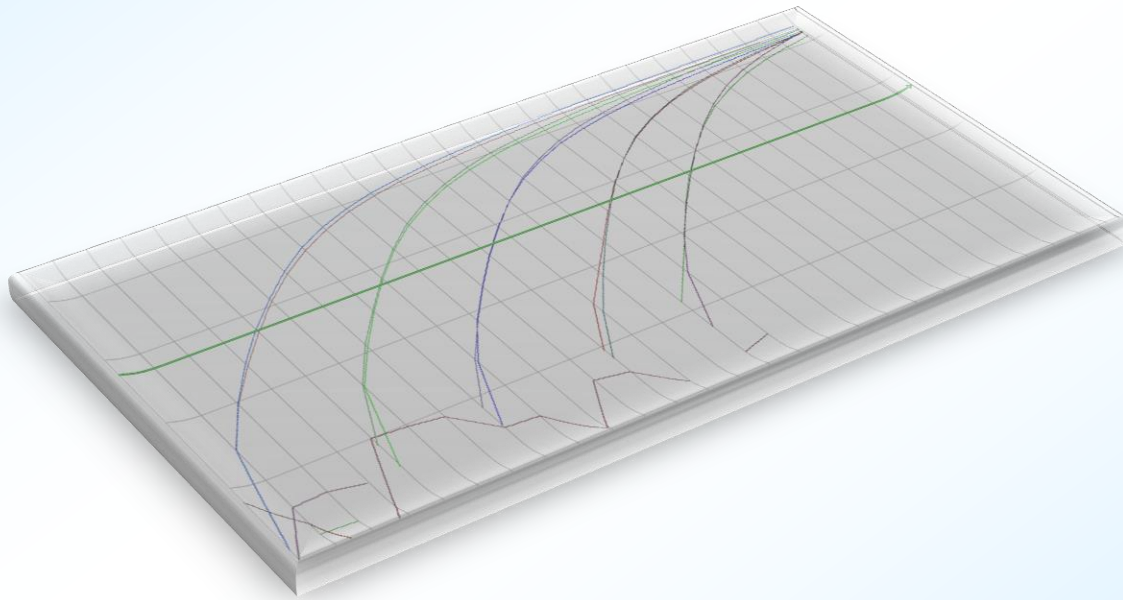


IZOLACE RNA A REAL-TIME PCR



Izolace DNA a RNA

- Získ DNA nebo RNA v dostatečném množství a čistotě
- Kvalita rozhoduje o úspěchu dalších metod
- Vliv metody na další použití

RNA extrakce

- Z čerstvého materiálu
- RNA uskladněna v -80C nebo ve speciálních roztocích
- Zpracovávat 10-20 vzorků
- DNase I ke zbavení kontaminace DNA

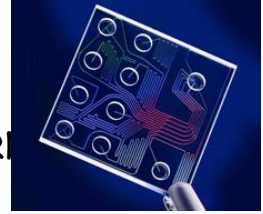
RNA kontrola kvality

- Vysoká čistota (bez kontaminací)
- Vysoká integrita (bez degradace)
- Jakékoliv nečistoty - inhibice PCR (proteiny)
- $OD_{260/280}$ 1.8-2.0 bez proteinů
- $OD_{260/230}$ 1.8-2.0 bez organických nečistot
- $RIN > 7$
- Konsistentně používat čistotu a integritu - redukce variability

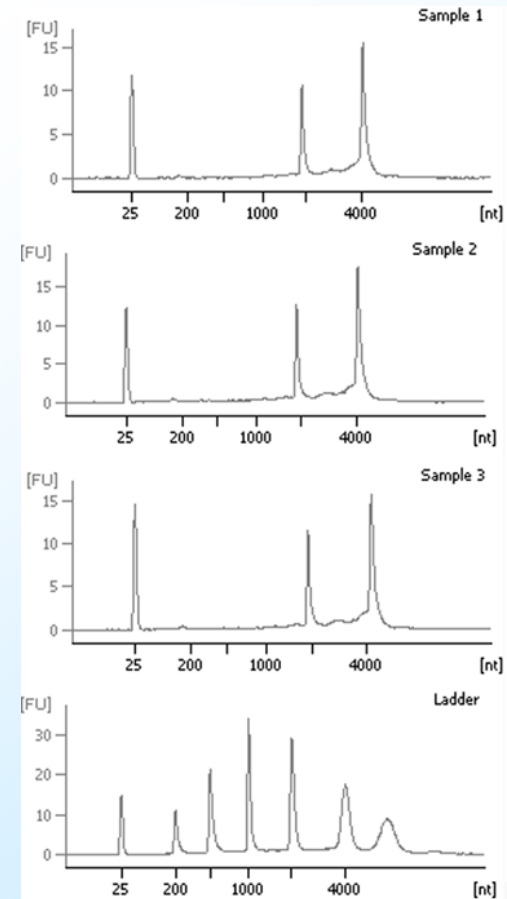
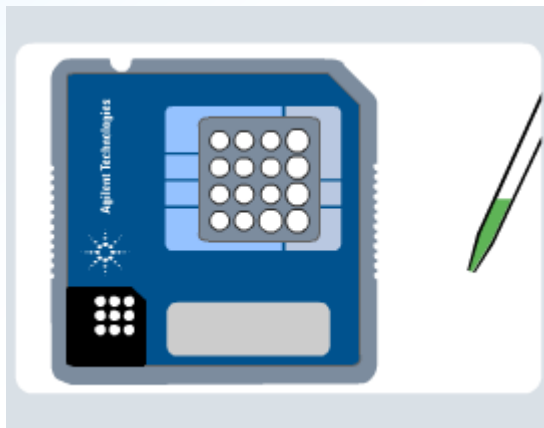
Čistota

- 260/280 nm - 1,8 čistá DNA, 2,0 čistá RNA (nižší - proteiny, fenol)
- 260/230 nm - 2-2,2 (EDTA, fenol)
- Záleží na koncentraci - pokud moc nízká, čistota nebude dobrá

Templát - Izolace RNA



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



RIN

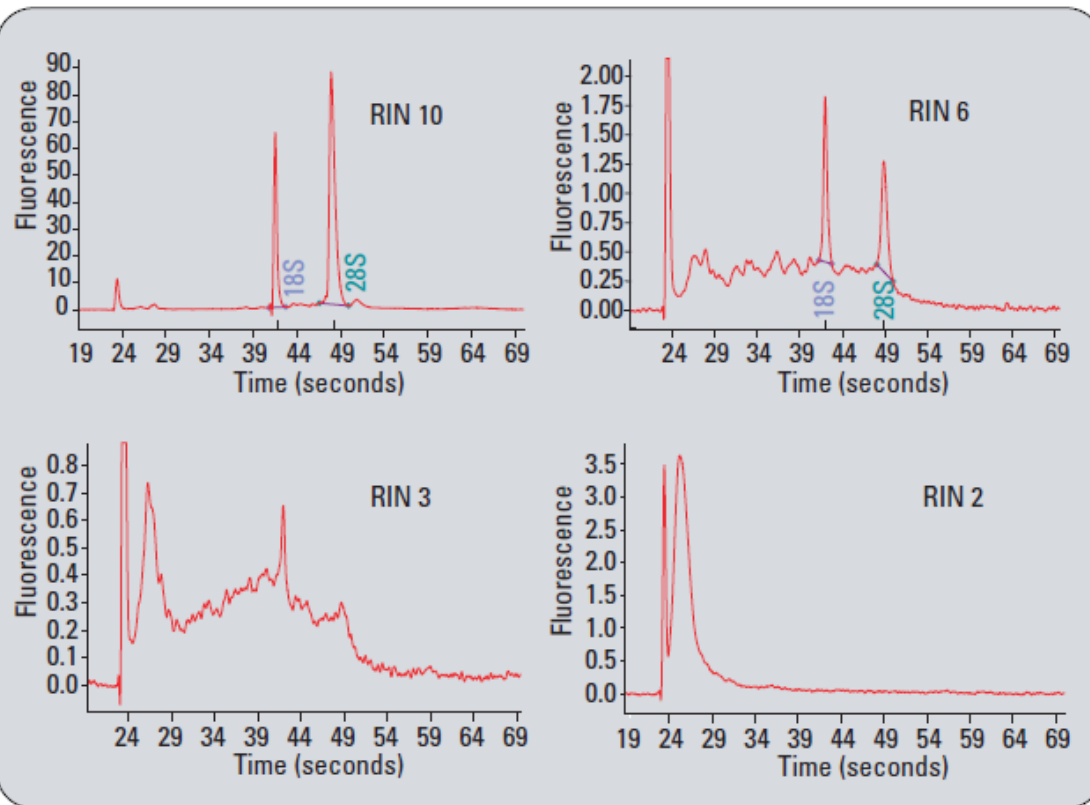


Figure 2
Sample electropherograms used to train the RNA Integrity Number (RIN) software. Samples range from intact (RIN 10), to degraded (RIN 2).

Reverzní transkripce (RT)


- Proces přepisu RNA do cDNA (komplementární DNA)
- Primery, reverzní transkriptáza, dNTP, pufr (Mg^{2+})
- Primery: oligo dT, random hexamers, gene specific
- Reverzní transkriptázy: HIV, AMV, MMLV

RT

- Hned po izolaci
- Vždy stejné množství RNA do reakce a stejně přepsat
- Kontroly:
 - no RT (kontrola kontaminace genomickou DNA)
 - no template control (kontaminace)

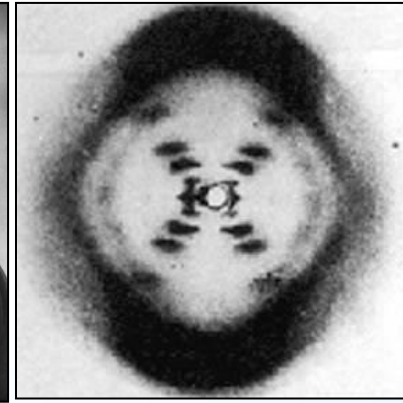
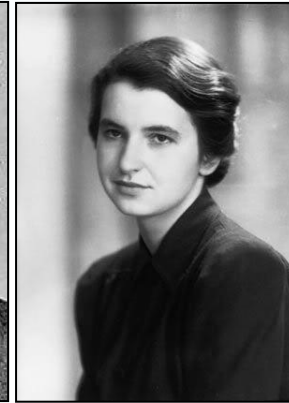
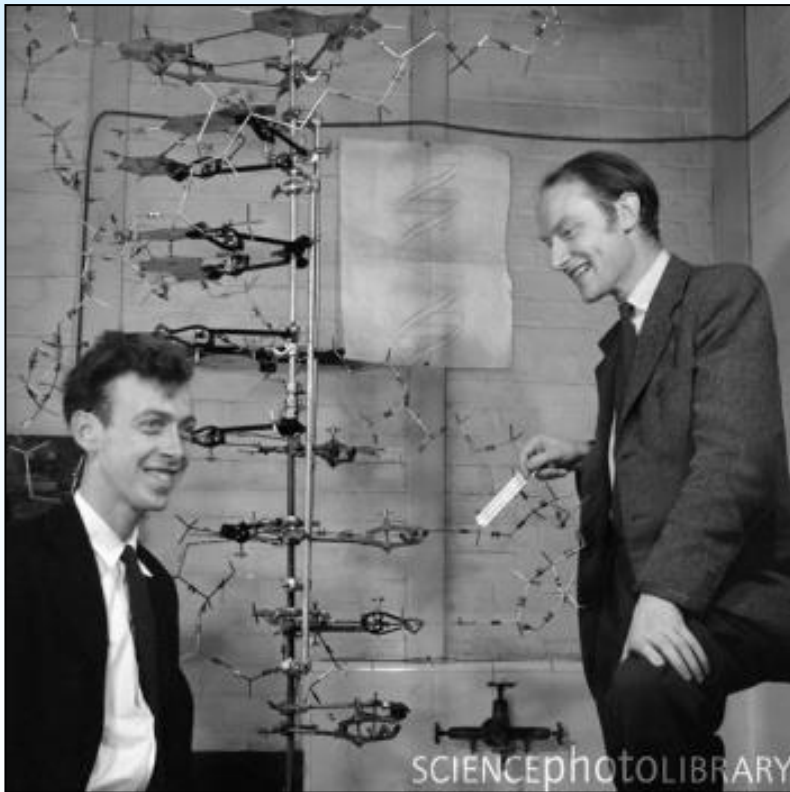
Molekulární technologie

1952	Elektroforéza
1967	<ul style="list-style-type: none">• Rekombinantní DNA• Objev DNA ligázy
1969	FISH
1970	<ul style="list-style-type: none">• Restrikční endonukleázy• Reverzní transkriptáza
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">• Manipulace s genomem Drosophily – P elementy• Whole genome shotgun

1984	Pulzní gelová elektroforéza
1985	 <ul style="list-style-type: none">• PCR• DNA fingertying
1987	<ul style="list-style-type: none">• YACs• Místně cílená mutagenese
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">• Projekt HapMap• Ligační sekvenování
2006	Celogenomové metylační mapy
2007	miRNA
2009	Next Generation Sequencing

What about DNA?

- Maurice Wilkins-James Watson-Francis Crick- **Rosalind Franklin**, 1953
- Dr. Franklin died in 1958
- Nobelova cena Wilkins-Watson-Crick, 1962
- model dsDNA



King's College London



Jakým způsobem zjistíte:

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

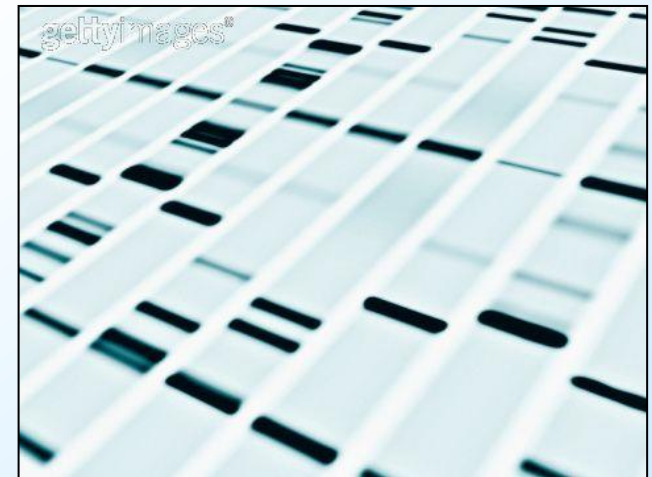


Southern

**Northern
Flowcyt**

**Kultivace, biochemické analýzy
PCR**

Cytogenetické vyšetření



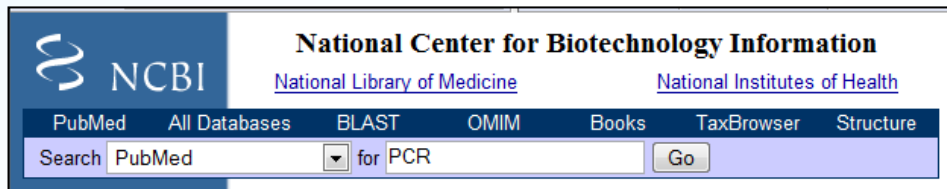
Kary B. Mullis



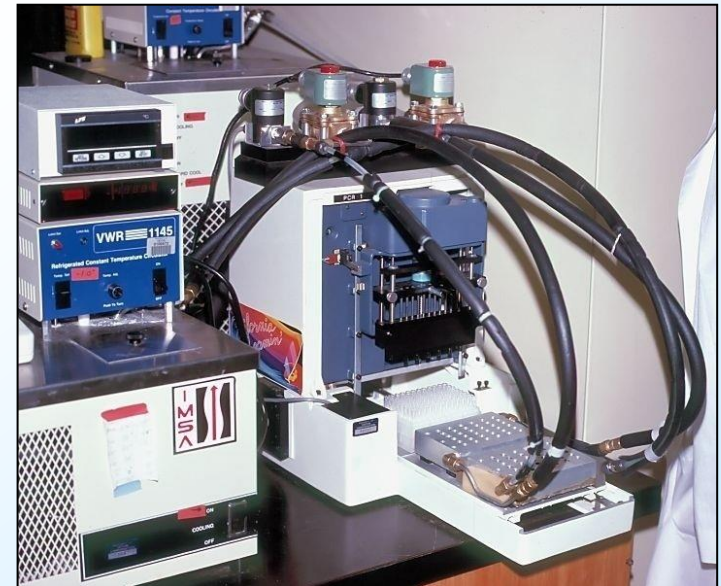
Nobelova cena za chemii
1993



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



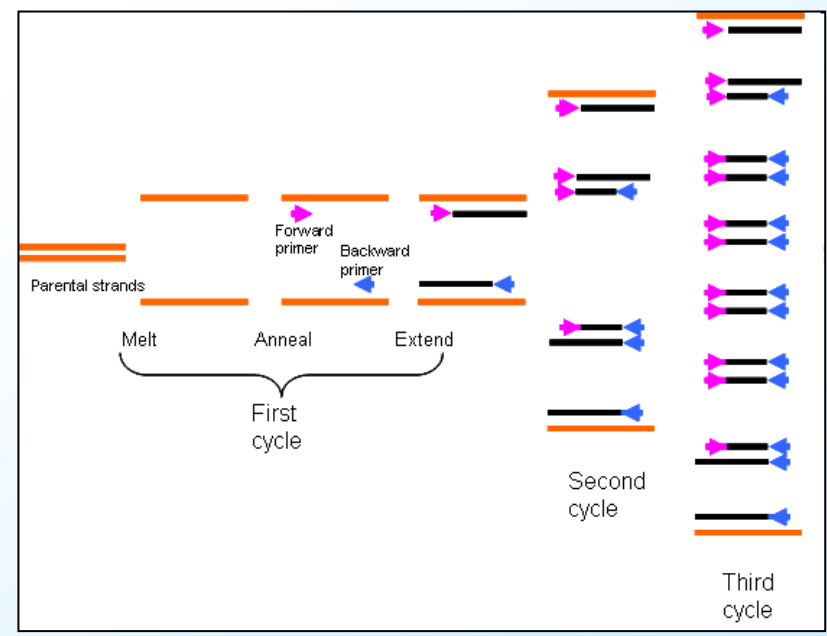
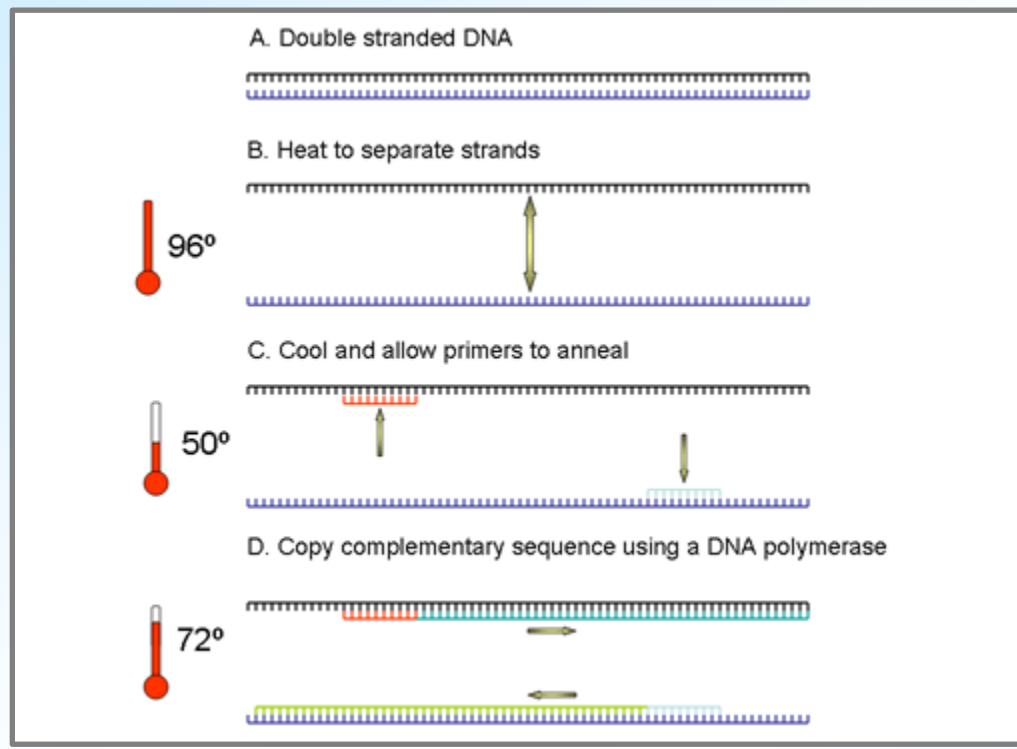
- 363 629 článků (27.11.2008)
- 399 022 (1.12.2009)
- 428 622 (15.12.2011)



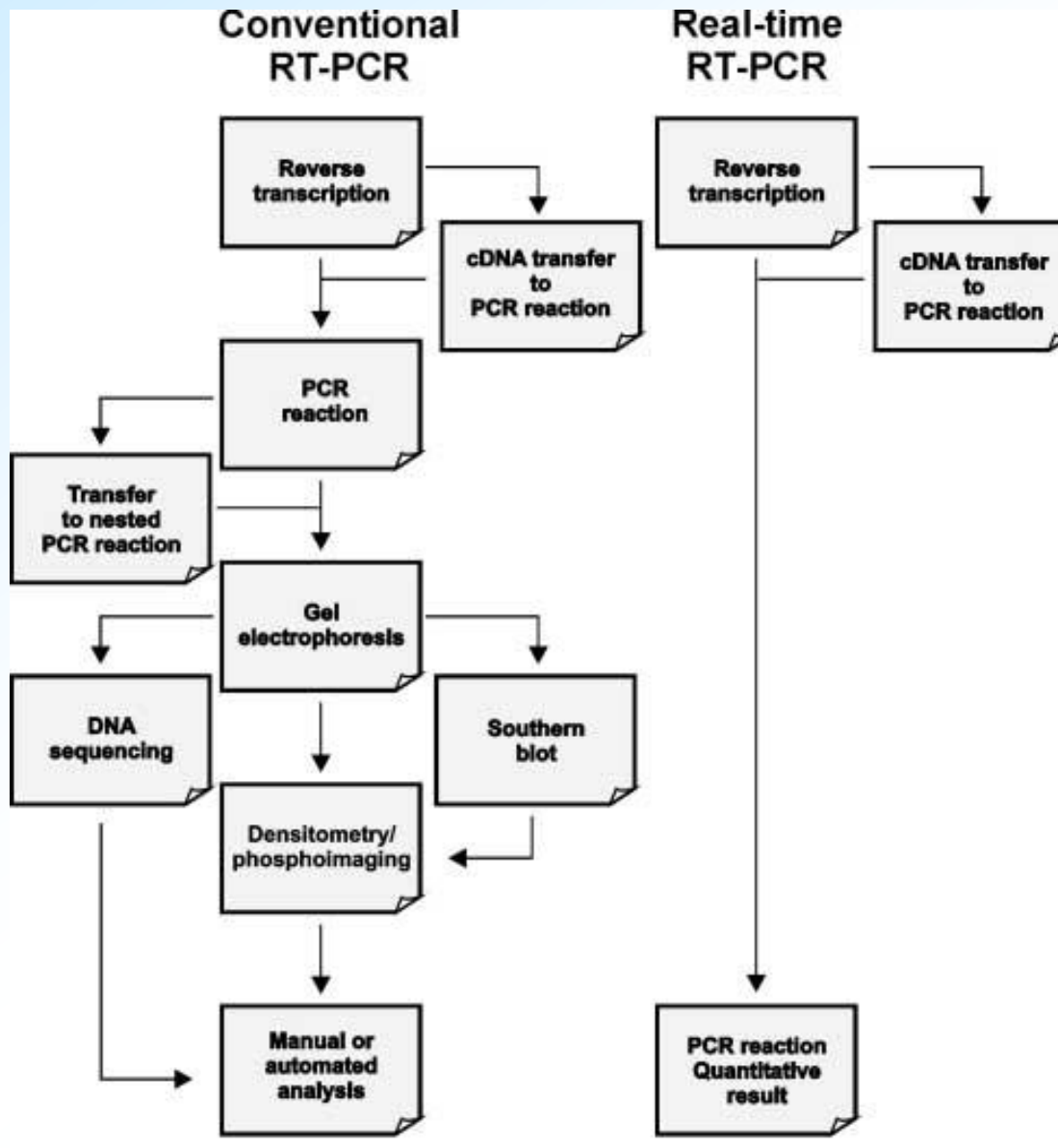
PCR

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

Polymeráza využívá syntetické primery ohraničující amplifikovaný úsek DNA



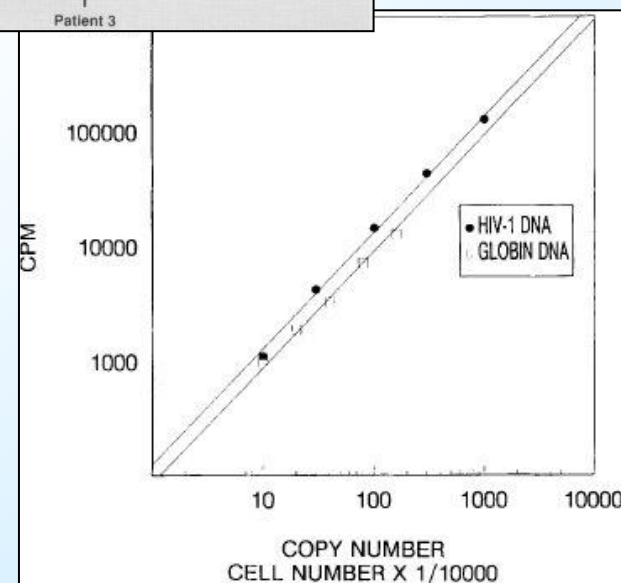
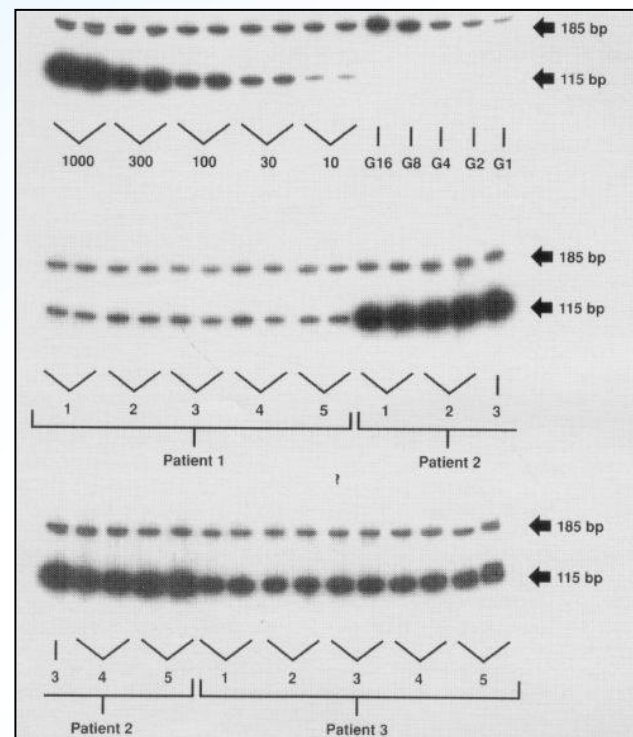
Kvantifikace pomocí PCR



Konvenční kvantitativní PCR

- „End point“ stanovení

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



Zásadní omezení – gelová elektroforéza

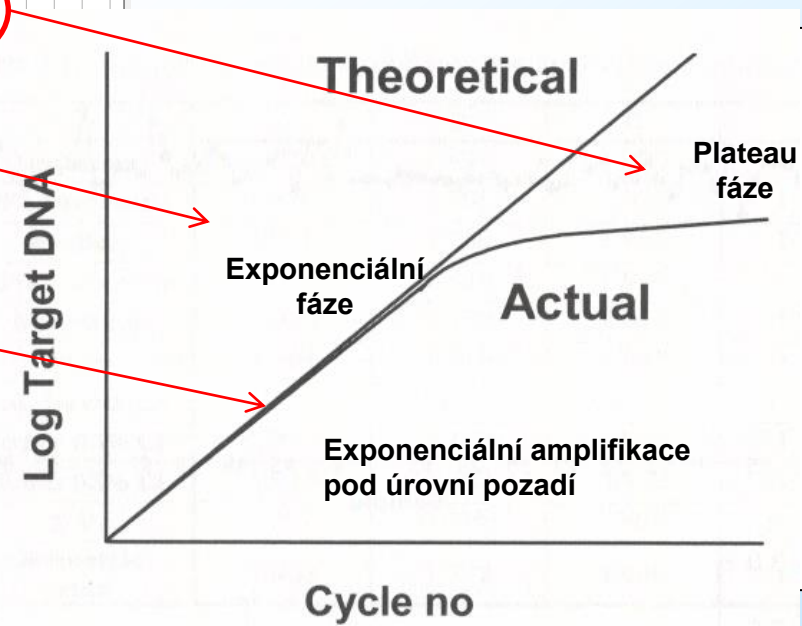


- Nízká přesnost
- Nízká citlivost
- Malý dynamický rozsah – pouze 2log.
- Nízké rozlišení, pouze na délce amplikonu
- Není automatizovaná
- Výstup není numerický – subjektivní hodnocení
- EtBr – neváže se na DNA pravidelně
- Post PCR zpracování - kontaminace

Kvantitativní vztah mezi

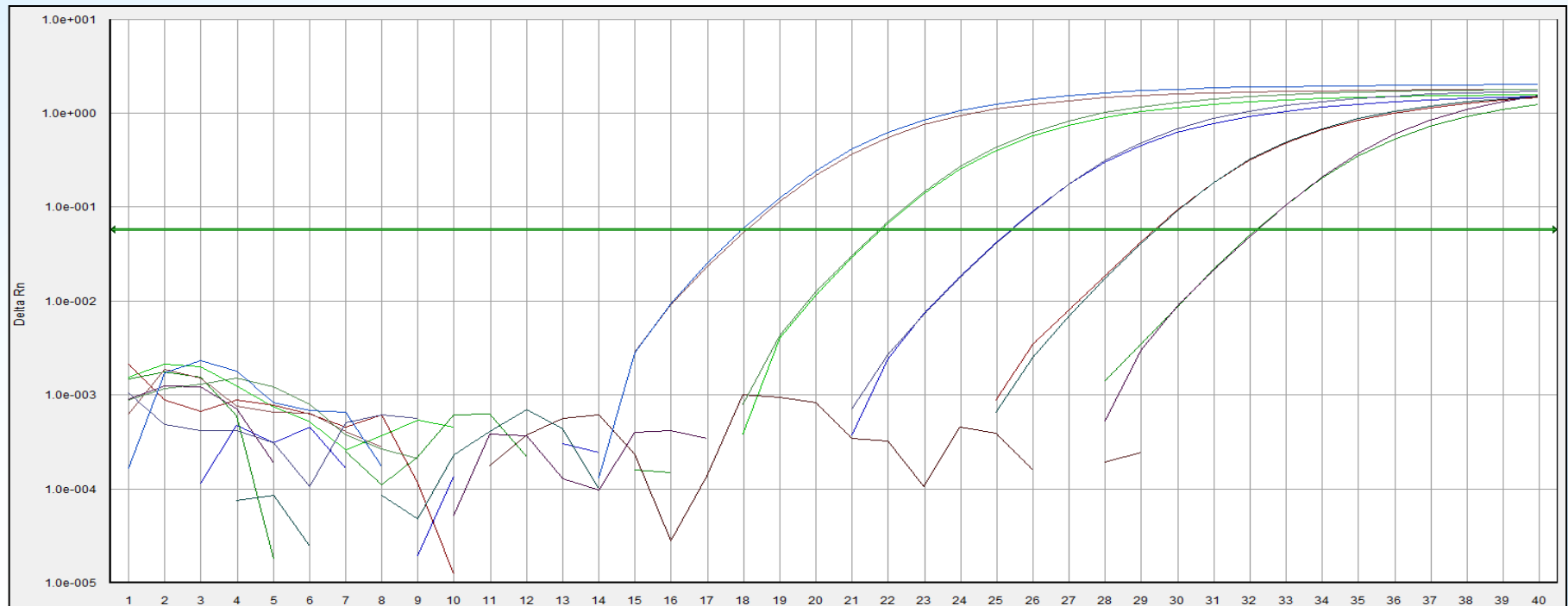
množstvím PCR produktu (amplikonu) a intenzitou fluorescence

- Amplifikační práh detekce (Ct)



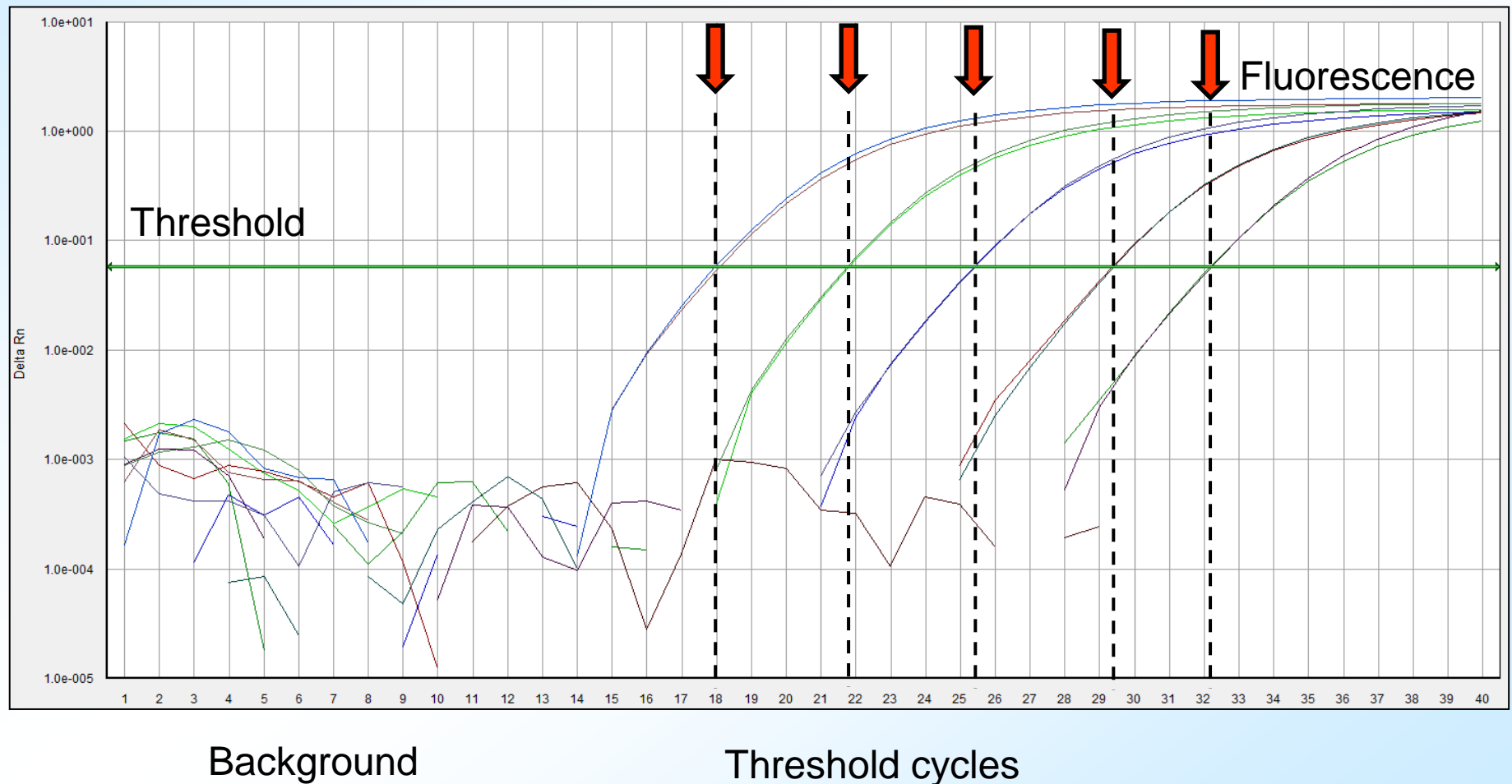
Real-time Fluorescence Based PCR

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



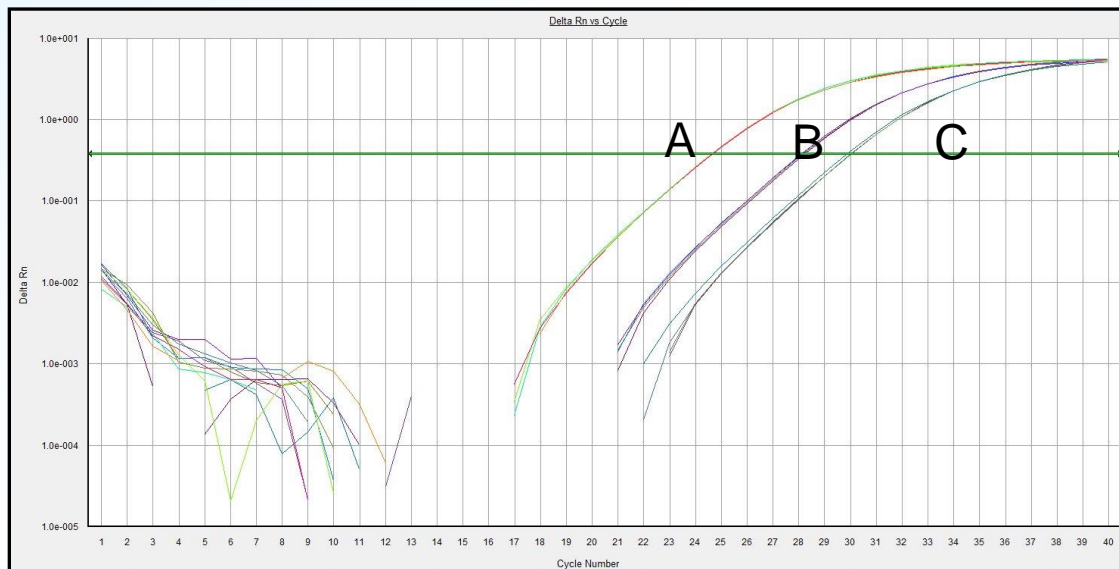
Threshold cycle „Ct“

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



Threshold 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



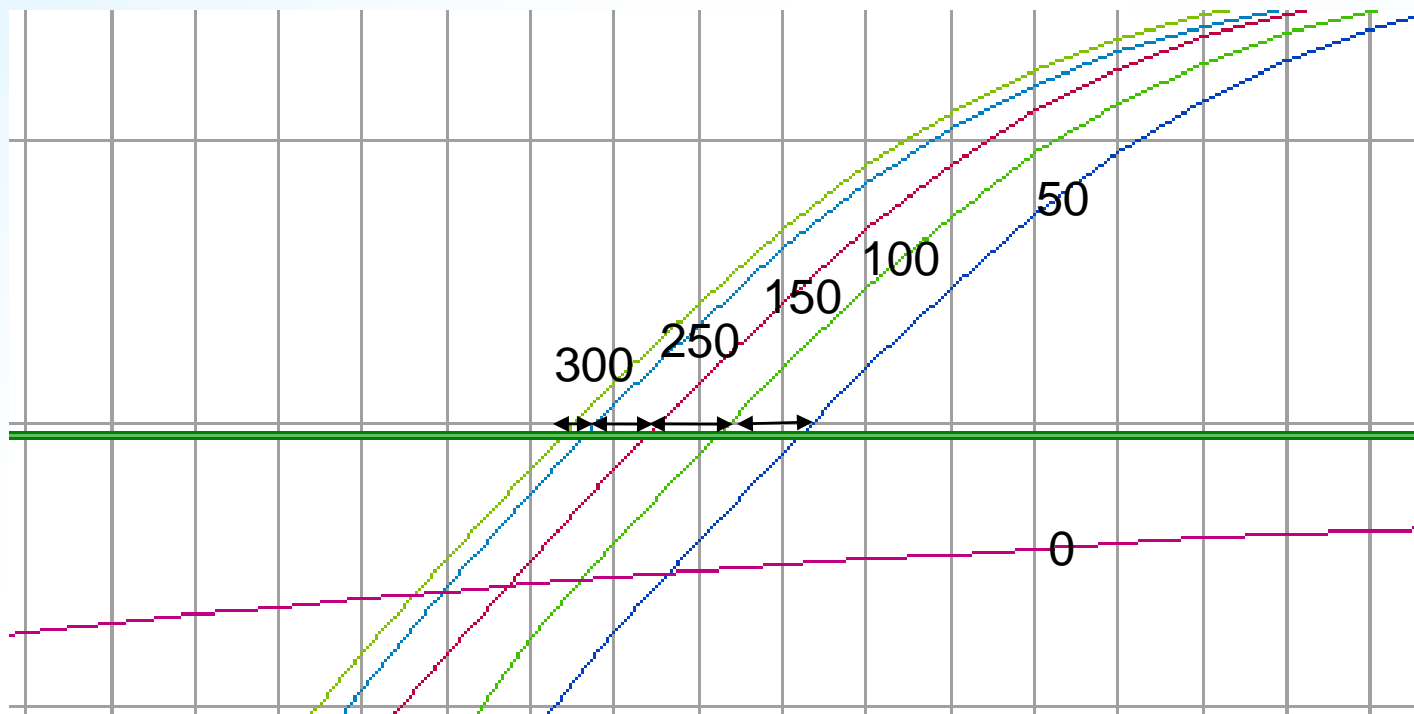
A > B > C

Threshold cycle „Ct“

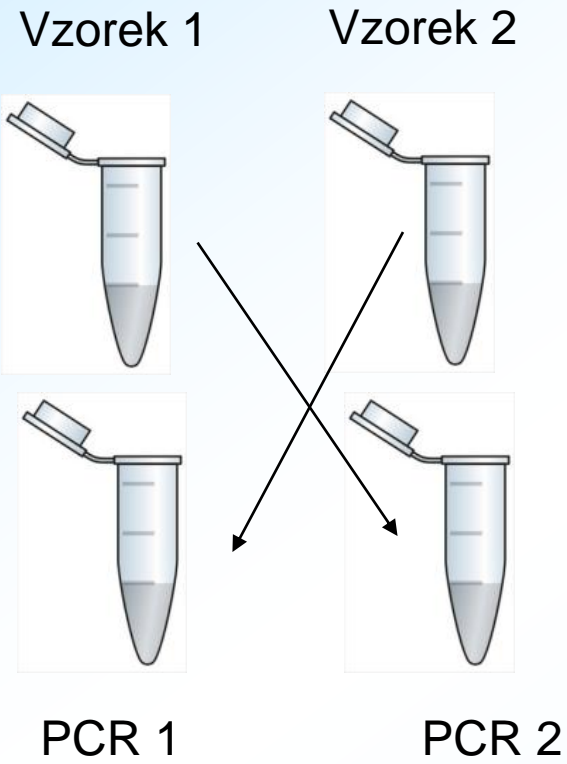
- rozdíl 1 Ct – dvojnásobné množství templátu $2^1 = 2$
- kolika cyklům odpovídá odpovídá 10ti násobný rozdíl v množství templátu?

(předpokládáme 100% účinnost PCR) $2^n = 10$

n=3,32



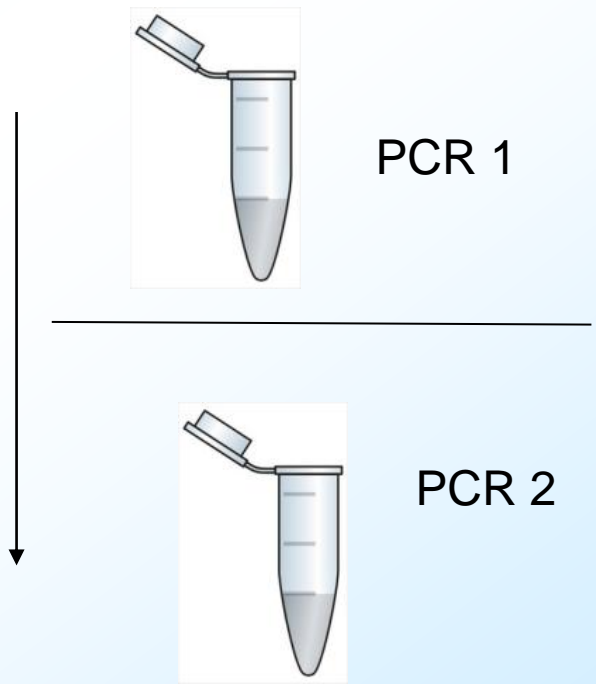
Cross contamination



Vzájemná
kontaminace
vzorků

Přenos amplikonu
do dalších PCR

Carry-over contamination



Jak předejít kontaminaci

- Správná laboratorní praxe
- Plastik v RNA kvalitě
- Automatizace



×

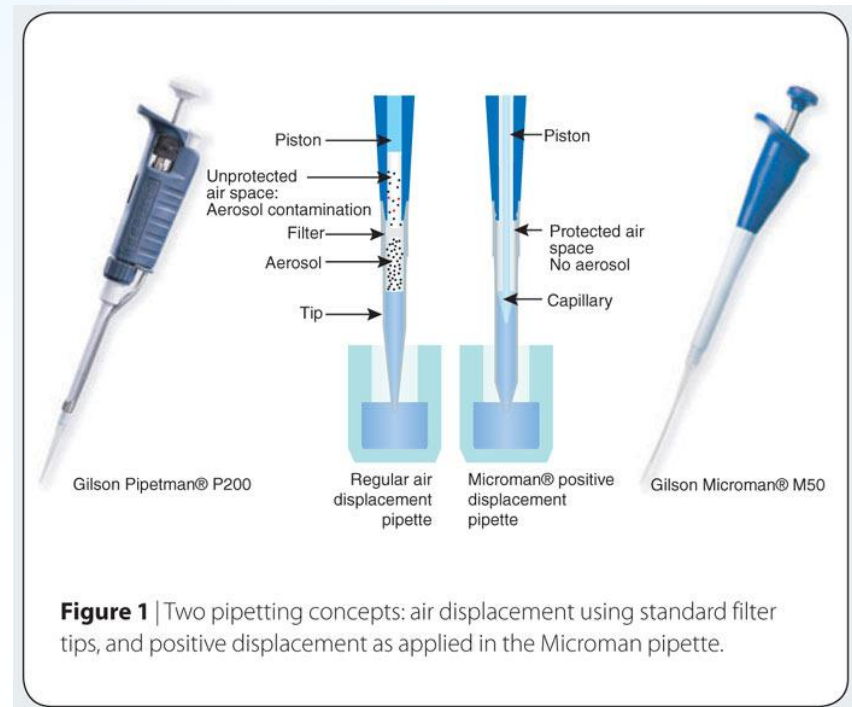
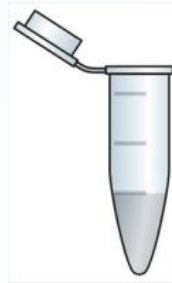


Figure 1 | Two pipetting concepts: air displacement using standard filter tips, and positive displacement as applied in the Microman pipette.

