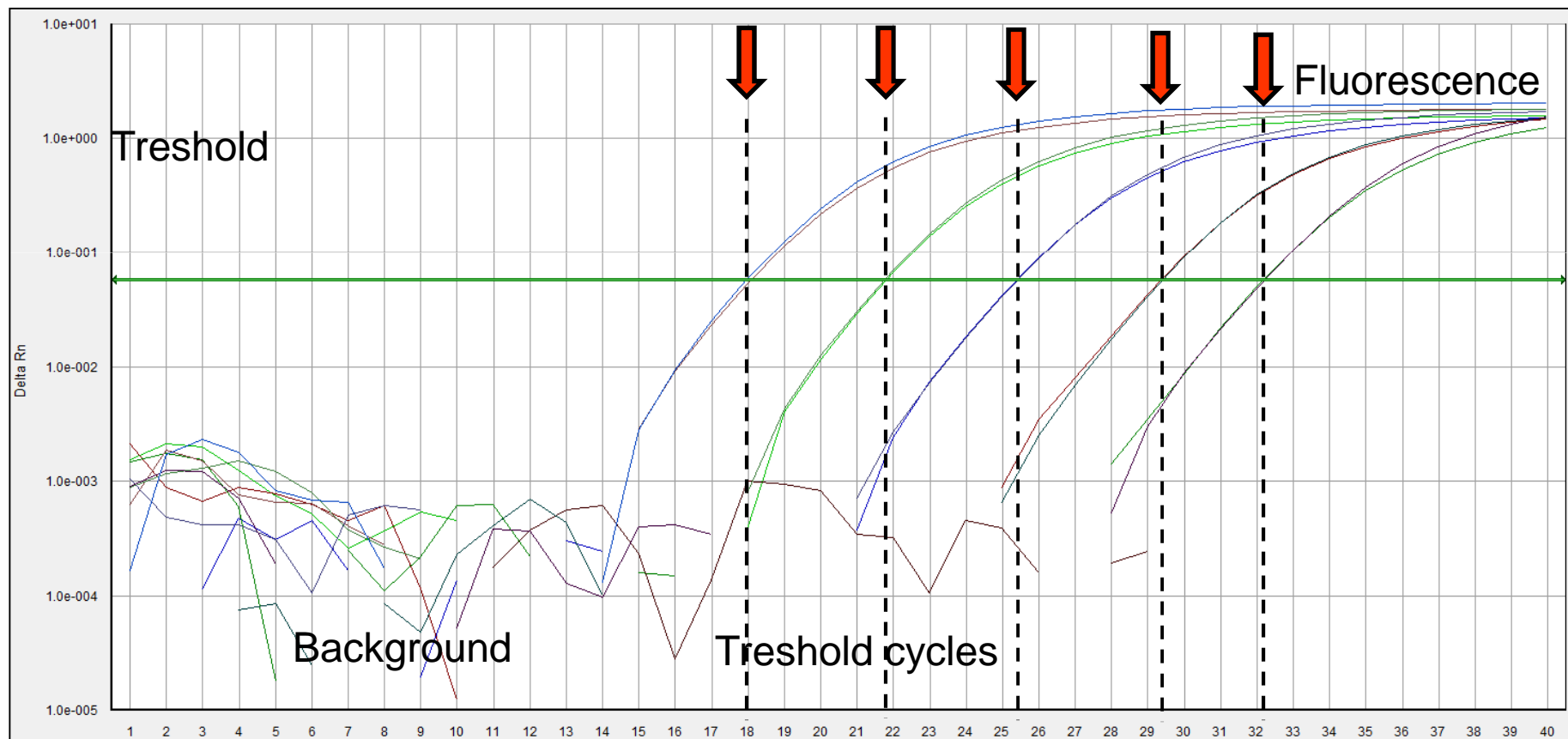
### Pasivní fluorofor

Intenzita jeho fluorescence je během PCR konstantní  
Zahrnutí fluorescence pasivního fluoroforu do výpočtu technicky  
zpřesňuje analýzu

## Real – time detekce amplifikace - Ct

### Threshold cycle „Ct“ („Cq“)

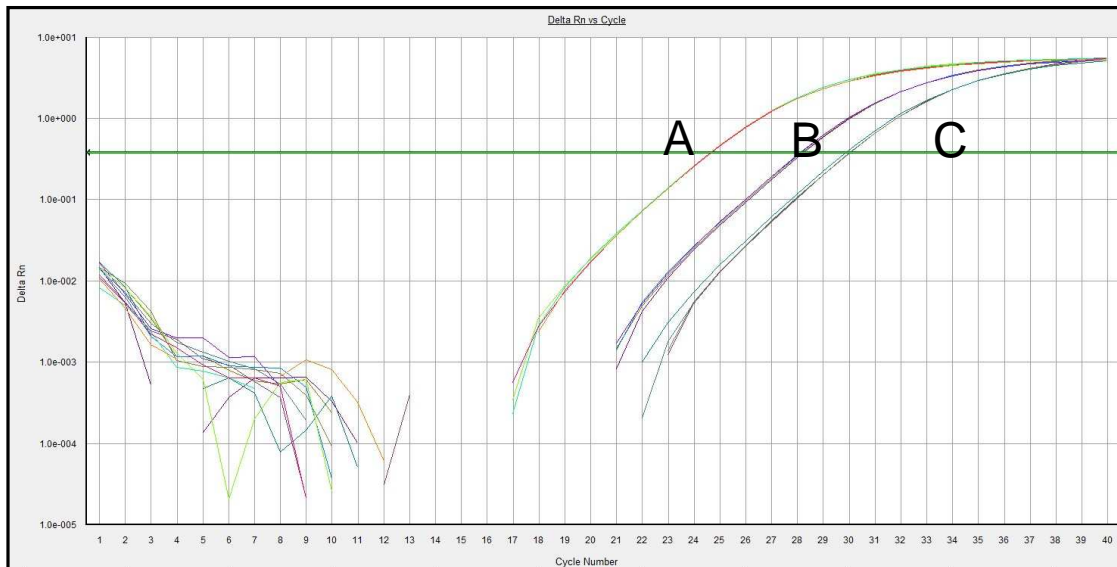
- určený na základě hodnoty fluorescence pozadí (background) a aktuální fluorescence vzorku
- kvantitativní výstup pro každý vzorek



## Real – time detekce amplifikace - Ct

### Treshold cycle „Ct“

- počáteční množství kopií templátu
- definovaný v exponenciální fázi PCR
- stejná účinnost PCR ve všech reakcích
- účinnost štěpení fluorogenní sondy nebo vazby fluoroforu na DNA
- citlivost detekce
- čím menší Ct tím větší počet kopií templátu na začátku reakce



A > B > C



## Real – time detekce amplifikace - Ct

### Treshold cycle „Ct“

- rozdíl 1 Ct – dvojnásobné množství templátu

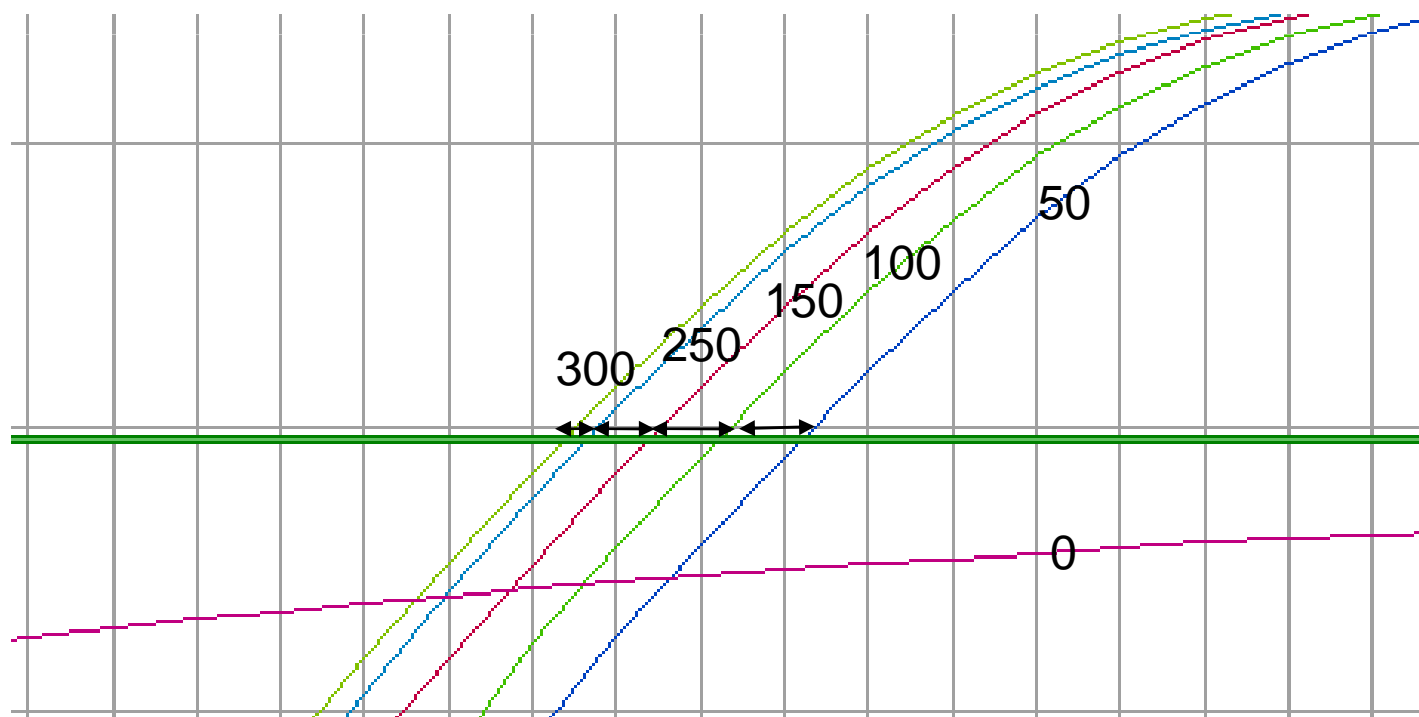
$$2^1 = 2$$

- kolika cyklům odpovídá odpovídá 10ti násobný rozdíl v množství templátu?

(předpokládáme 100% účinnost PCR)

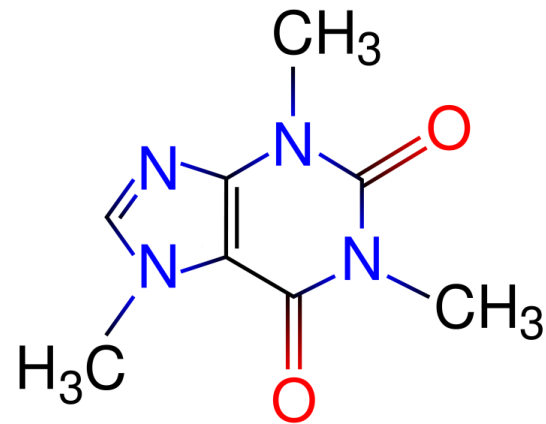
$$2^n = 10$$

$$n = \log_{10} / \log_2 = 3,32$$



c [ng/μl]	Ct
50	28,16
100	27,16
150	26,66
250	26,06
300	25,66

# Přestávka



(Kofein)

# Faktory ovlivňující qPCR

## Faktory ovlivňující qPCR

### Koncentrace $Mg^{II+}$ ( $Mn^{II+}$ )

- Kritický faktor pro DNA polymerázy

- Např. Tth ( <i>Thermus thermophilus</i> HB-8)	$Mn^{II+}$	(3-6mM)
Taq ( <i>Thermus aquaticus</i> )	$Mg^{II+}$	(3-4mM)

- Některé polymerázy preferují určitou formu  $Mg^{II+}$ , mimo  $MgCl_2$  např.  $MgSO_4$  nebo  $Mg(OAc)_2$

### Koncentrace primerů

- obvykle 100-900nM

- ne vždy poskytuje ekvimolární koncentrace nejlepší výsledek

### Koncentrace sondy

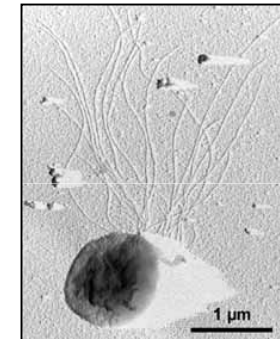
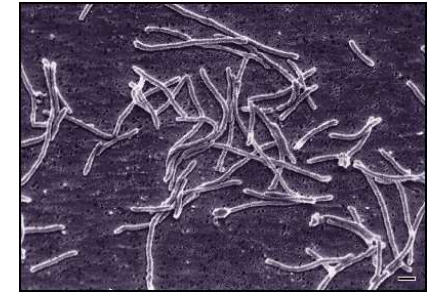
- obvykle 100-400nM

- volba sondy podle typu analýzy a žádaného výstupu (genová exprese, SNP, absolutní kvantifikace...)

## Faktory ovlivňující qPCR

### DNA polymerázy

- Vyžadují 3'OH primer
- Teplotní stabilita - nejvyšší katalytická účinnost mezi 70-80°C
- Výrazná ztráta aktivity při nižších teplotách
  - např. Taq při 37°C má pouze 10% své normální aktivity
- *Fidelity*, maximální amplifikovatelná délka ampliconu
- bakteriální Taq *Thermus aquaticus*
- nízká *fidelity* - absence 3' > 5' exonukleázové aktivity (proofreading)
- Archeální enzymy
  - *Thermococcus* sp. (*T. gorgonarius*, *litolaris*, *kodakaraensis*)
    - *Tgo*, *Vent*, *Pfx*
  - *Pyrococcus* sp. (*P. furiosus*)
    - *Pfu*, *Deep Vent*



### DNA polymerázy a PCR

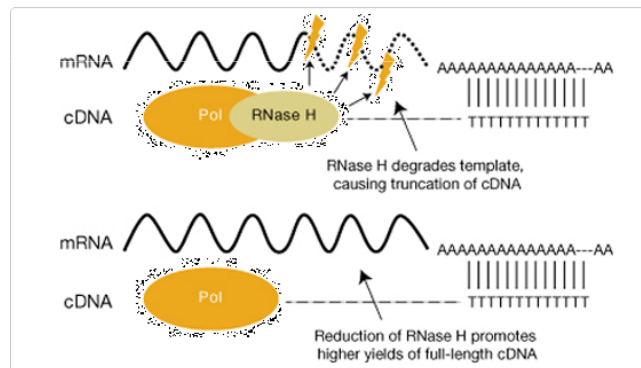
Jméno	3'>5' Exoaktivita	Zdroj	Poznámka
Taq	-	<i>Thermus aquaticus</i>	Poločas rozpadu v 95°C - 1,6 hod.
Pfu	+	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Nejmenší error-rate
Vent (Tli)	+	<i>Thermococcus litoralis</i>	Poločas rozpadu v 95°C - 7 hod.

- Zajištění 3' > 5' exonukleázové aktivity zvyšuje specifitu reakce
- Některé aplikace (TaqMan) vyžadují 5' > 3' exonukleázovou aktivitu polymerázy (odbourání sondy, in vivo RNA primerů při syntéze Okazakiho fragmentů), jiné aplikace (molekulární majáky, scorpions) naopak vyžadují polymerázy bez nukleázové aktivity

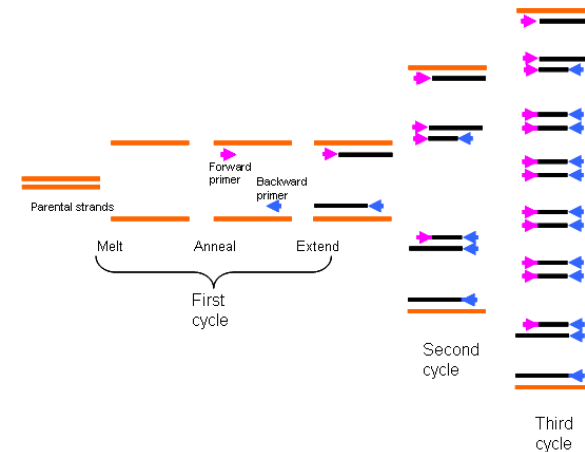
## RT PCR Reverse Transcription PCR

- dvě na sebe navazující enzymatické reakce

### Reverzní transkripce



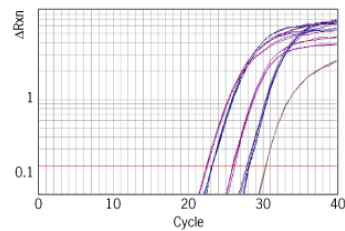
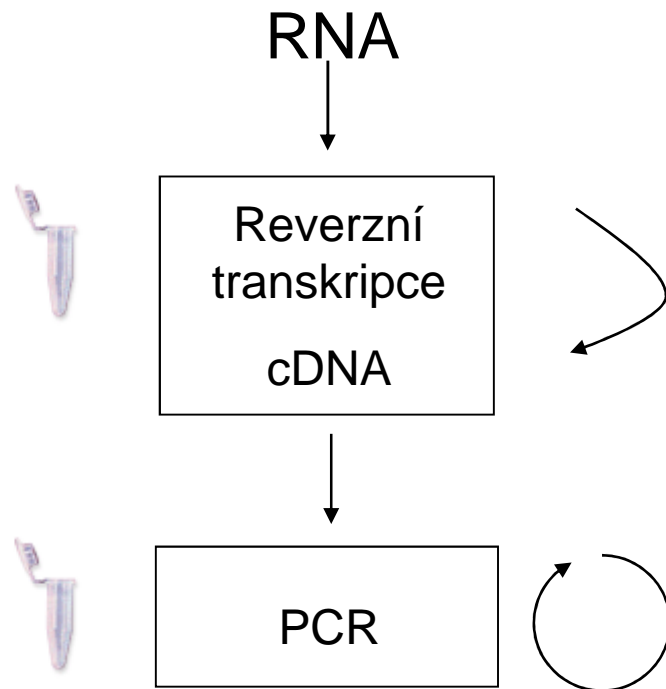
### PCR



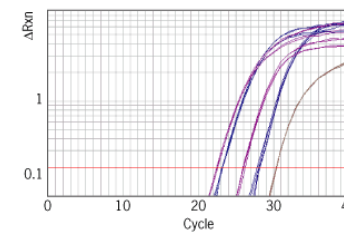
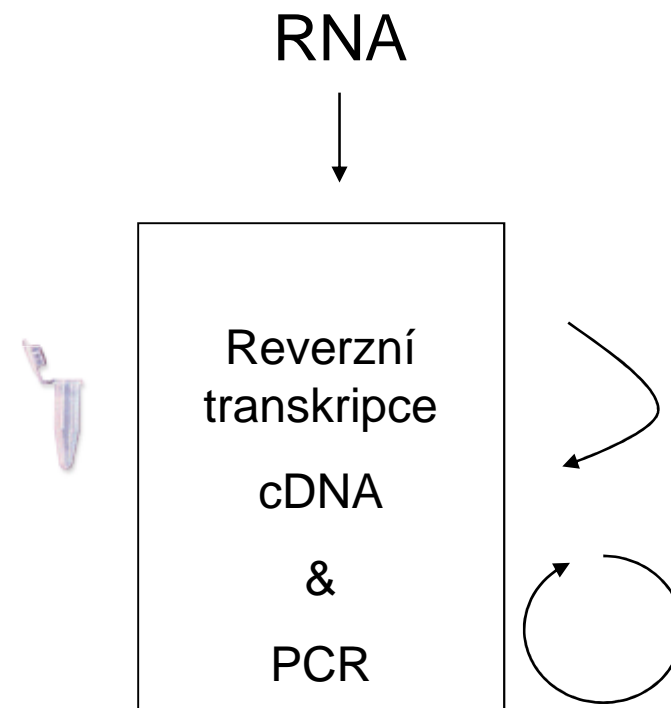
- mnohonásobně citlivější než např. northern/dot blot, RNase /S1 protection assays, nebo ISH
- exprese mRNA, detekce a kvantifikace virů atd.

# Kvantitativní RT PCR

## „two step“ RT-PCR

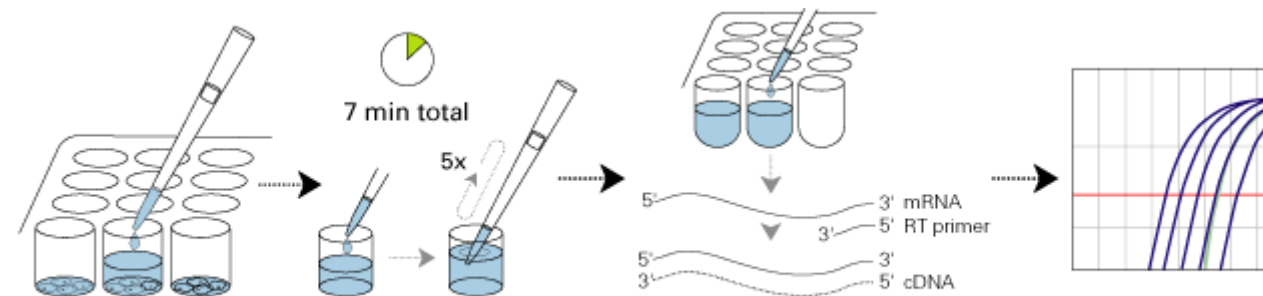


## „one step“ RT-PCR





## „Cells to Ct“ approach



### Cell Lysis

1. Remove culture media. Wash cells with PBS.
2. (Optional) Dilute DNase I into Lysis Solution
3. Add Lysis Solution and mix 5 times
4. Incubate for **5 min** at **room temp** (19–25°C)
5. Add Stop Solution and mix 5 times
6. Incubate for **2 min** **room temp**

### Reverse Transcription (RT)

1. Assemble an RT master mix and aliquot into reaction tubes/plates
2. Add lysate (up to 45%) and mix thoroughly
3. Run the RT thermal cycle

### Real-Time PCR

1. Assemble a PCR cocktail and aliquot into reaction tubes/plates
2. Add cDNA (up to 45%) and mix thoroughly
3. Run the PCRs in a real-time PCR instrument

**Figure 1. Samples are Ready for RT-PCR in Just 7 Minutes.** The TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit requires only 7 minutes at room temperature to release nucleic acids into a cell lysate solution. No centrifugation is needed, and the solution is compatible with RT and real-time PCR (optional DNase treatment included).

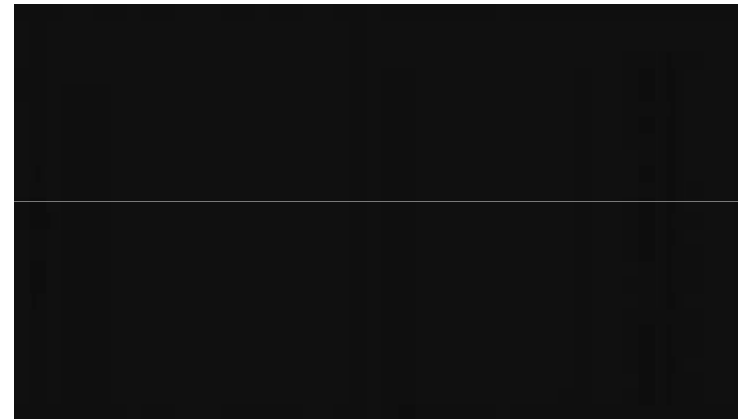
# One step or two step PCR?



One tube/two enzymes			Two tubes/two enzymes		
Feature	Advantages	Disadvantages	Feature	Advantages	Disadvantages
Reduced hands-on time	Fewer errors More rapid Higher throughput		Dedicated enzymes	Separate optimisation enhanced sensitivity	More pipetting errors
Less pipetting	Fewer errors		Multiple priming options	Separate cDNA pool Multiple targets	
Reagents added at start	Less contamination	No separate optimization	cDNA synthesis	Safer long term storage	
Higher temperature	Higher specificity	Target specific priming only			

## Reverzní transkripce

- templát polyribonukleotidy i polydeoxyribonukleotidy
- syntéza DNA na základě RNA templátu - tzv. RDDP nebo DDDP aktivita (RNA/DNA directed DNA polymerase)
- replikace retrovirů (HIV)



### Průběh RT

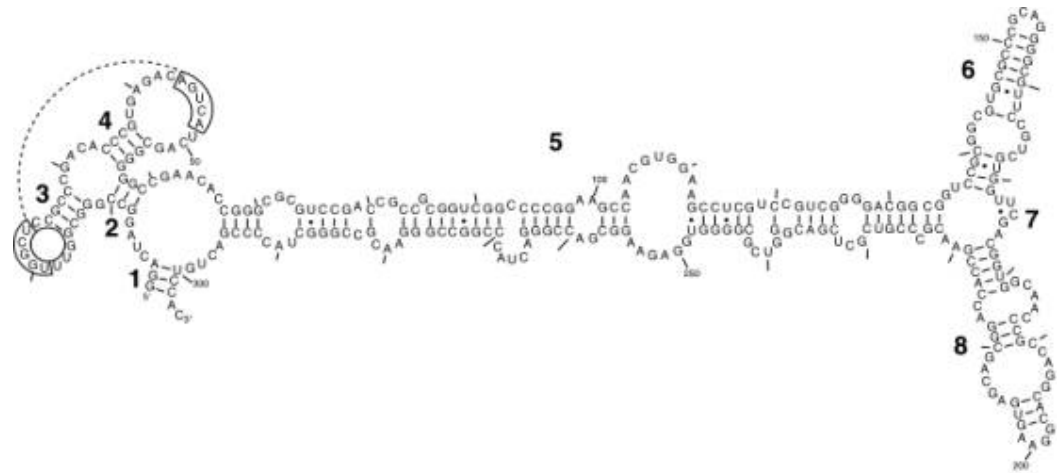
1. RDDP syntéza DNA řetězce podle RNA templátu
2. odbourání RNA, RNase H
3. DDDP syntéza druhého DNA řetězce



## Reverzní transkripce

### Reverzní transkriptáza

- vysoké procento chyb (nemají proofreading)
- citlivost k sekundárním strukturám
  - způsobí terminaci polymerace nebo vynechání úseku sekundární struktury
- vysoká procesivita v případě malých ampliconů - krátké molekuly cDNA
- optimální reakční teplota 50-55°C
- dvojmocné ionty,  $Mn^{II+}$ ,  $Mg^{II+}$ 
  - fidelity



## Reverzní transkripce

### Aditiva

- optimalizace účinnosti RT
- mechanismus nejasný, pravděpodobně ovlivňují termostabilitu enzymu nebo tvorbu sekundárních struktur templátu
- různé výsledky s různými enzymy a reakčními podmínkami

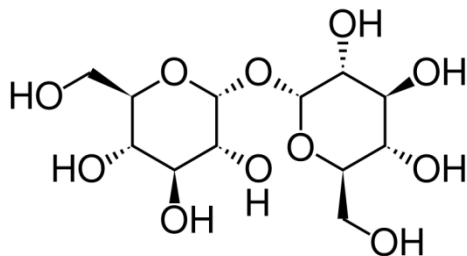
### Trehalóza

0,6M/15% glycerol - brání tepelné inaktivaci enzymu

Zvyšuje enzymatickou aktivitu MMLV-RT při 60°C

Úspěšná syntéza řetězců o délce 10kb

Zvýšení specifiity odT primerů (Superscript II)



### Betain (trimethylglycerin)

Osmoprotektant

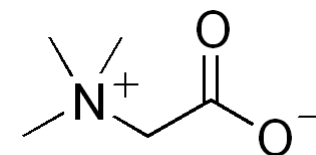
Stabilizace AT párů

Snížení termostability GC párů – snížení T<sub>m</sub>

Kombinace 2M betainu a 0,6M trehalózy

Závislost na templázu a amplikonu

Optimalizace



## RNáza H

### Reverzní transkripce

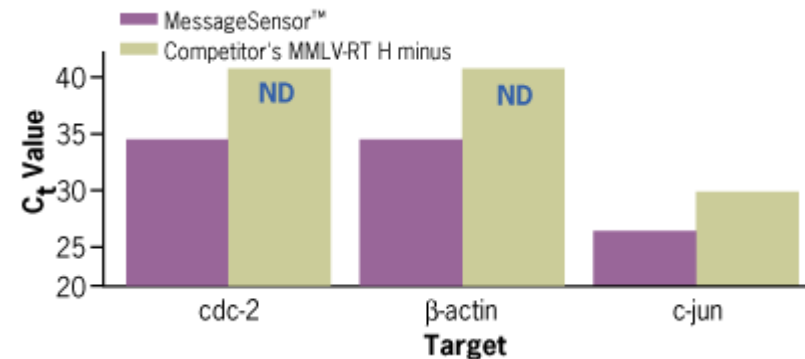
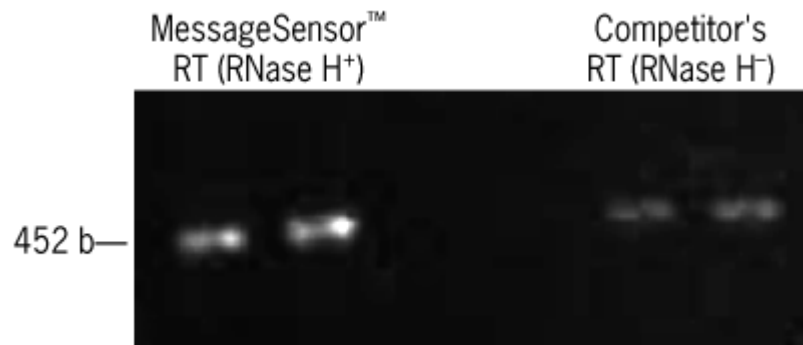
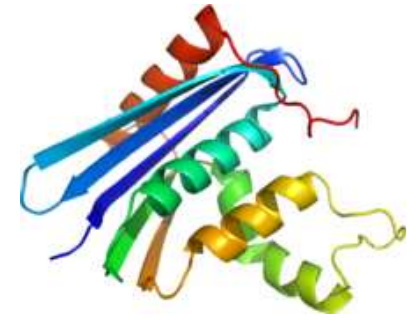
#### RNáza H

degradace duplexu cDNA/RNA

Kompetuje se syntetickou aktivitou RT (Degradace duplexu DNA primer/RNA proběhne s větší pravděpodobností než extenze řetězce) = snížený výtěžek cDNA

Ale:

- neodbouraná RNA může omezovat hybridizaci primerů a snižuje citlivost PCR
- PCR primery mohou být zbytkovou RNA vyvázány

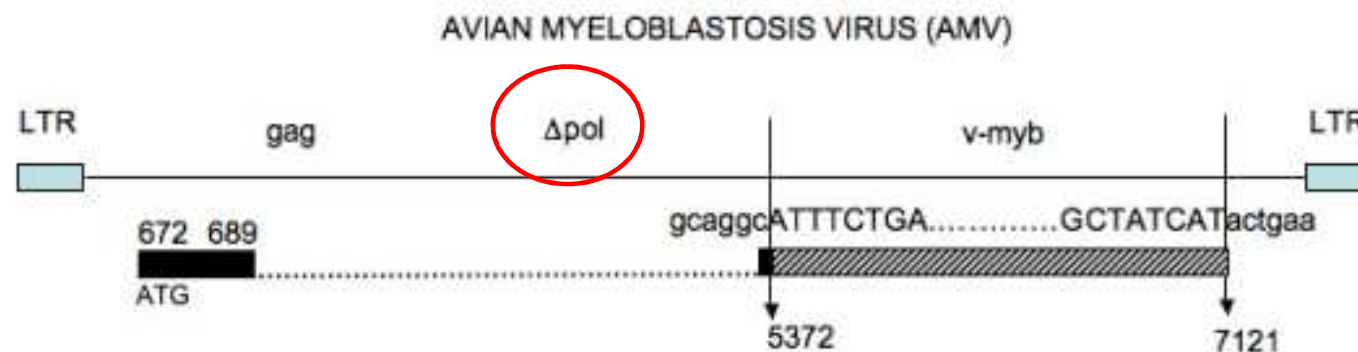


- tvrdé denaturační podmínky (97°C)

## Reverzní transkripce

### AMV (Avian myeloblastosis virus) RT

- Syntéza DNA z DNA nebo RNA templátu
- DNA primery, oktamery a delší jsou efektivnější než hexamery
- Nekompetitivně inhibovaná tRNA
- Optimální reakční teplota 42°C
- Modulární enzym
- *Thermoscript* (Invitrogen) – vyšší teplotní stabilita (65°C), redu kovaná aktivita RNázy H (tvorba cDNA knihoven)
- Četnost chyb  $4,9 \times 10^{-4}$





# Reverzní transkripce

**MMLV** (Moloney murine leukemia virus) **RT**

- Nižší aktivita RNázy H než v případě AMV-RT
- Termolabilní, optimum 37°C
- DNA i RNA primery, DNA primery 9-15bp vhodnější
- Modulární enzym
- Modifikované MMLV RT (redukce aktivity RNázy H, termostabilita)
  - *Superscript II* (Invitrogen), *Powerscript* (Clontech)
- Mg<sup>II+</sup> - syntéza dlouhých cDNA
- *MessageSensor* (Ambion) – One step PCR, pro kvantifikace už od 500 fg RNA
  - RNase H +



### Reverzní transkripce

#### DNA polymerázy s RT aktivitou

**Tth** (*Thermus thermophilus*), **Tfl** (*T. flavus*), **BcaBEST** (*Bacillus caldotenax*) -Takara

RDDP i DDDP aktivita

Vyšší termostabilita než RT

Vysoká četnost chyb (nemají 3' - 5' exonukleázovou aktivitu)

#### **C. therm polymerase** (Roche)

Klenowův fragment z *Carboxydotherrmus hydrogenoformus*

Vysoká teplotní stabilita a přesnost syntézy

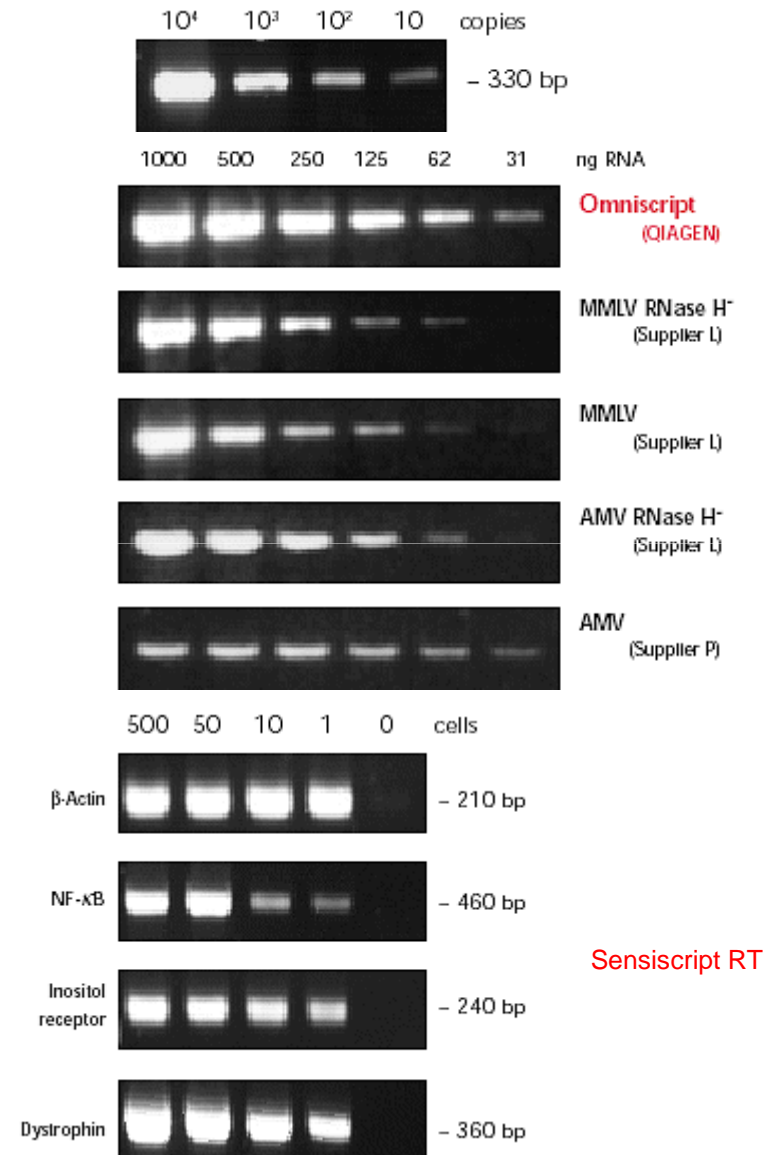
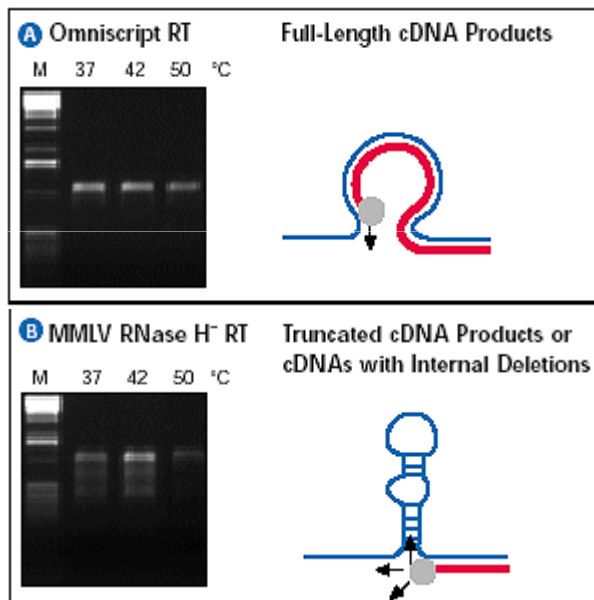
(četnost chyb poloviční ve srovnání s Tth)

## Reverzní transkripce

### Omniscript, Sensiscript RT (Qiagen)

Nejsou odvozeny od AMV RT nebo MMLV RT

Obtížně transkribovatelné templáty

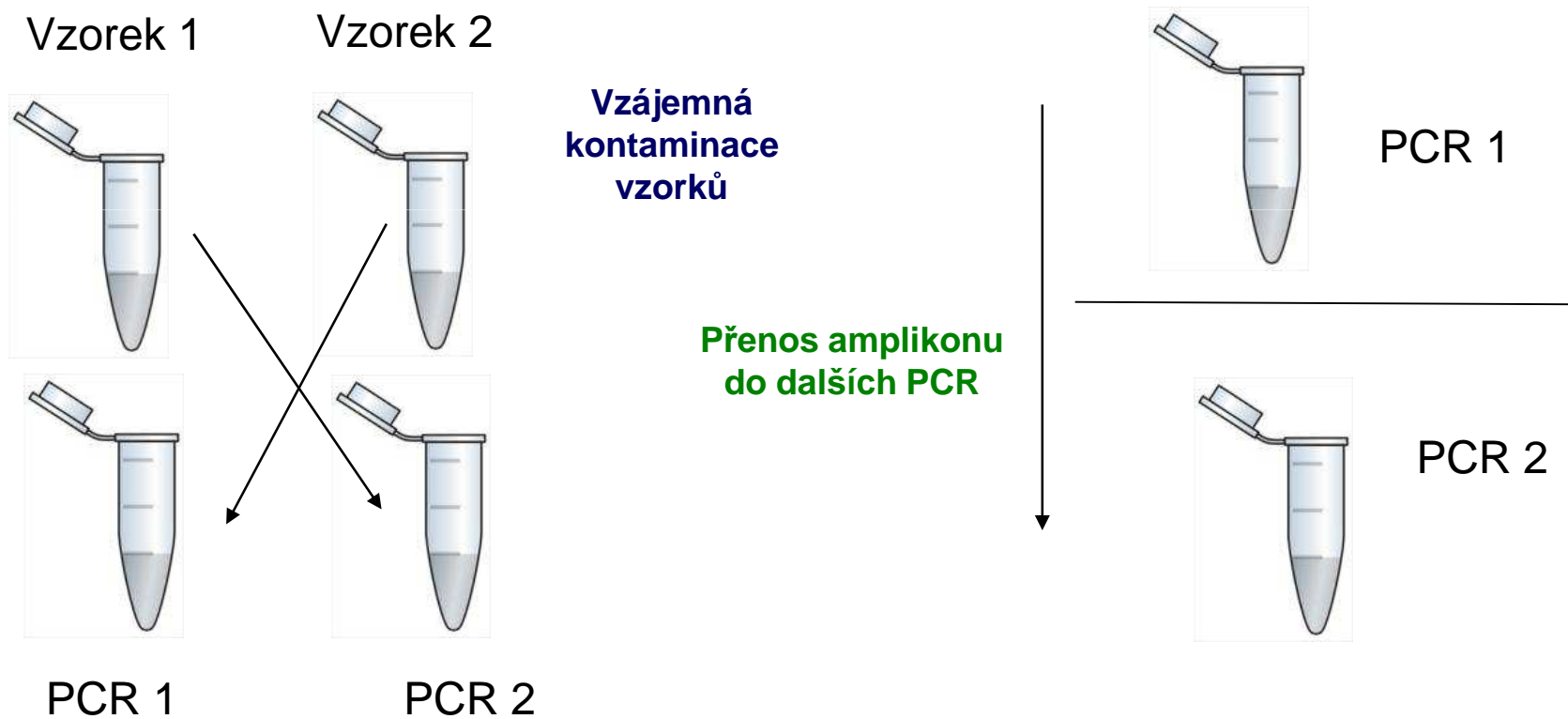


# Kontaminace

Cross contamination

Kontaminace v PCR

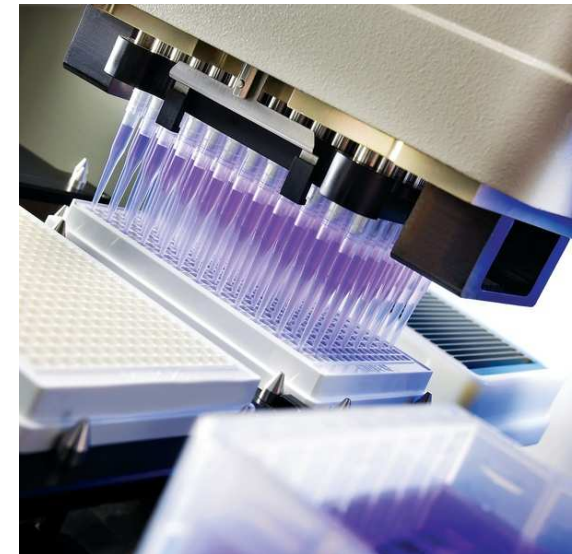
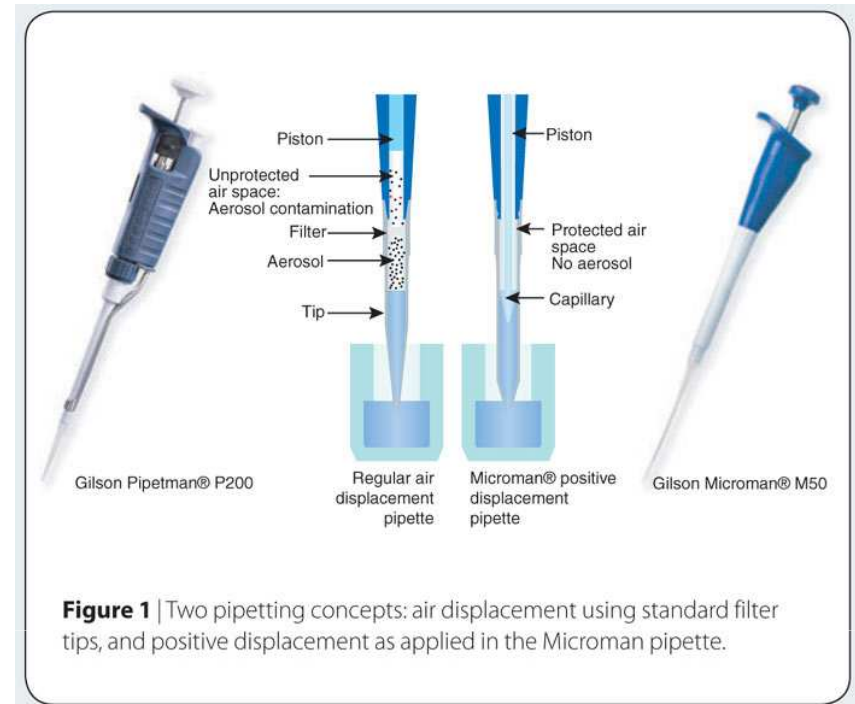
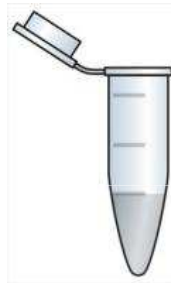
Carry-over contamination



# Kontaminace

## Jak předejít kontaminaci

- Správná laboratorní praxe
- Plastik v „RNA/PCR“ kvalitě
- Automatizace



## HotStart Taq

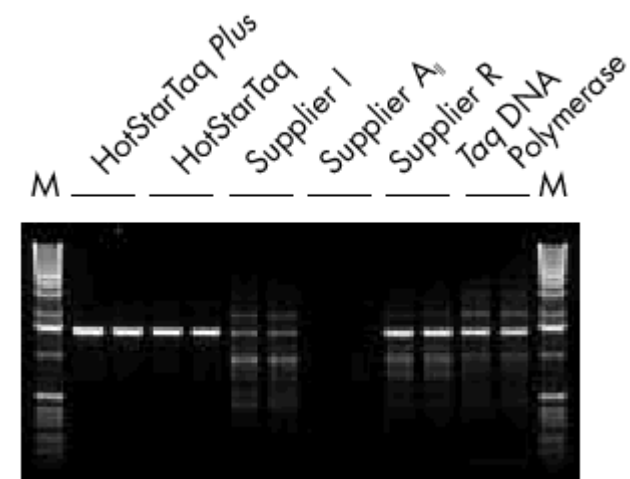
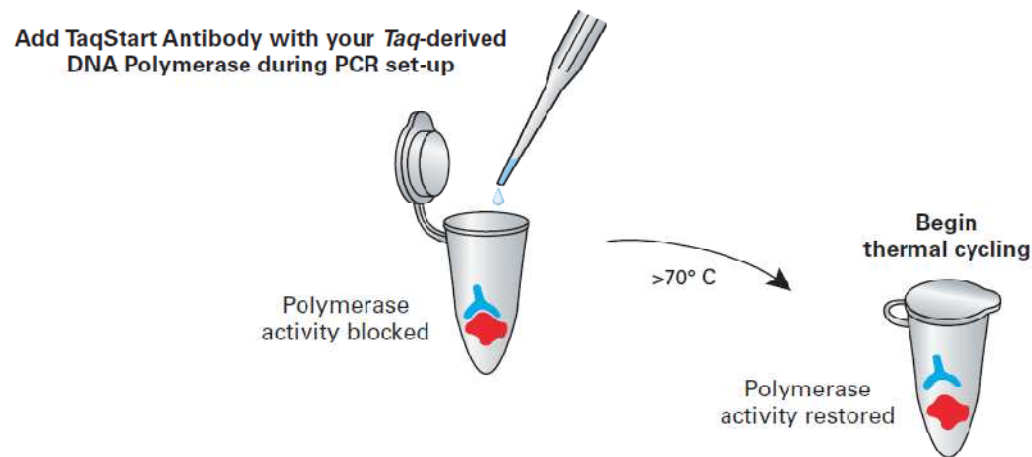
- Modifikace polymerázy (Chemická modifikace, MoAb)
- Upravená, teplotně senzitivní polymeráza

*Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, No. 21 6139–6147  
DOI: 10.1093/nar/gkg813

### Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR

Milko B. Kermekchiev, Anatoly Tzekov and Wayne M. Barnes\*

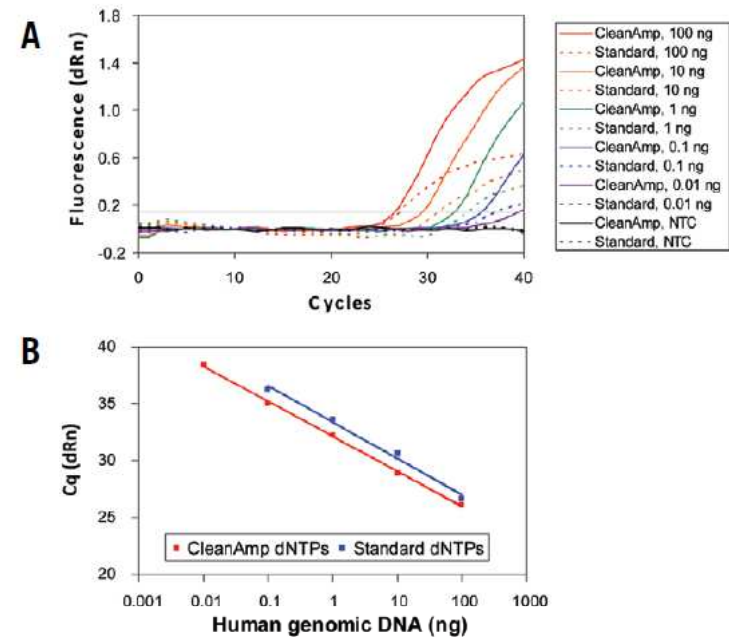
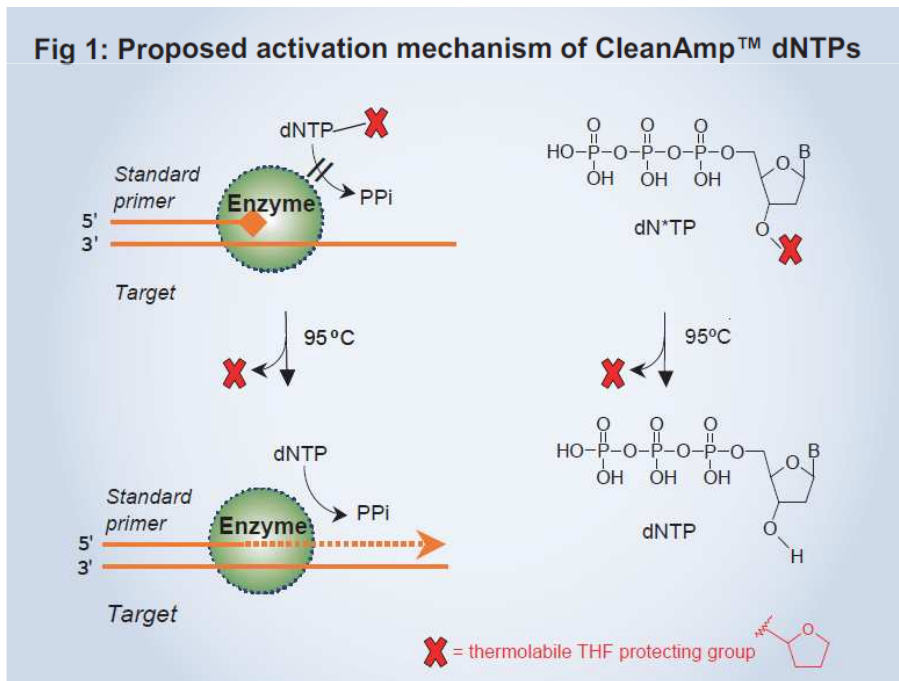
DNA Polymerase Technology Inc., 1508 South Grand Avenue, St Louis, MO 63104, USA and Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Avenue, St Louis, MO 63110, USA



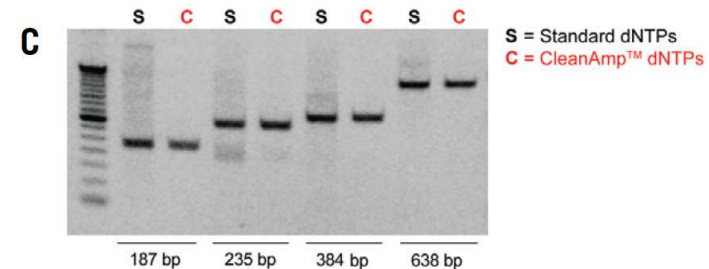
# Hot Start

## HotStart dNTPs

- Modifikace termolabilní tetrahydrofuranovou (THF) skupinou (cyklický ether)
- Brání extenzi a dimerizaci primerů
- Zvýšením teploty dojde k uvolnění THF a vzniku standardních dNTPs



**Figure 2.** Comparison between standard dNTPs and CleanAmp™ dNTPs for amplification of a 187 bp target from human genomic DNA in quantitative PCR. Results are presented as an amplification plot (A) and a standard curve (B) with standard dNTPs:  $(Y = -3.191 \cdot \text{LOG}(X) + 33.36, \text{Eff.} = 105.8\%)$  and CleanAmp™ dNTPs  $(Y = -3.079 \cdot \text{LOG}(X) + 32.12, \text{Eff.} = 111.2\%)$ .



**Figure 1.** Comparison of (A) standard dNTPs and (B) CleanAmp™ dNTPs for amplification of a 235 bp target from human genomic DNA over a range of annealing temperatures. (C) Performance of standard and CleanAmp™ dNTPs for the amplification of four targets from human genomic DNA.

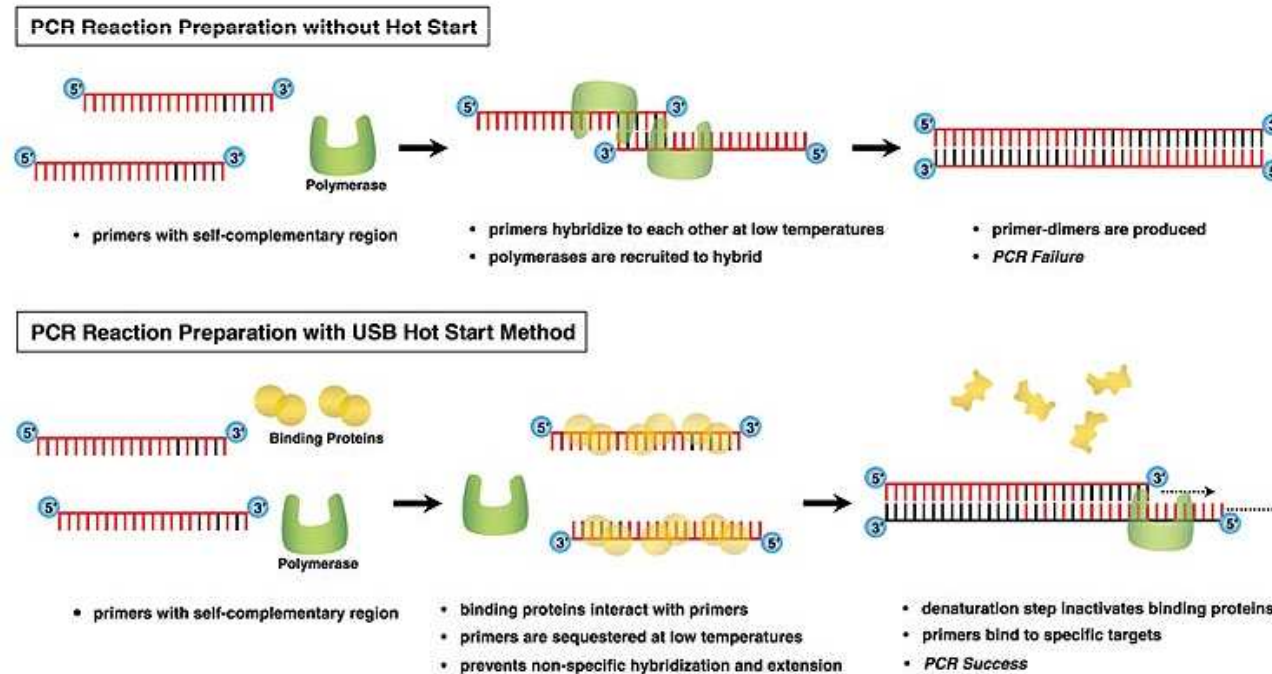
## Alternativní HotStart přístupy

An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose

S.Kaijalainen, P.J.Karhunen<sup>1,2</sup>, K.Lalu<sup>1</sup> and K.Lindström

- Fyzické oddělení jednotlivých reakčních složek
- Vyvázání nebo chemická modifikace primerů

Fig. 1. USB HotStart-IT Method: Primer Sequestration



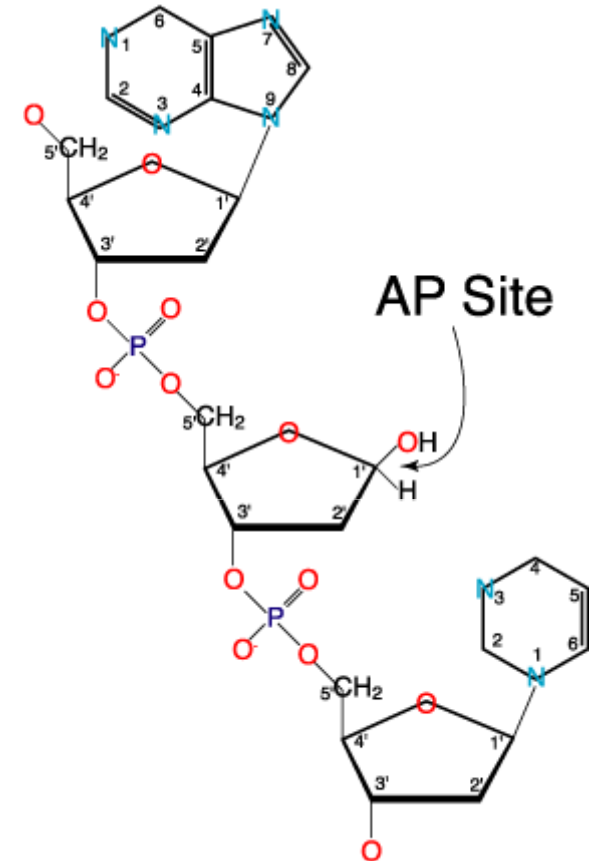
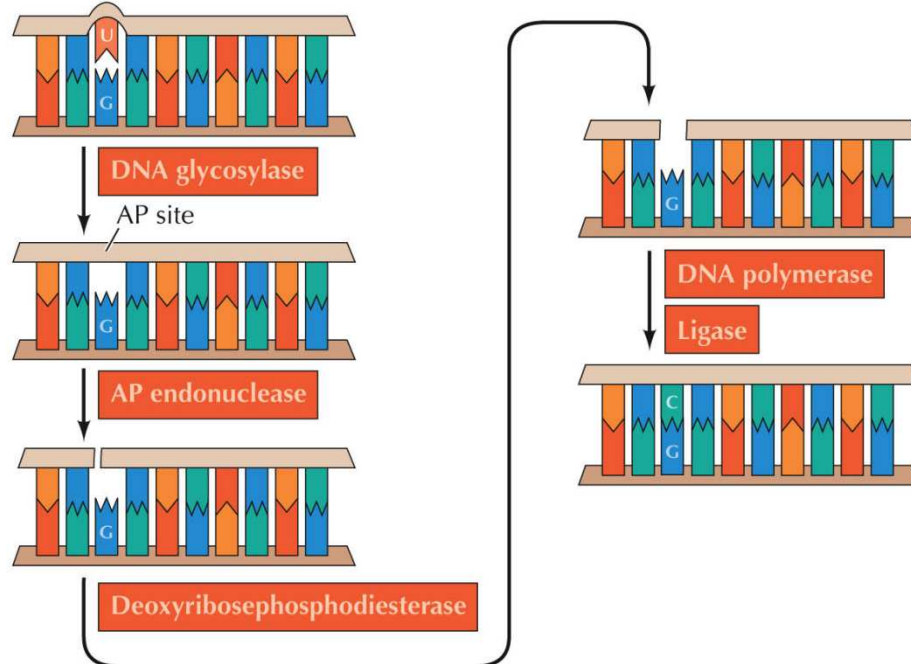


# UNG

## Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

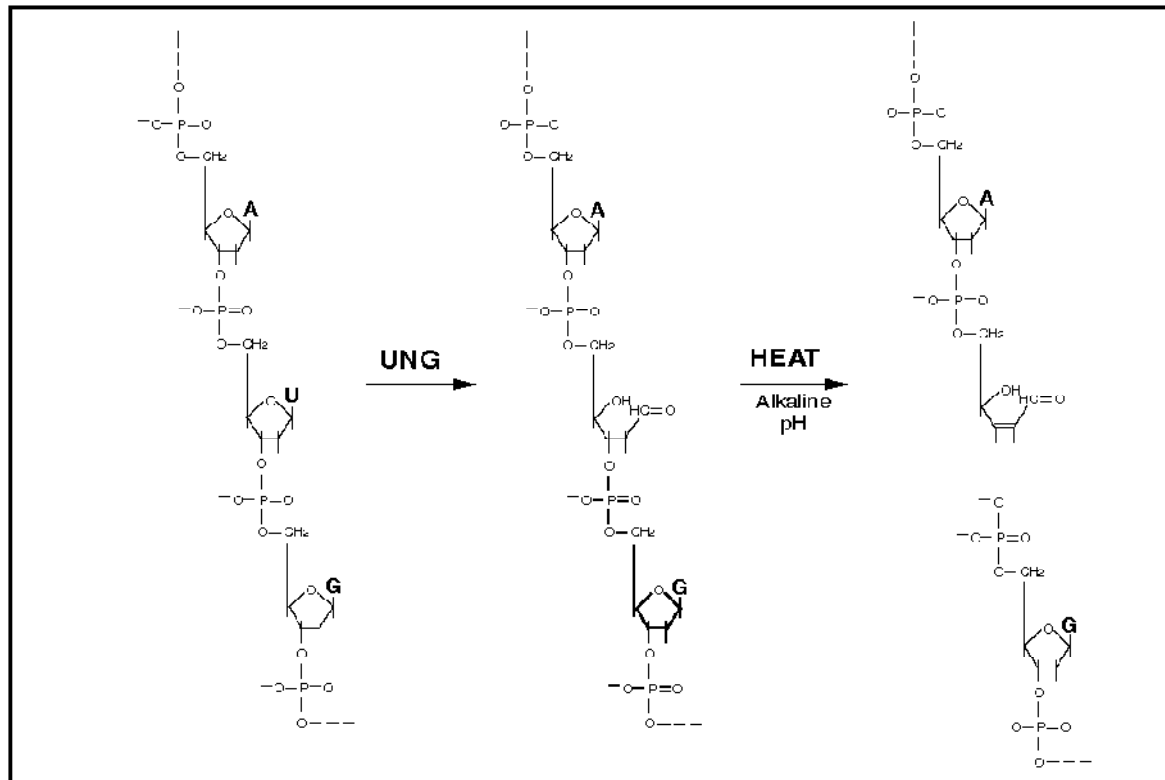
- odstraňuje uracil z DNA
- zahajuje bazovou excizní reparaci – dochází k odštěpení poškozené báze (deaminovaný cytosin) a vzniku AP místa (apurinové, apyrimidinové místo)

DNA containing U formed by deamination of C



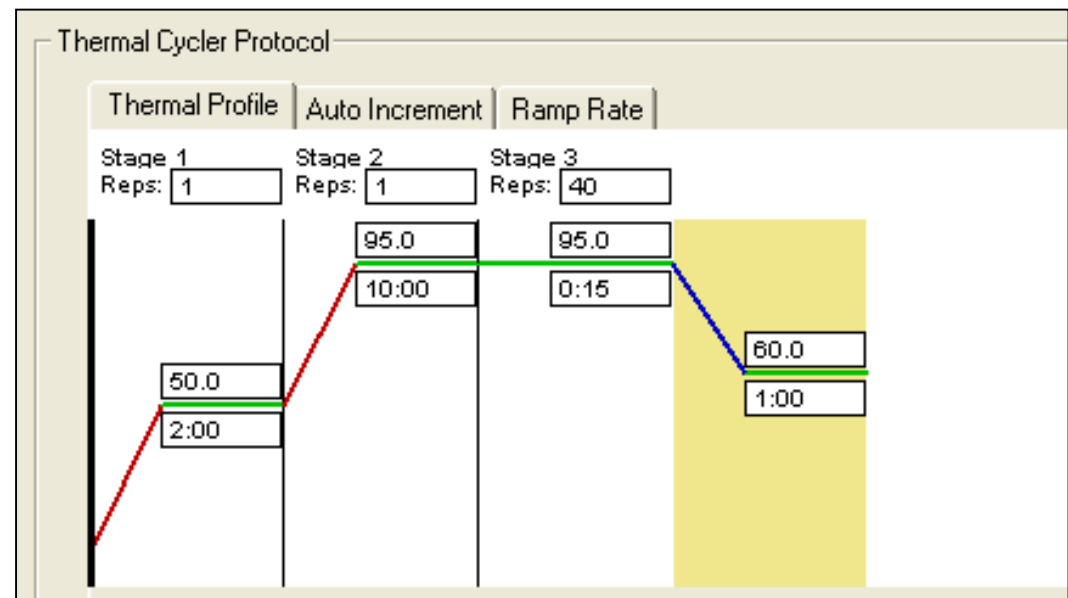
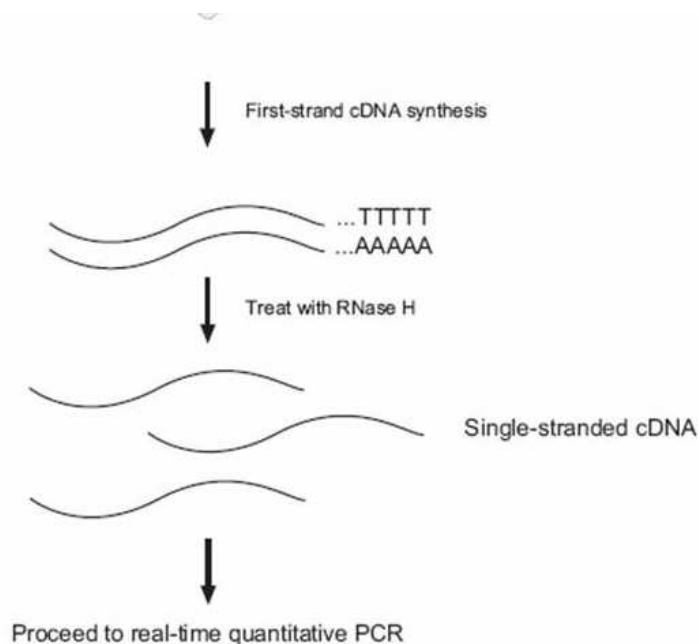
## Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

- Pokud reakční PCR směs obsahuje dUTP místo dTTP, výsledný amplikon bude obsahovat „U“ místo „T“
- UNG rozpozná místa v DNA, která obsahují „U“ a štěpí je za vzniku AP místa
- DNA obsahující AP místa je termolabilní
- Lze tak zabránit „carry over“ kontaminaci – PCR produkt nemůže být reamplifikovaný



## Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

- Použitím UNG a vhodné směsi dNTP, lze zabránit „carry over“ kontaminacím v laboratoři
  - PCR produkt nemůže být reamplifikovaný
- Vlastnosti DNA obsahující „U“ místo „T“:
  - dU mají stejnou schopnost hybridizace jako dT
  - lze ji použít i pro dideoxy-NTP sekvenování
  - PCR fragment lze přímo klonovat do UNG<sup>-</sup> kmenů

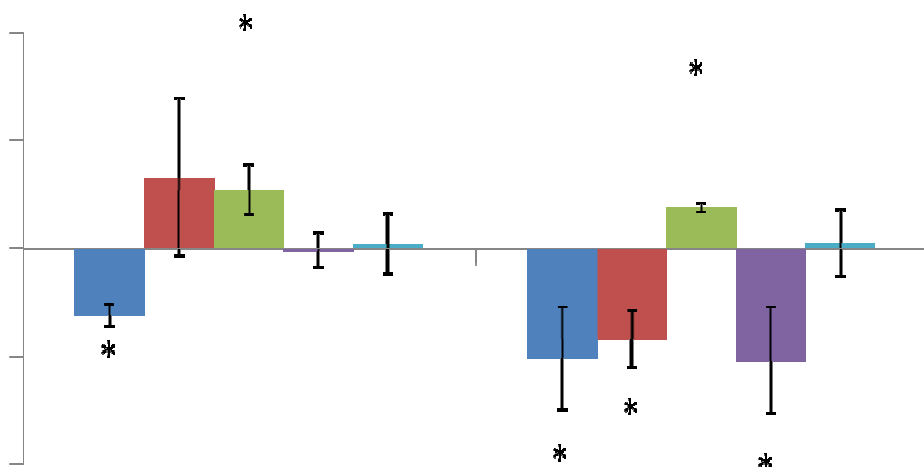


### Shrnutí

Po dnešní přednášce:

- umíte si popsat kinetiku PCR
- znáte rozdíl mezi *end-point* a *real-time PCR*
- víte, co to je R, R<sub>n</sub>,  $\Delta R_n$ , Ct
- znáte vztah mezi Ct a množstvím amplikonu
- umíte popsat a rozhodnout se, kdy použít One Step a Two Step PCR
- víte, co to jsou DNA polymerázy a reverzní transkriptázy, znáte jejich charakteristiku i průběh reverzní transkripce
- víte, co to znamená HotStart PCR a UNG a jak předejít případným kontaminacím

# 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)

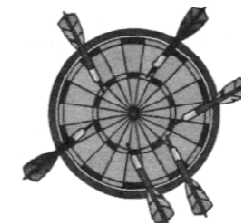
Inter-assay variabilita (stejná analýza v různých laboratořích)

**Accuracy** (Správnost)

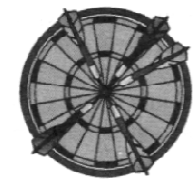
Shoda mezi experimentálně zjištěnou hodnotou a realitou

**Precision** (Přesnost)

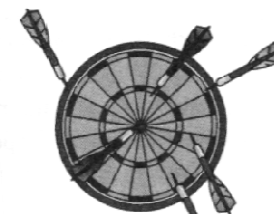
Shoda mezi experimenty („jak přesně pipetujeme“)



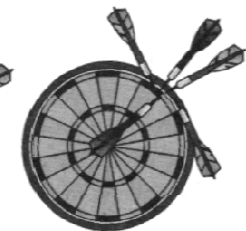
High accuracy  
Low precision



High accuracy  
High precision

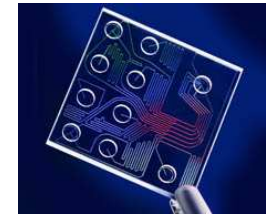


Low accuracy  
Low precision

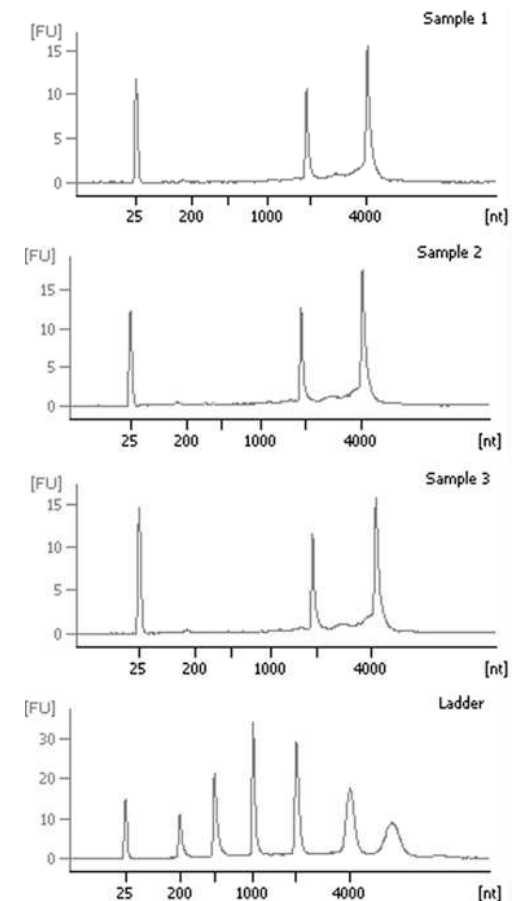
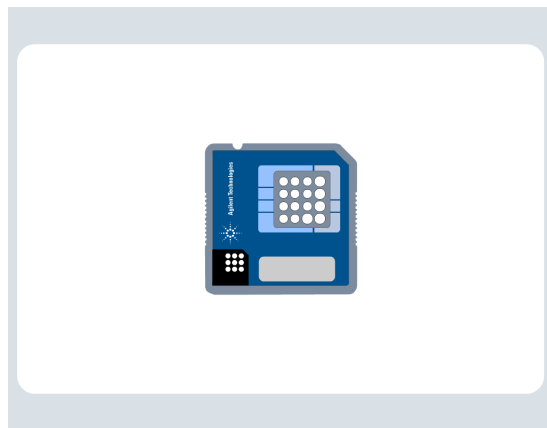


Low accuracy  
High precision

## 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...



# Kvantifikační strategie

## Templát – Izolace RNA

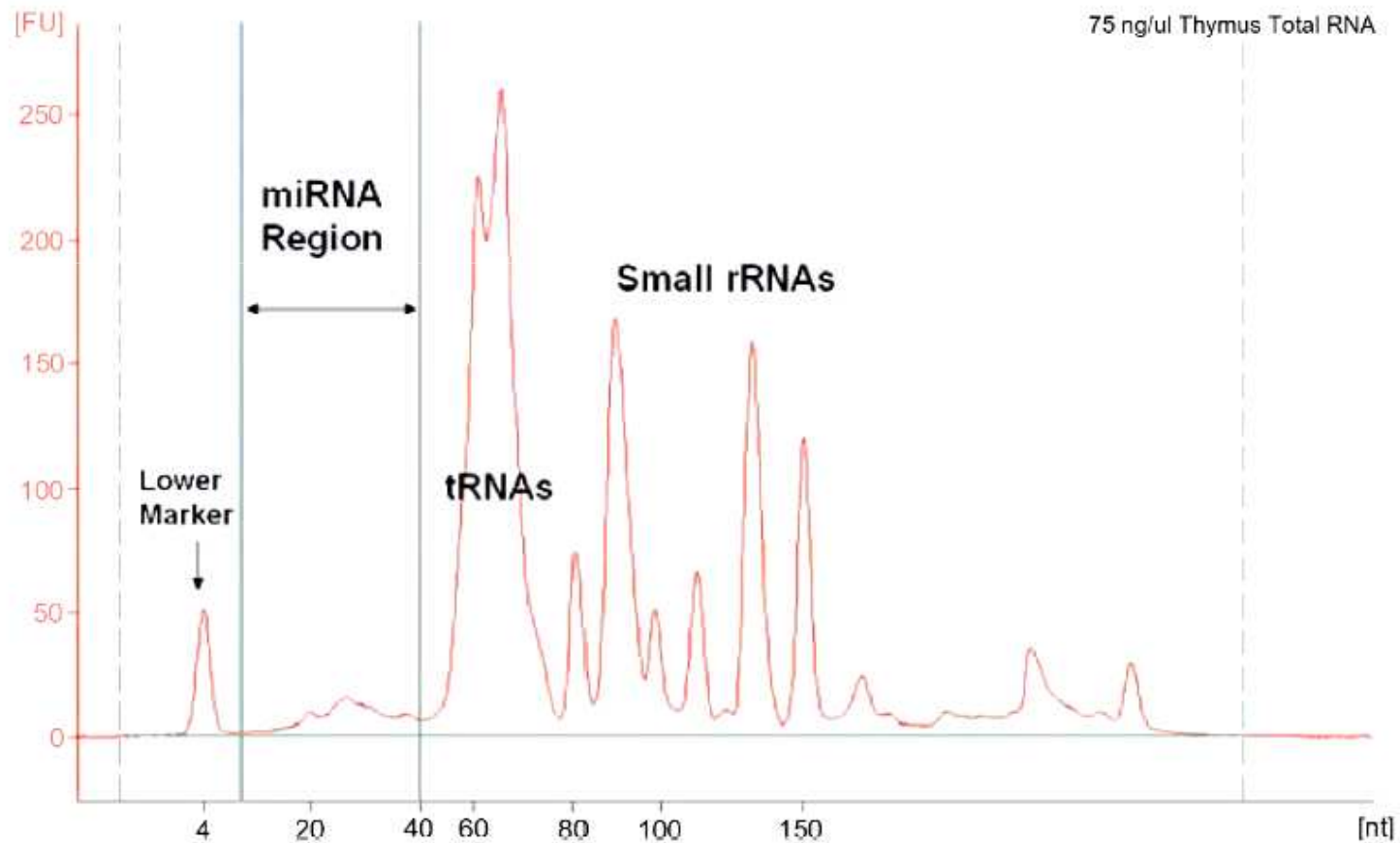


Fig. 1A. Image of a typical electropherogram for small RNA analysis performed with the Small RNA Assay on the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) (<http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5989-7002EN.pdf>).



# Kvantifikační strategie

## 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

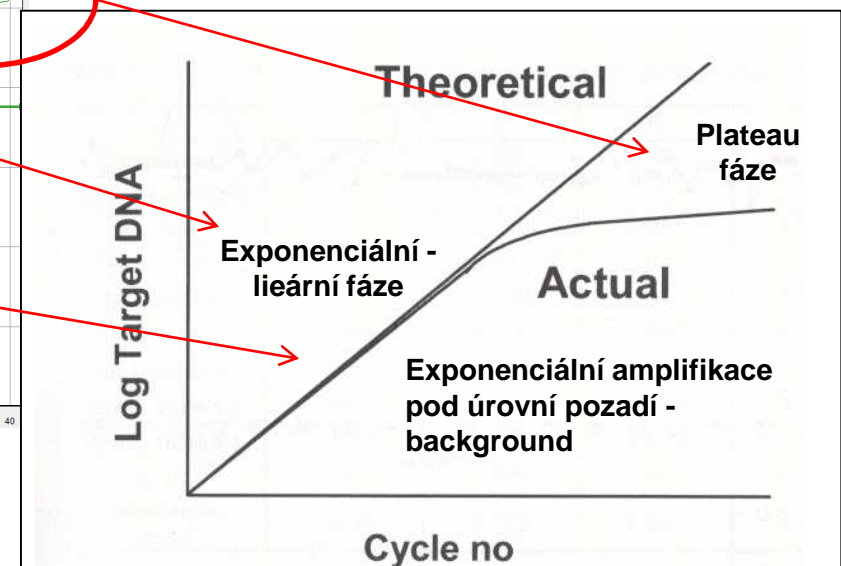
# Kvantifikační strategie

## 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%)

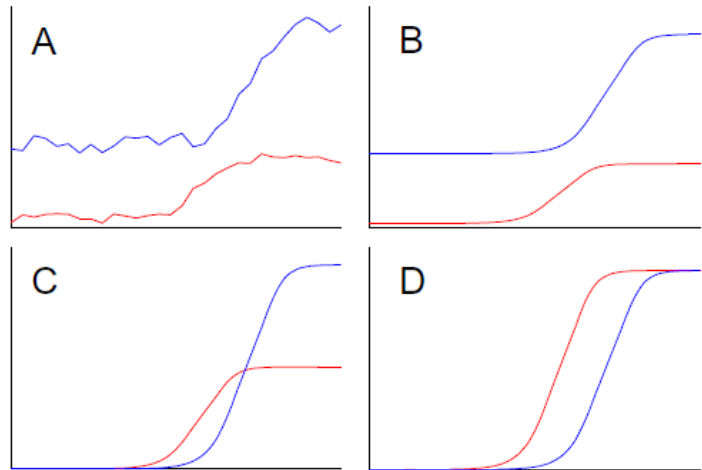


end point



# Kvantifikační strategie

## Zpracování dat

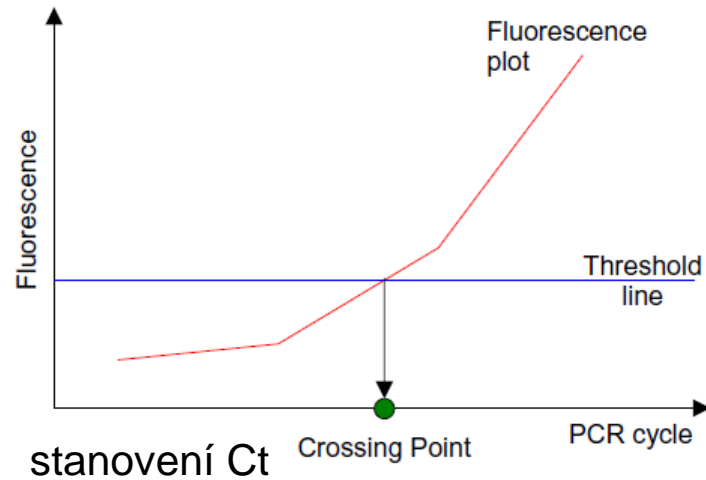


A data přímo z přístroje

B vyhlazení dat

C normalizace pozadí (na základě nespecifické fluorescence)

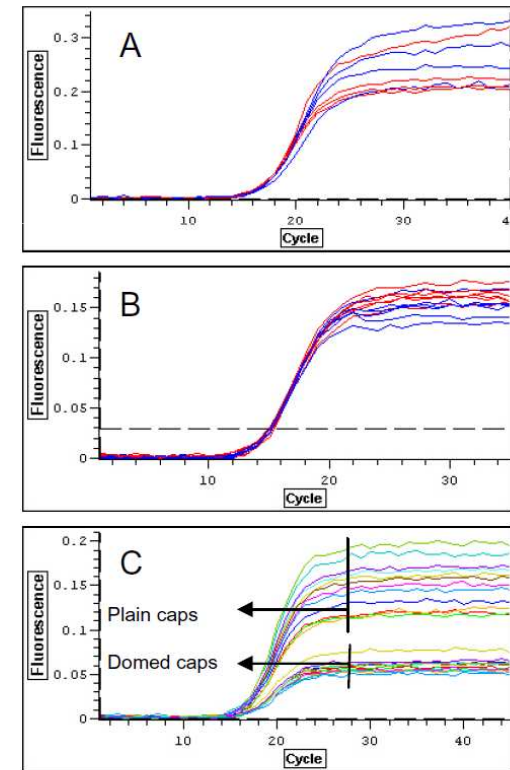
D normalizace amplitudy signálu (na základě plateau)



Množství polymerázy

Koncentrace primerů

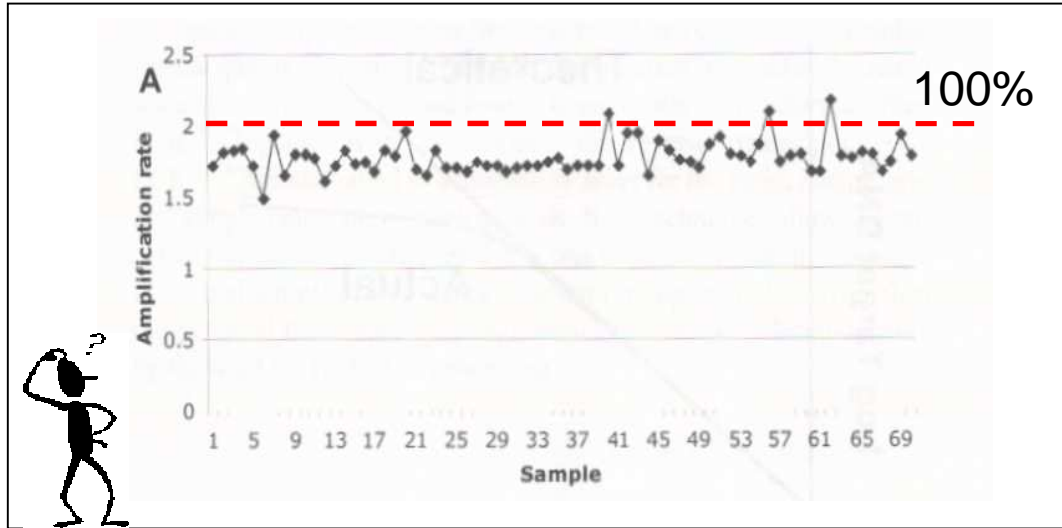
Tvar mikrozkmavek



**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

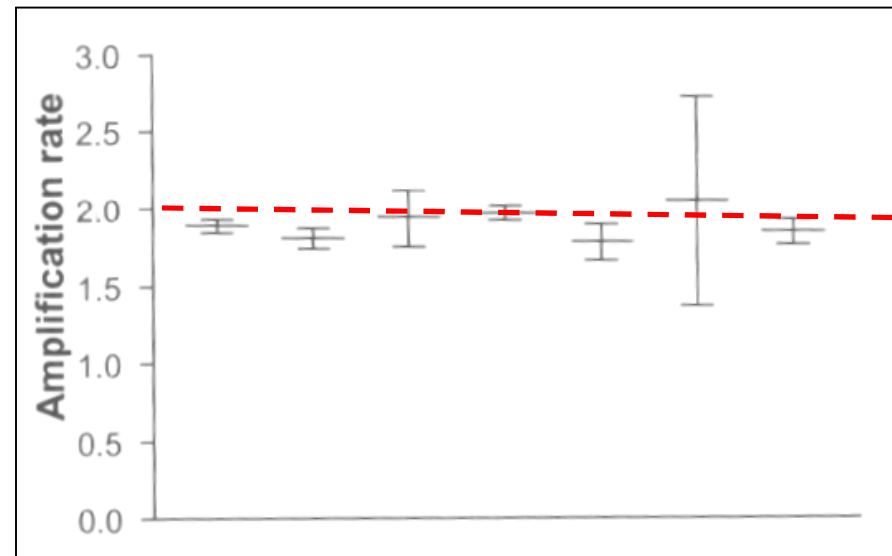
## Účinnost PCR (Efficiency)



$$Y=N 2^n$$

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

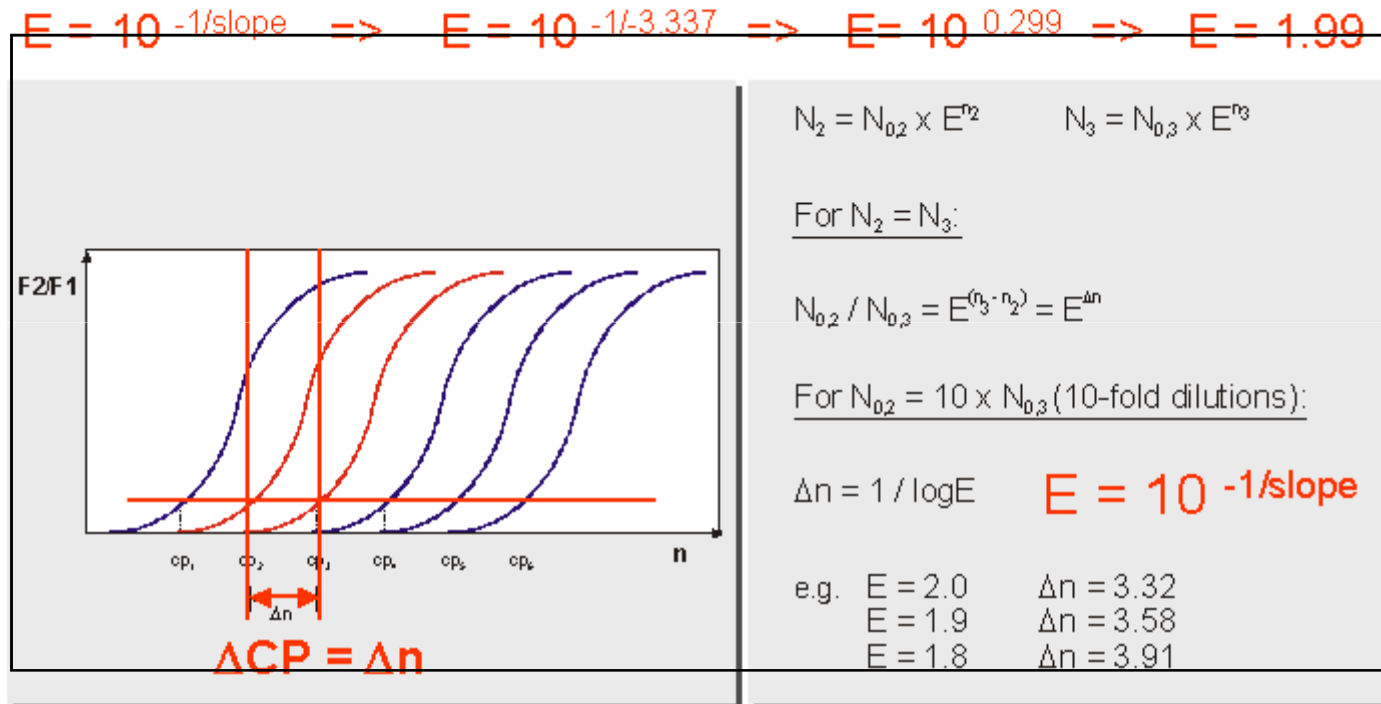
Účinnost PCR je 100% jen výjimečně, dokonce i v případě opakovaných PCR identických templátů



# Kvantifikační strategie

## Účinnost PCR

### Calculation of real-time PCR efficiency



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

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

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

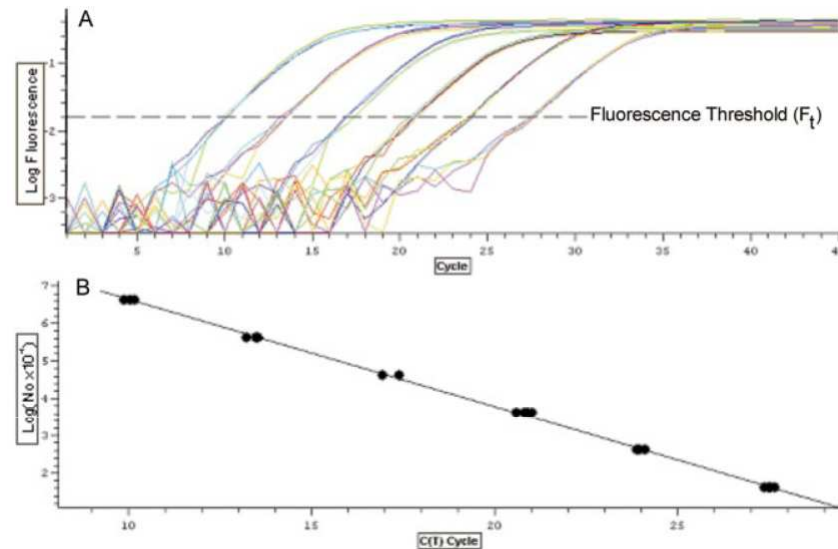
$$N_0 = N_t / (E + 1)^{C_t}$$

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

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

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

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



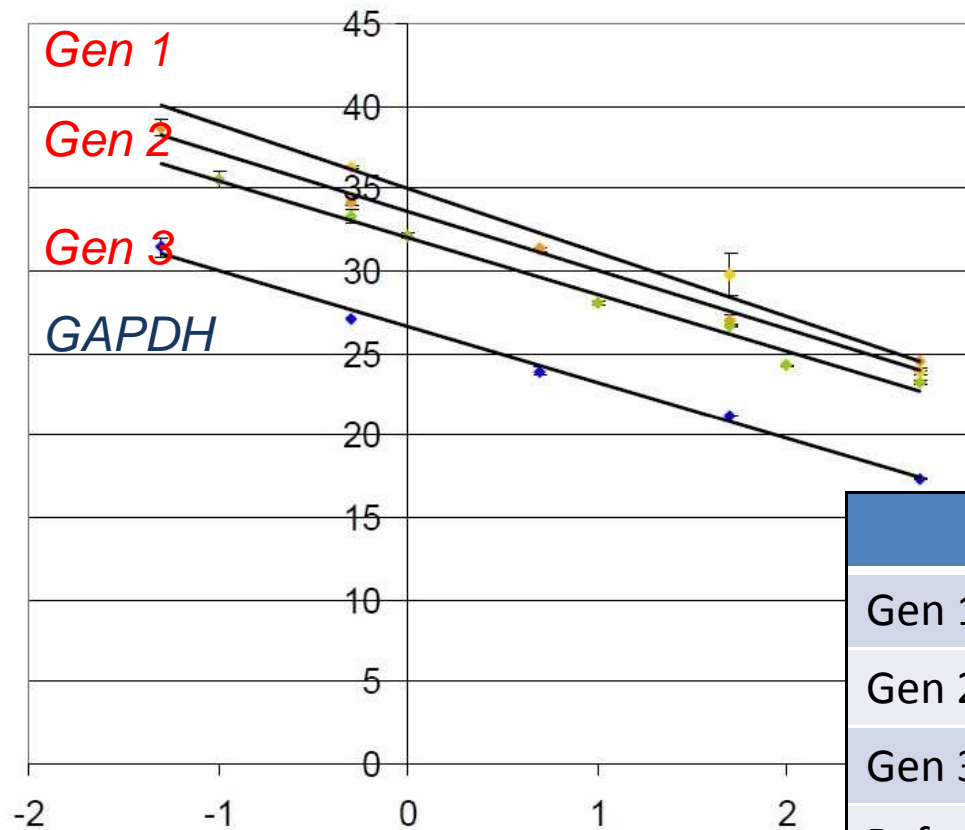
Platné za předpokladu:

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
<b>-3.30</b>	<b>2.0092</b>	<b>1.0092</b>
-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

## 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
- nahodnocování reálné účinnosti PCR

## 2. Výpočet z nárůstu fluorescence v lineární fázi

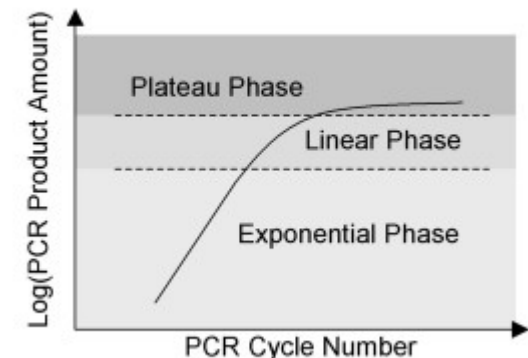
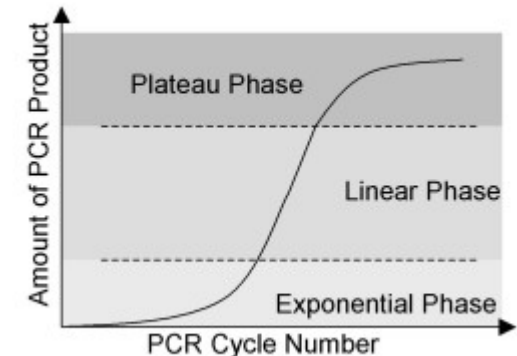
- $E = 1,35 - 1,65$
- podhodnocování reálné účinnosti (datové body z oblasti blízké plateau)

## 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

- $Y_n = Y_0(E)^n$





# Kvantifikační strategie

## Účinnost PCR

Otázka:

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

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  $3 \times 10^5$  na  $2 \times 10^{10}$  s účinností 85% je nutných 18 cyklů.**

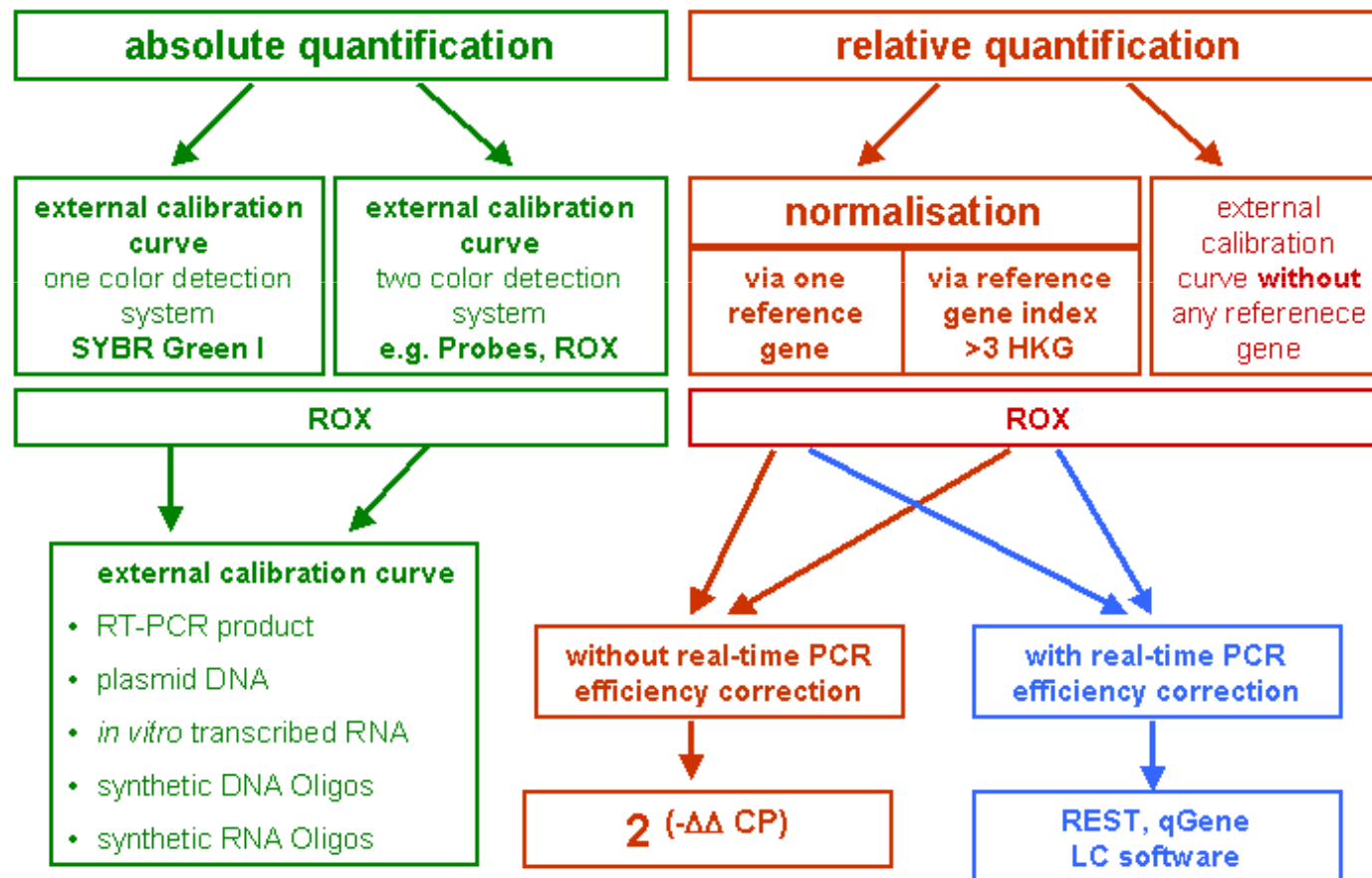
# Kvantifikační strategie

## Absolutní kvantifikace

## Relativní kvantifikace

### Quantification Strategies in real time qRT-PCR

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



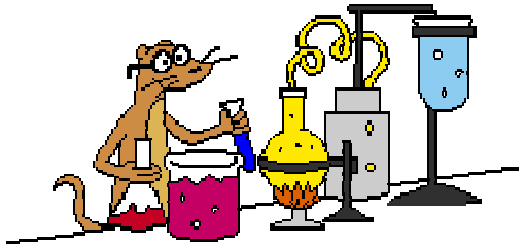
# Kvantifikační strategie

## 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



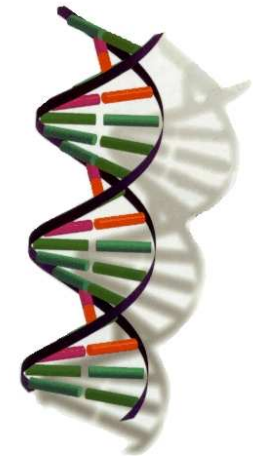
## DNA

- 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

Výsledek absolutní kvantifikace závisí na

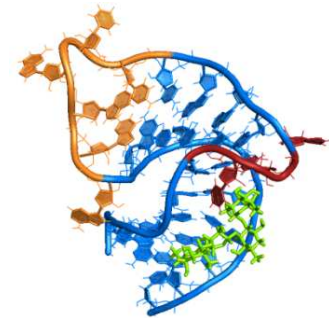
**1. Volbě standardu**

**2. Good laboratory practice**



# Kvantifikační strategie

## 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

# Kvantifikační strategie

## 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– $1.6 \times 10^{10}$ molecules ( $r = 0.992$ )	60– $6 \times 10^{10}$ 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

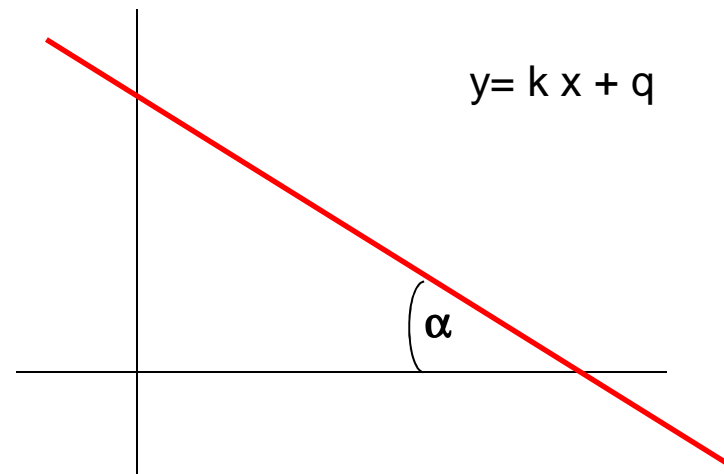
Je nutné vytvářet pokaždé novou kalibrační křivku? Jaká je její reproducibilita?

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

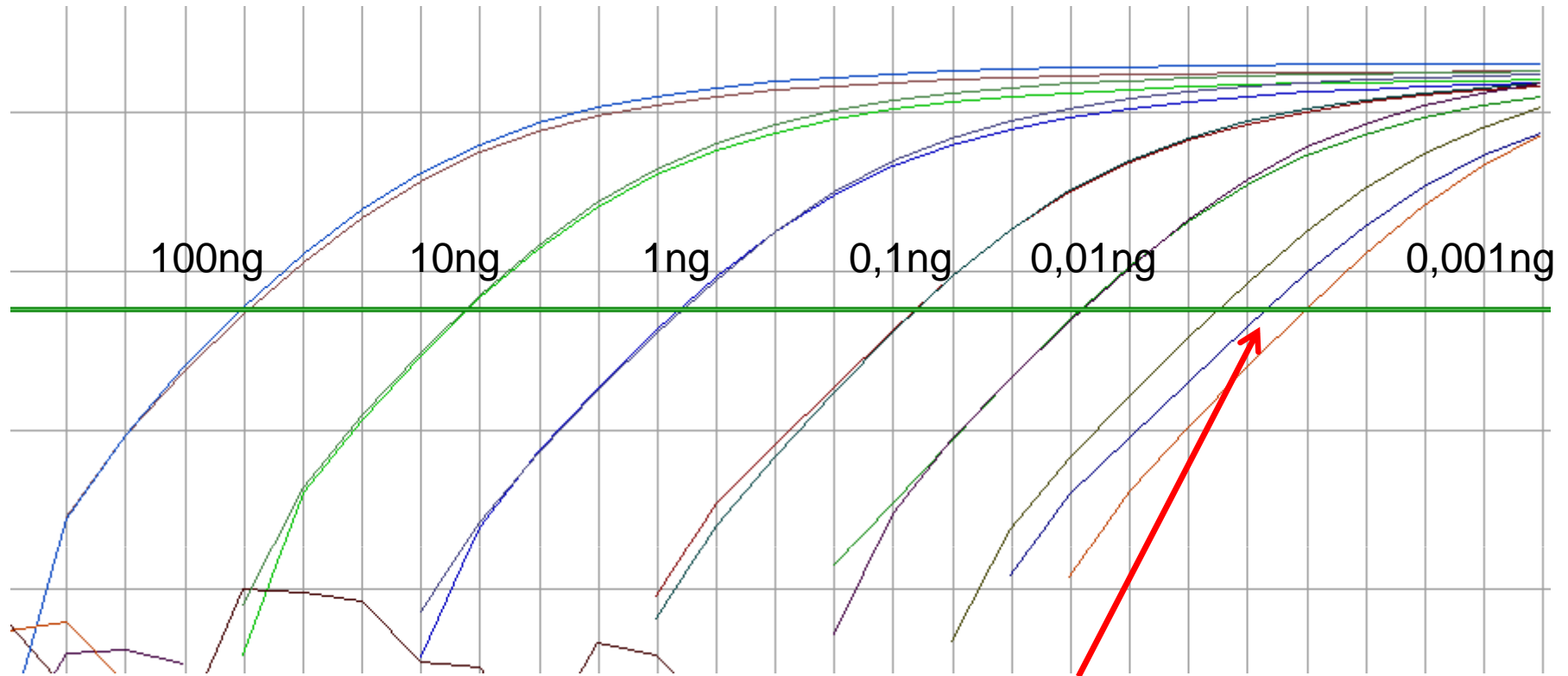
## **Monte Carlo effect**

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<sup>a</sup>, Kathleen Mihalik<sup>a</sup>, Mei-ying W. Yu<sup>b</sup>,  
Stephen M. Feinstone<sup>a</sup>, Marian E. Major<sup>a,\*</sup>

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

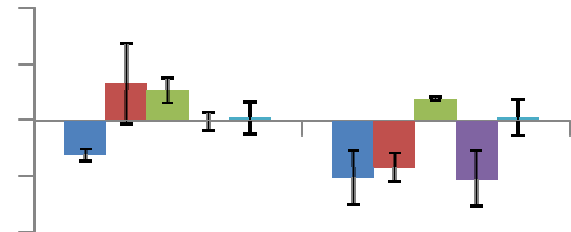
<sup>b</sup> Laboratory of Plasma Derivatives, Division of Hematology, CBER, FDA, 8800 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, USA

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

# Kvantifikační strategie

## 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 = **kalibrátor**
- Určení poměru exprese



- $\Delta\Delta Ct$
- Korekce účinnosti PCR
- Hodnocení skupin vzorků – software REST/REST XL

# Kvantifikační strategie

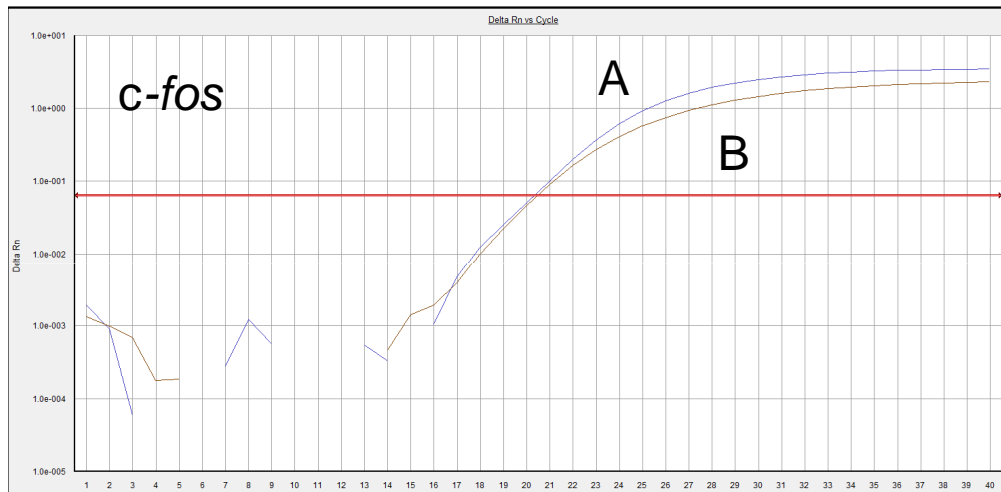
## 2. Relativní kvantifikace $\Delta\Delta Ct$

Bez zahrnutí efektivity jednotlivých reakcí

Předpokládáme 100%

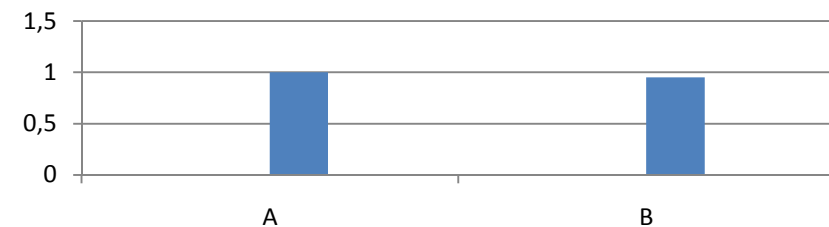
$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}]}$$

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

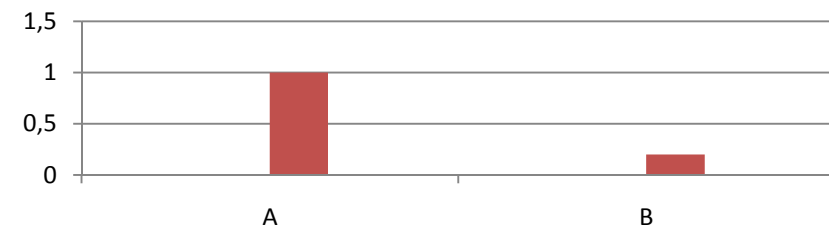


vzorek	c-fos	GAPDH	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	R
A	22,00	18,18	3,82	0	1
B	22,34	15,76	6,58	2,76	1,15

Nonnormalizovaná 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 ( $\Delta E$ ) = 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 ( $\gamma$ )

Histon H3

Tubulin ( $\gamma$ )

Cyklofilin

Mikroglobuliny (B2M)

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 Thyocyty	UV IL2 NO TPA Dexamethason Cholinergní agonisté Kreatin Inzulín Retinová kyselina Růstový hormon Vitamin D Mn <sup>II+</sup>	Karcinom - prsu - cervixu - kolorekta - plic - jater - prostaty - slinivky  Neurodegenerativní onemocnění

Pseudogeny – specifická amplifikace nezávislá na mRNA

# Kvantifikační strategie

## 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

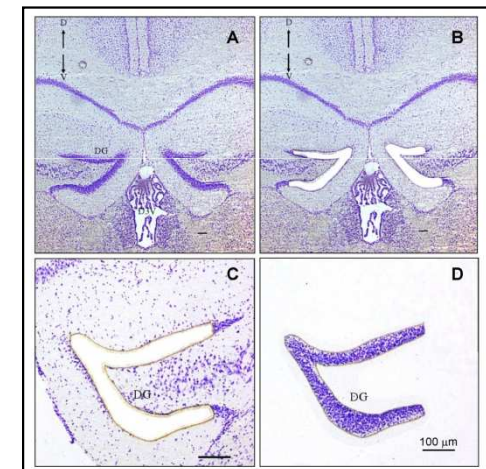
- Normalizace exprese vůči referenčnímu genu
- Výhodou je histologická informace a znalost počtu buněk

### 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)



# Kvantifikační strategie

## 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?



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

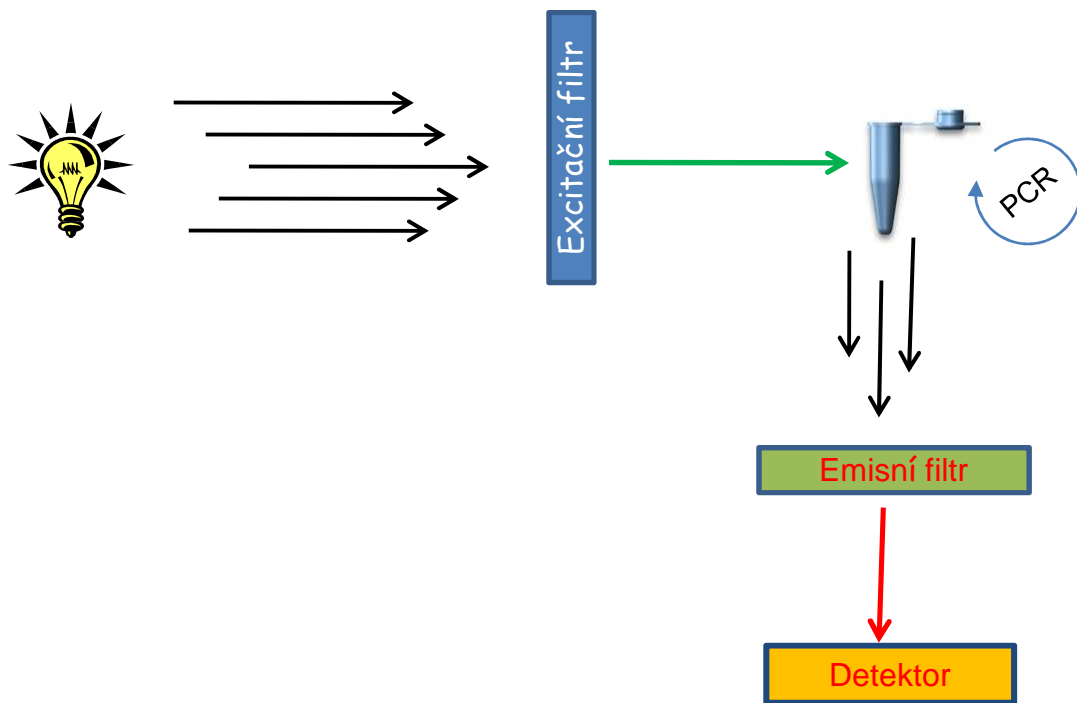


## III. Instrumentace

# Instrumentace

PCR - termocykler

qRT-PCR - termocykler kombinovaný s fluorimetrem



# Instrumentace

## Zdroje excitačního záření

### Halogenová lampa

- Všechny vlnové délky viditelného světla (320nm – 2600nm)
- Uniformní excitace
- př. ABI 7300, 7500, Stratagene Mx4000/Mx3000p, BioRad iCycler
- Normalizace fluorescence (Rox)

### Laser

- Specifická vlnová délka
- Není nutný excitační filtr
- Omezený výběr fluoroforů
- př. ABI PRISM 7700/7900

### LED

- Úzké pásmo vlnové délky (30-40nm)
- Běžné LED emitují na 430, 450, 505, 592, 612 a 637 nm
- nově i modrá a UV část spektra
- př. Corbett Rotor-Gene, Roche Light Cycler



# Instrumentace

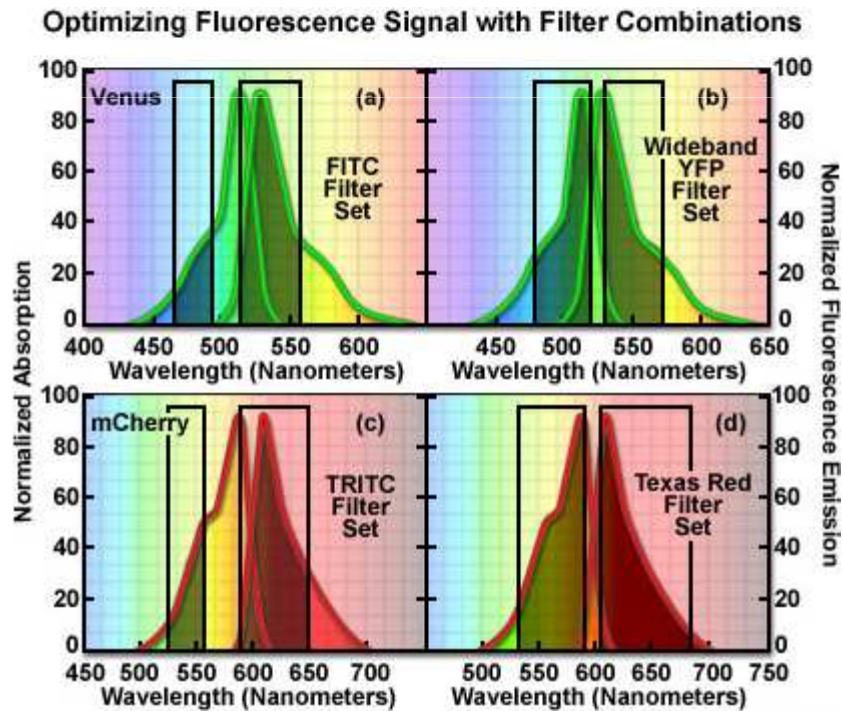
## Filtry

Excitační/emisní – selekce excitační/emisní vlnové délky

Optická kvalita filtru často určuje výkonnost přístroje

Bandpass a Long Pass Filtry

Volba fluoroforu



# Instrumentace

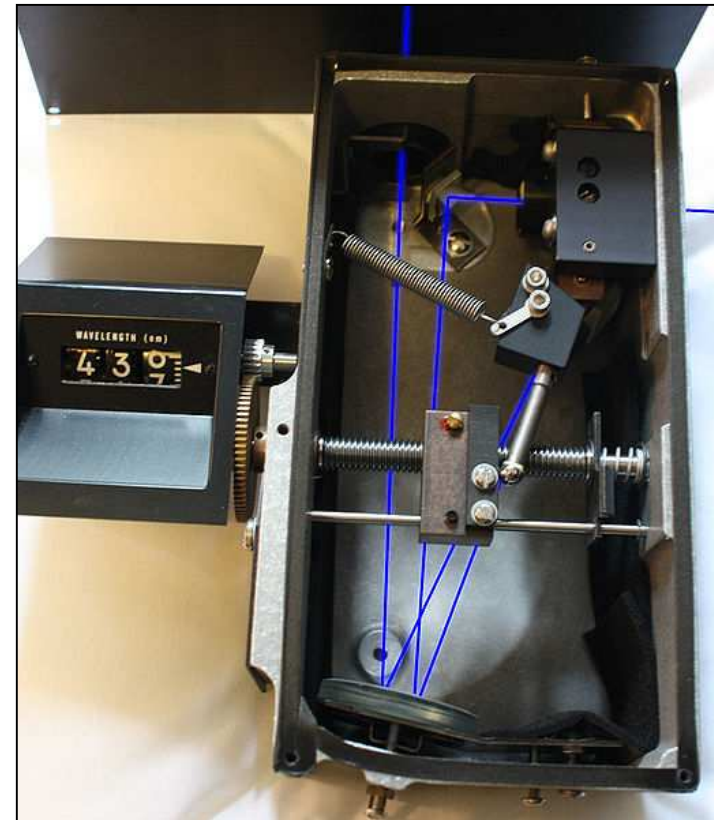
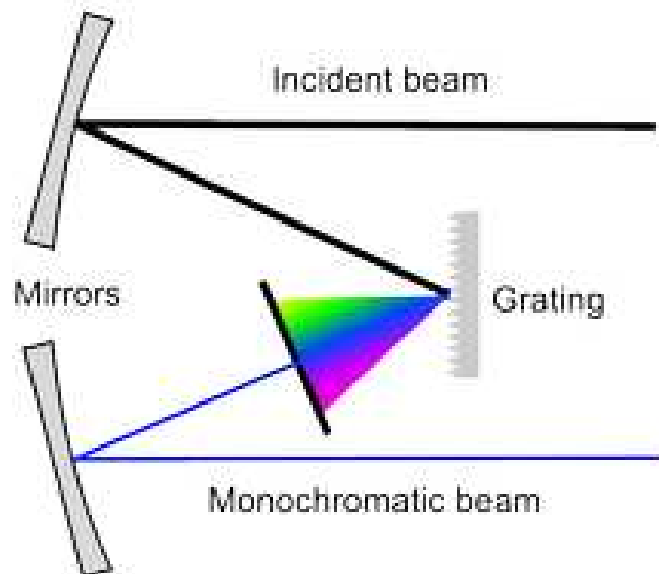
## Monochromátor

Volba libovolné vlnové délky

Difrakční mřížka

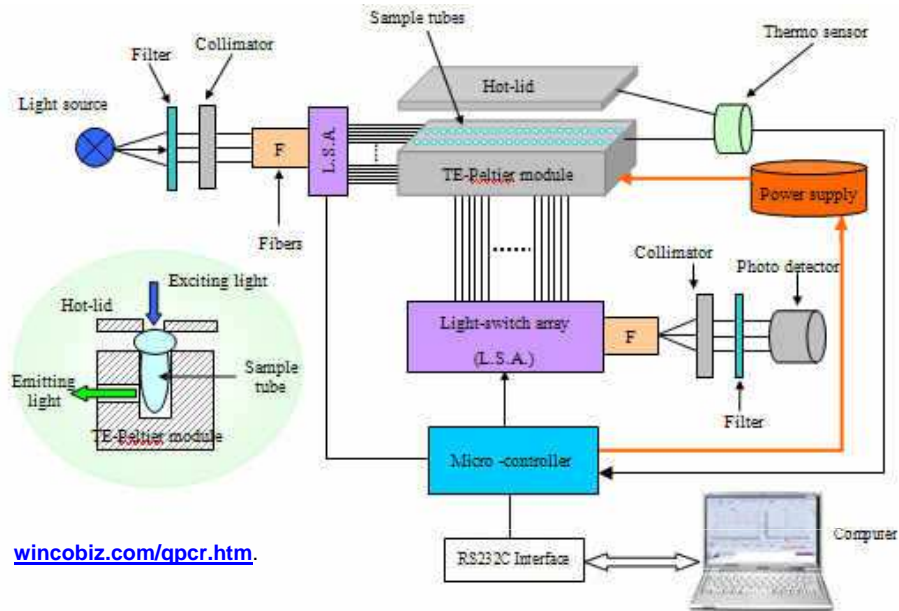
## Fotodetektory

Snímací zařízení (CCD)

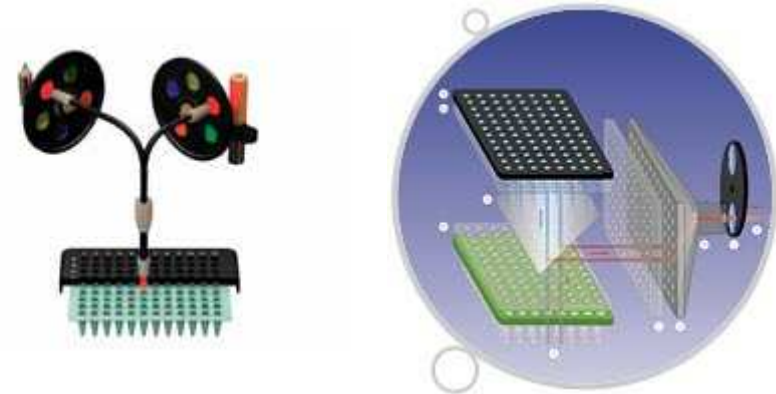
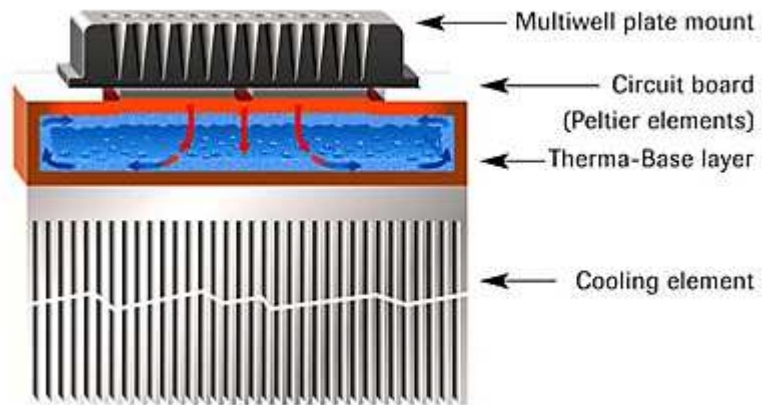


# Instrumentace

## Teplotní uniformita



[wincobiz.com/qpcr.htm](http://wincobiz.com/qpcr.htm)



# Instrumentace

## Parametry RT cyklu

Citlivost – minimální kvantifikovatelné množství templátu – fluorescence, kterou je přístroj schopný odlišit od úrovně pozadí (šum)

Dynamický rozsah – rozsah koncentrací – rozsah intenzity fluorescence

Linearita – intenzita fluorescence je ideálně lineární

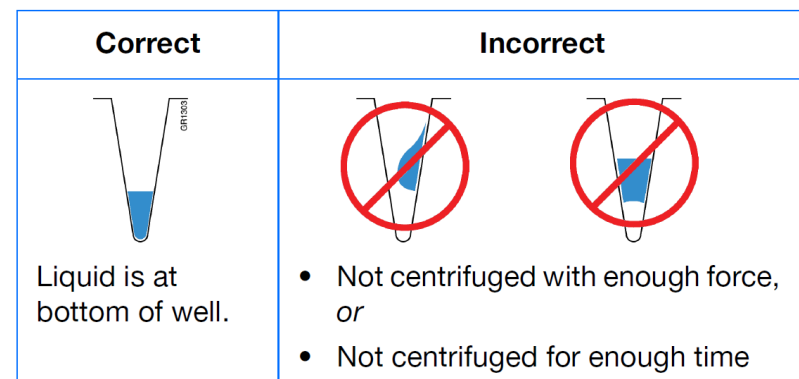
ale:

- koncentrace:

- vysoká koncentrace vzorku – nemusí dojít k excitaci
- i u „normálních“ koncentrací, může dojít k preferenčnímu absorbování světla povrchovými vrstvami vzorku, vzdálenější část vzorku už není excitována světlem o stejné intenzitě

- optická dráha
- laboratorní plastik
- homogenita vzorku

Fluorescenční standardy – kalibrace přístroje



# Instrumentace

## Kalibrace

