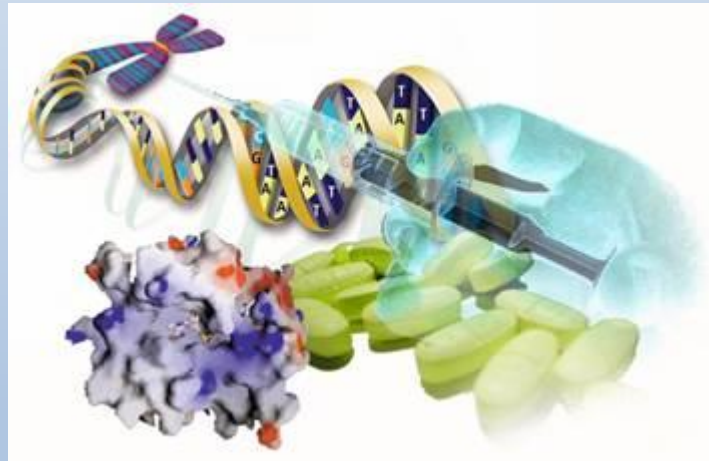


# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



VI. Aplikace qRT-PCR

## 1. Detekce DNA

- Diagnóza infekčních onemocnění (přítomnost patogenů v krvi, séru, plazmě ...)
- Sledování minimální reziduální nemoci
- 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

## 4. Detekce miRNA

# Aplikace

## Aplikace v klinické mikrobiologii

Diagnóza - rychlá, citlivá a přesná determinace patogenů

Klasické kultivační 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

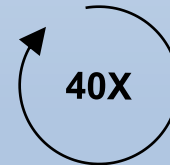
2x SYBR green Master Mix (Applied Biosystems)	26,0μl
Forward primer (10μM)	2,0μl
Reverse primer (10μM)	2,0μl
PCR grade H <sub>2</sub> O	15,0μl
Vzorek DNA nebo standard	5,0μl

### 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  $5 \times 10^1$  ge; dynamický rozsah  $10^1$ - $10^4$  ge
- Hybridizační analýzy - detekční limit  $2 \times 10^1$  ge; dynamický rozsah  $10^1$ - $10^4$  ge

### Inter- a intra assay variabilita >40%

- qRT-PCR - detekční limit  $1 \times 10^1$  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 $\mu$ l

Qiagen One Step RT-PCR Buffer (5x) 5,0 $\mu$ l

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

Forward primer (10 $\mu$ M) 2,0 $\mu$ l

Reverse primer (10 $\mu$ M) 2,0 $\mu$ l

Sonda (20 $\mu$ M) 0,2 $\mu$ l

PCR grade H<sub>2</sub>O 8,8 $\mu$ l

Vzorek DNA nebo standard 5,0 $\mu$ l

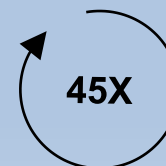
### PCR

50°C 20min (Reverzní transkripce)

95°C 15min (Aktivace polymerázy)

95°C 15s

60°C 1min

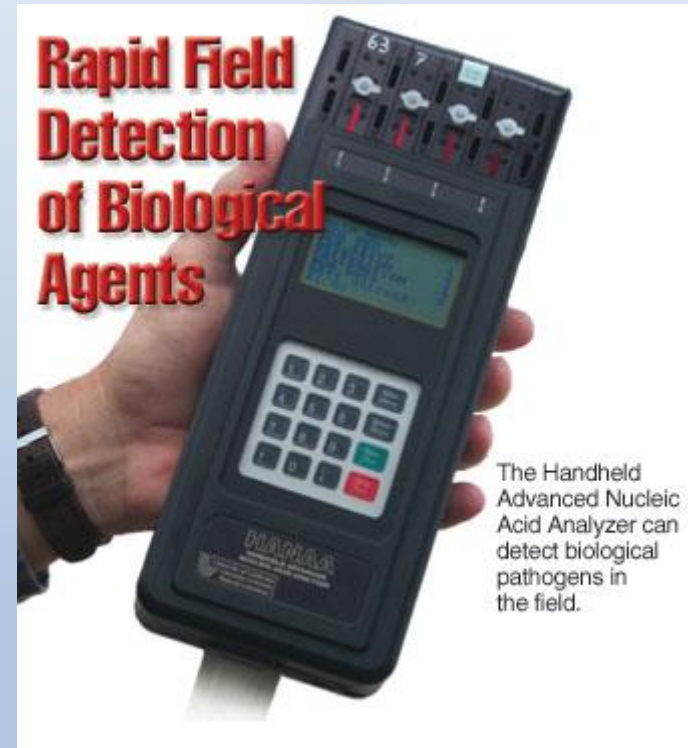


## Terénní qRT-PCR

- Detekce patogenů mimo laboratoř
- Komerční specializovaná řešení
- „Lab on chip“



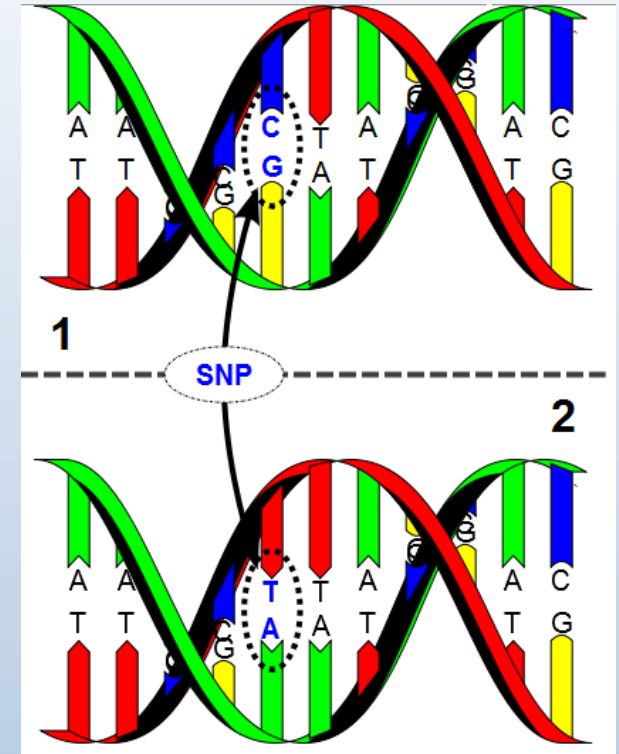
<http://www.idahotec.com/BioDefense/>



# 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/>
  
- Detekce
  - Taqman
  - SNP microarray





## SNP genotypizace pomocí real-time PCR

Zejména molekulární majáky a TaqMan sondy

End-point analýza

- 2 alelově specifické sondy které mají specifické fluorofory a PCR primery, které detekují specifický target
- Vysoká specificita
- Proby s MGB (minor groove binder, 3') – zlepšují hybridizaci stabilizací vazby MGB s templátem
- Proby cca 13bp

# Aplikace

## SNP genotypizace pomocí real-time PCR

Zejména molekulární majáky a TaqMan sondy

End-point analýza

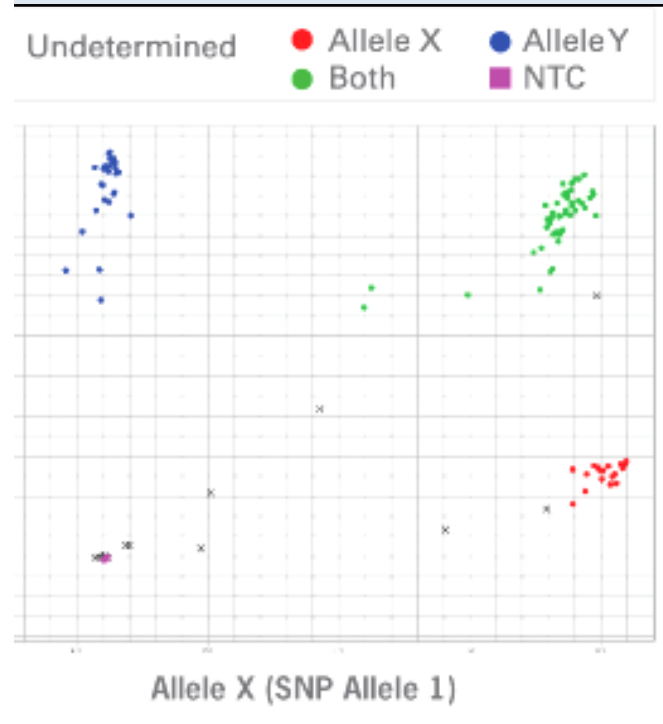
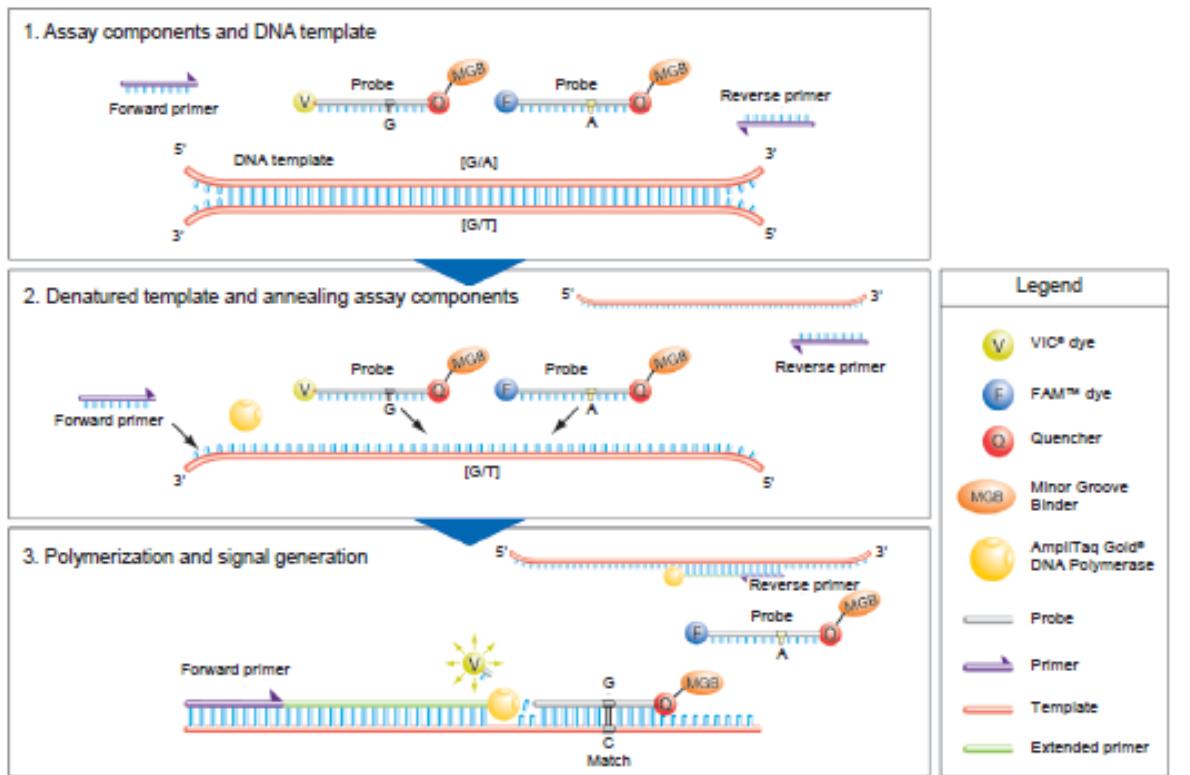


Figure 1. Allelic discrimination is achieved by the selective annealing of TaqMan<sup>®</sup> MGB probes.

## SNP genotypizace pomocí real-time PCR

Zejména molekulární majáky a TaqMan sondy

End-point analýza

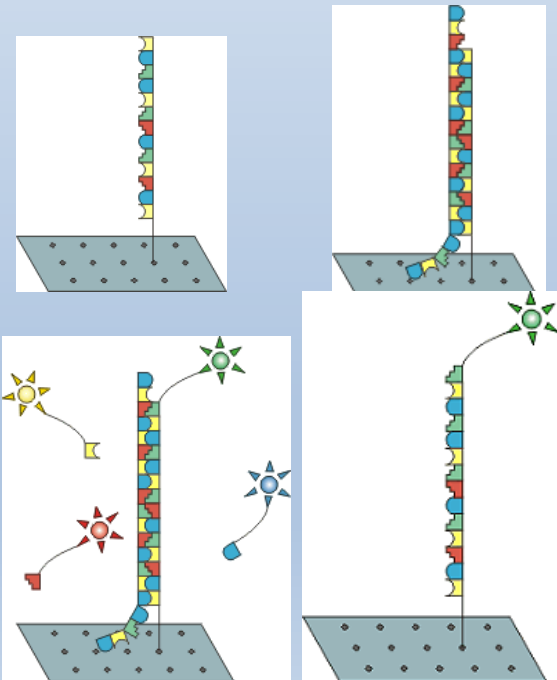
- Detekce pomocí dvou majáků – 1 se váže na wt alelu, druhý na mutantní alelu
- Různé fluorofory



## SNP genotypizace

### APEX (Arrayed primer extension)

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

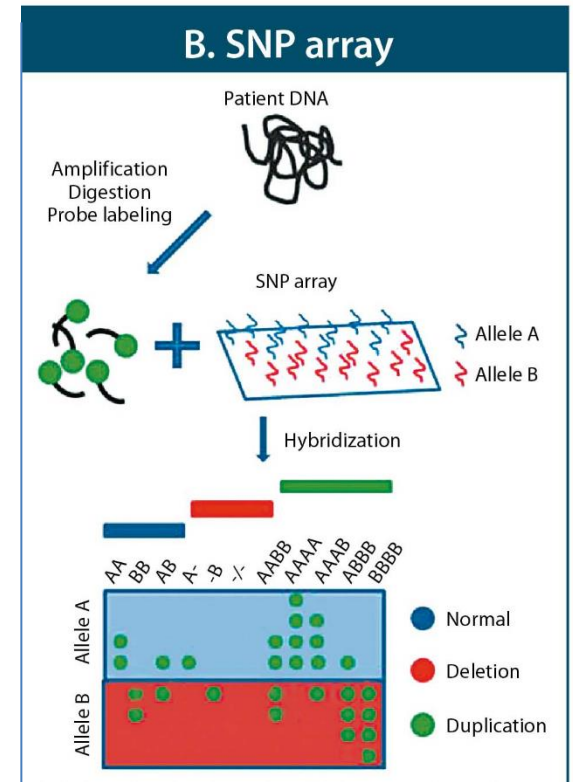


# Aplikace

## SNP genotypizace

SNP array

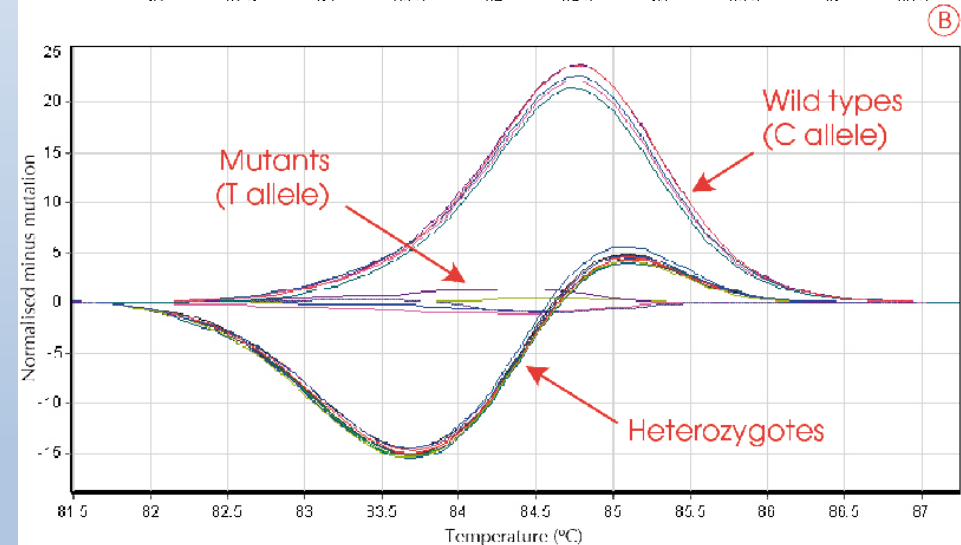
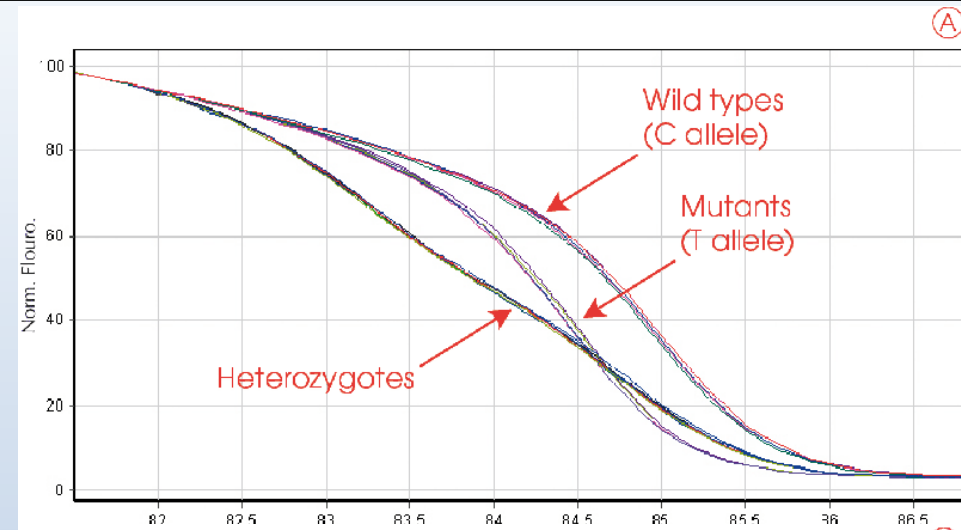
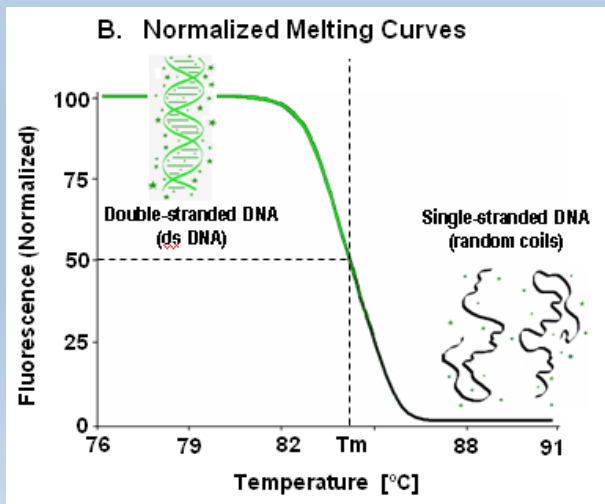
Array pomocí použití tisíce prob



# 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

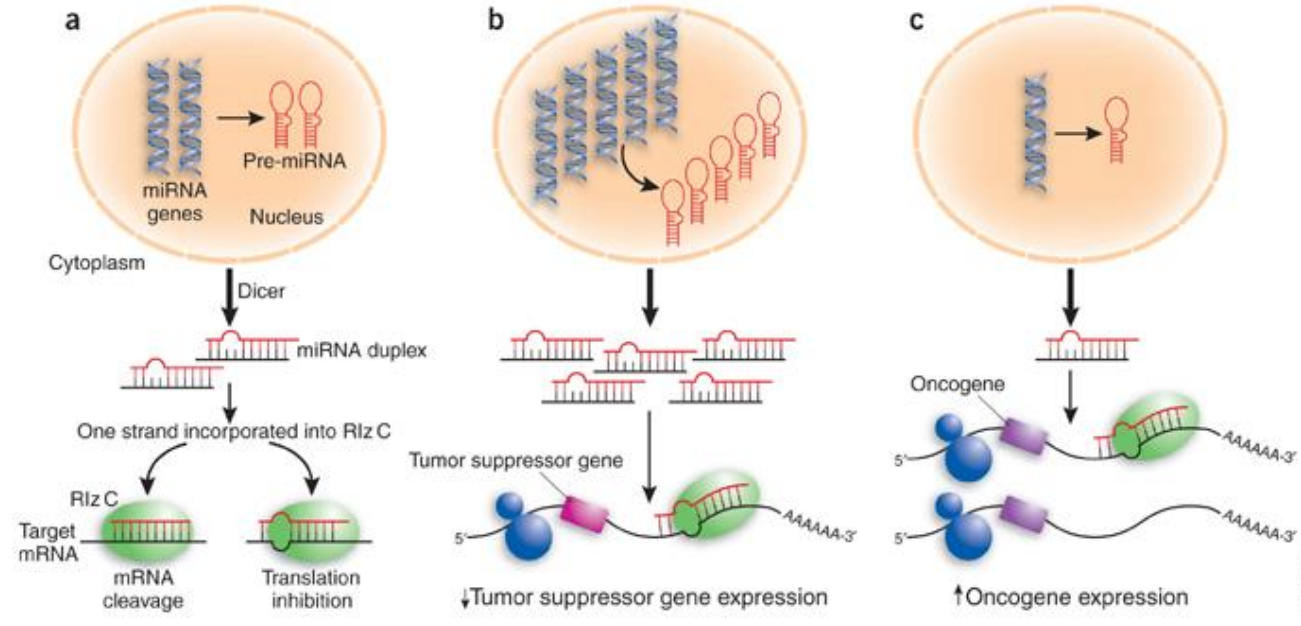
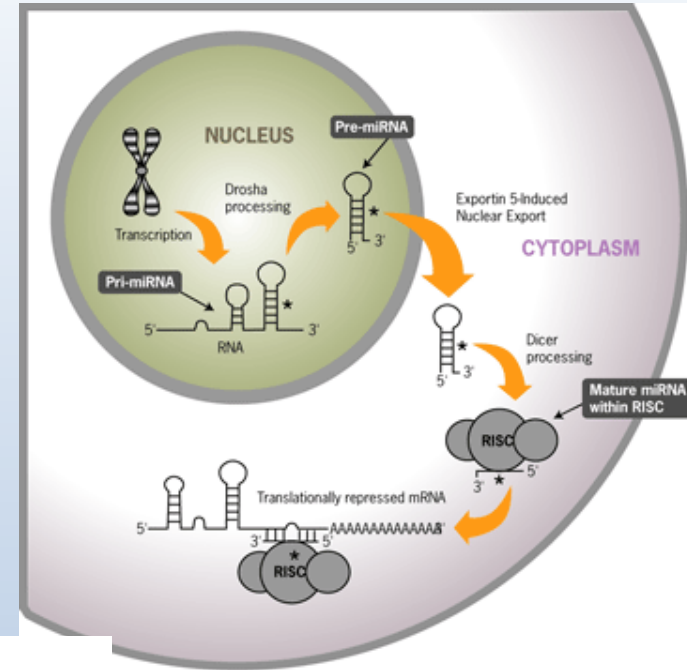


# Aplikace

## miRNA detekce

### MikroRNA (miRNAs)

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



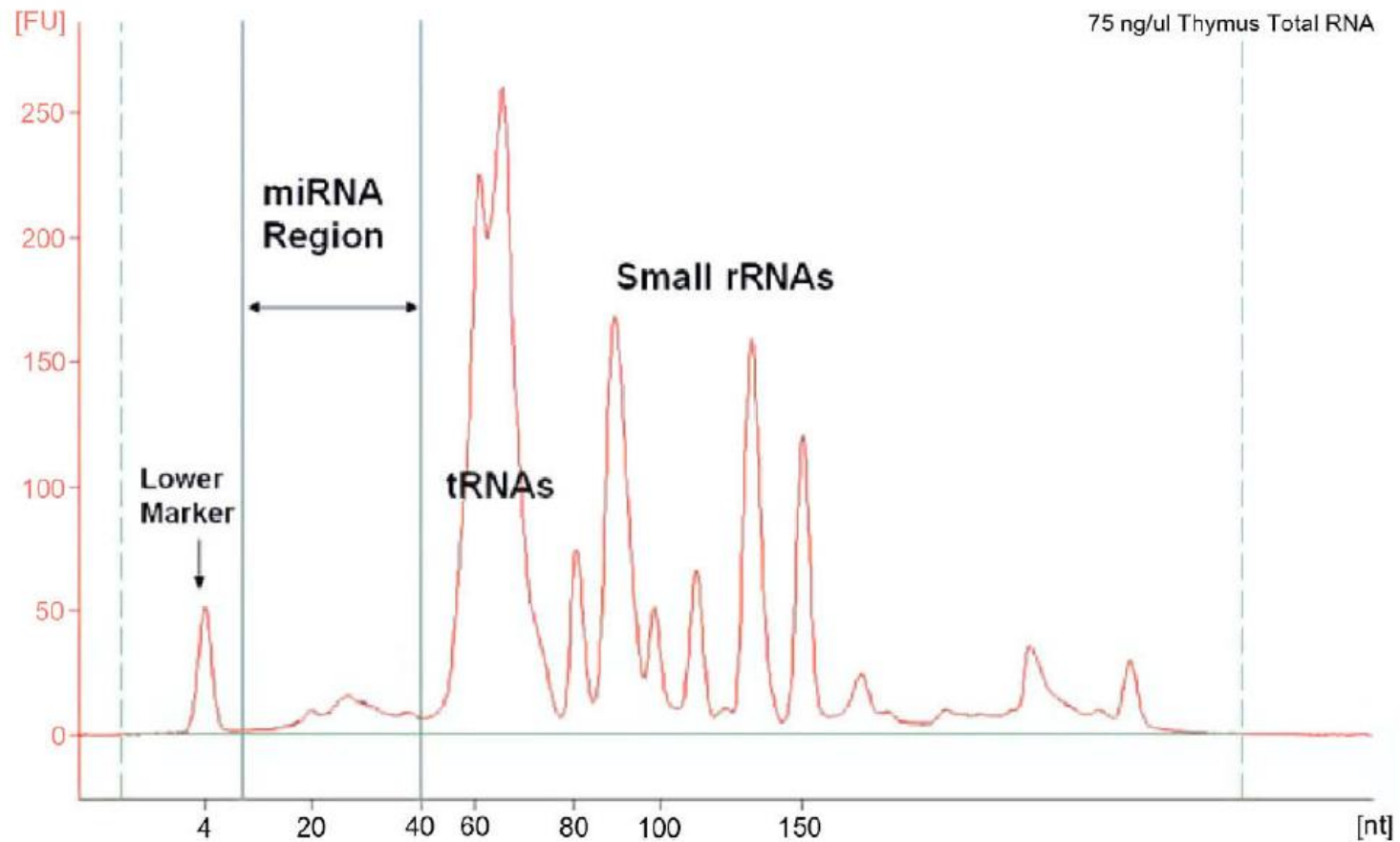


Fig. 1A. Image of a typical electropherogram for small RNA analysis performed with the Small RNA Assay on the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) (<http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5989-7002EN.pdf>).

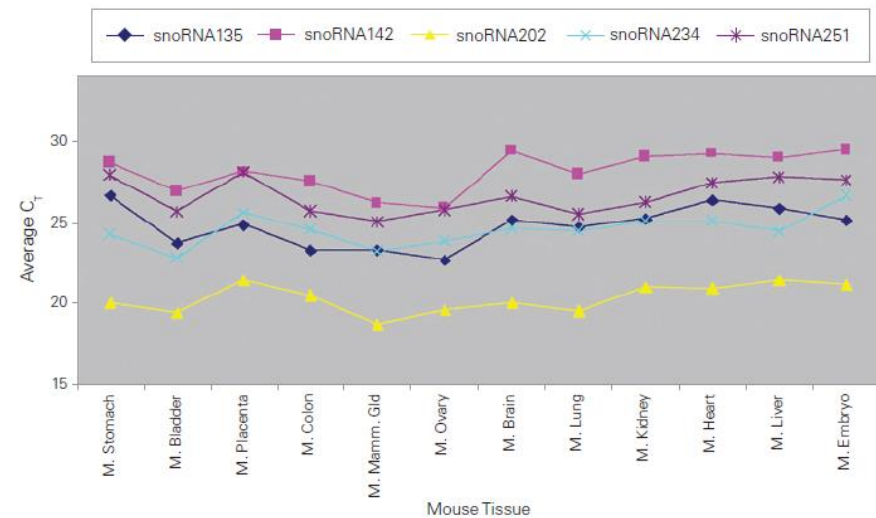
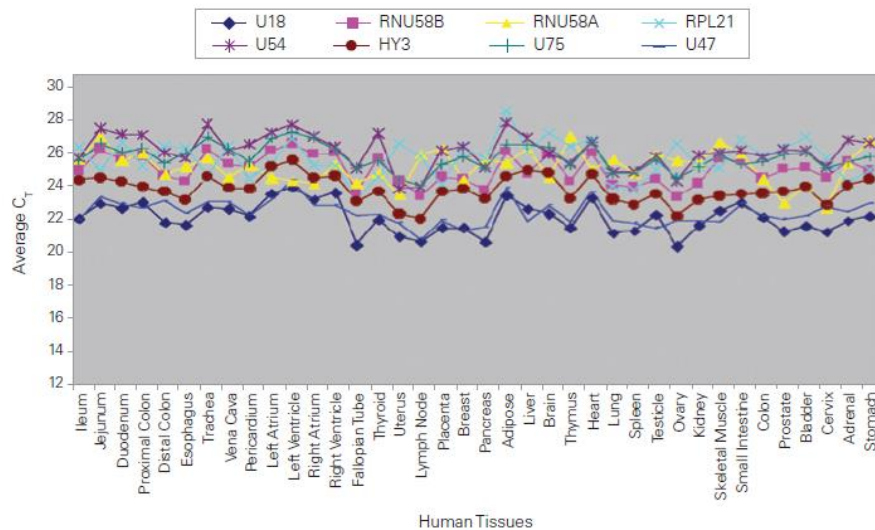
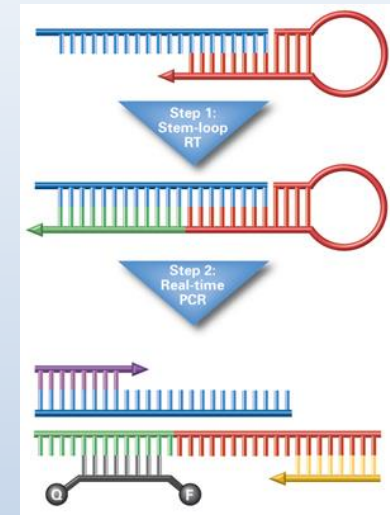


# Aplikace

## miRNA detekce

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

Endogenní kontrola: malá jaderná RNA (snRNA)



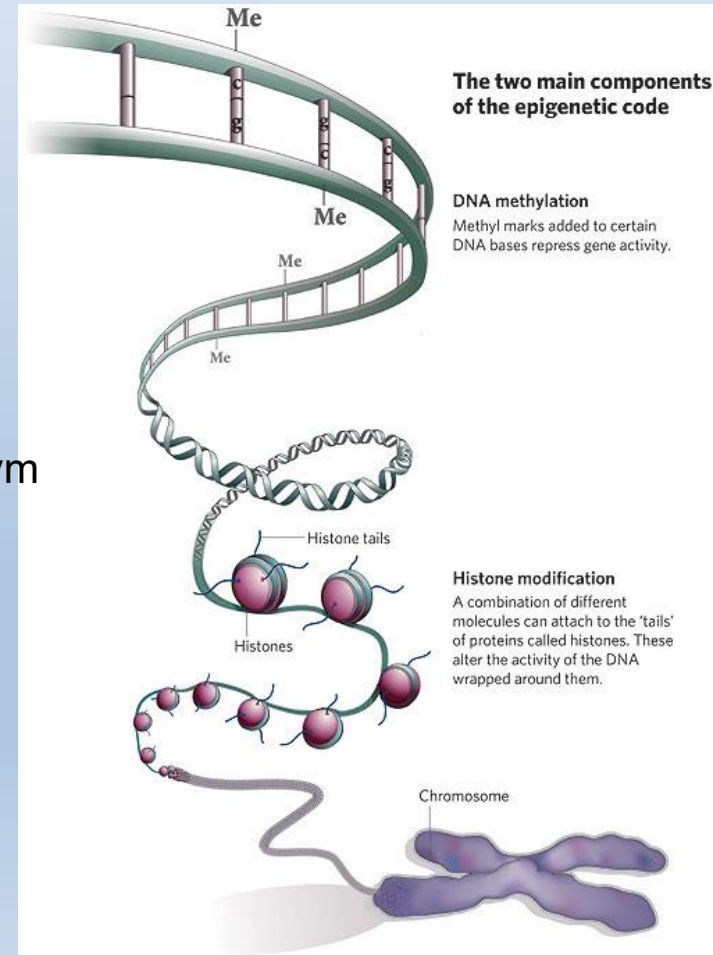
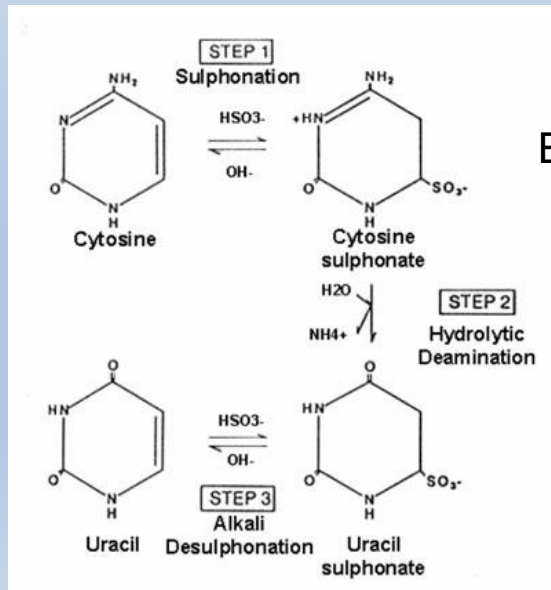
# Aplikace

## 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**  
**<sup>m</sup>C intaktní**

Endonukleázy citlivé metylovaným sekvencím  
BsoFI, HpaII, MspI and HhaI



# Aplikace

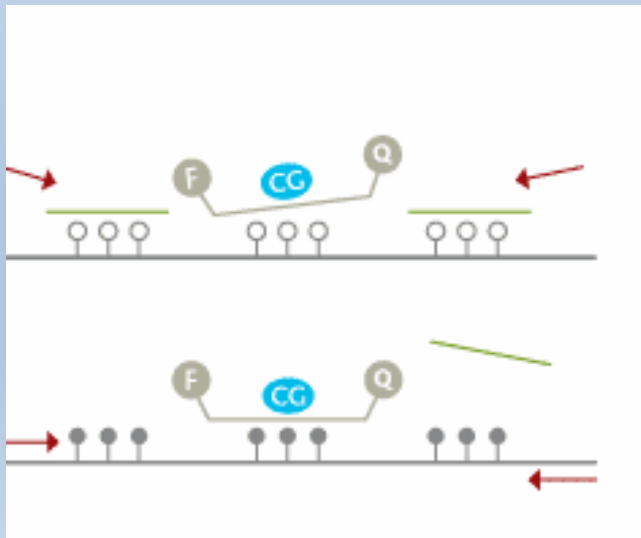
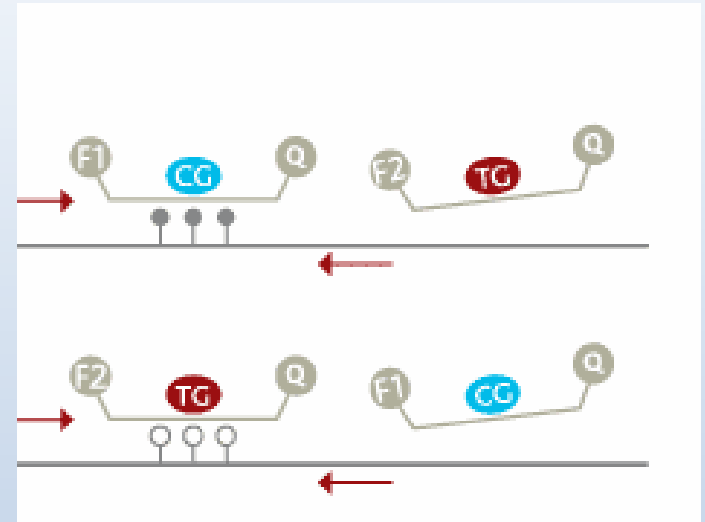
## Kvantitativní analýza DNA metylací pomocí real-time PCR

Nemetylované cytosiny jsou konvertovány na U bisulfitovou metodou

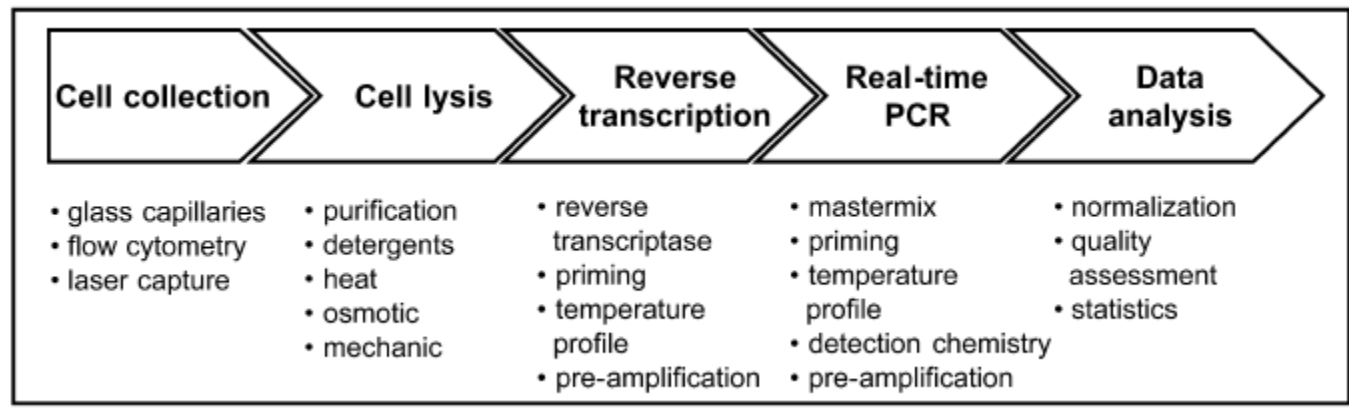
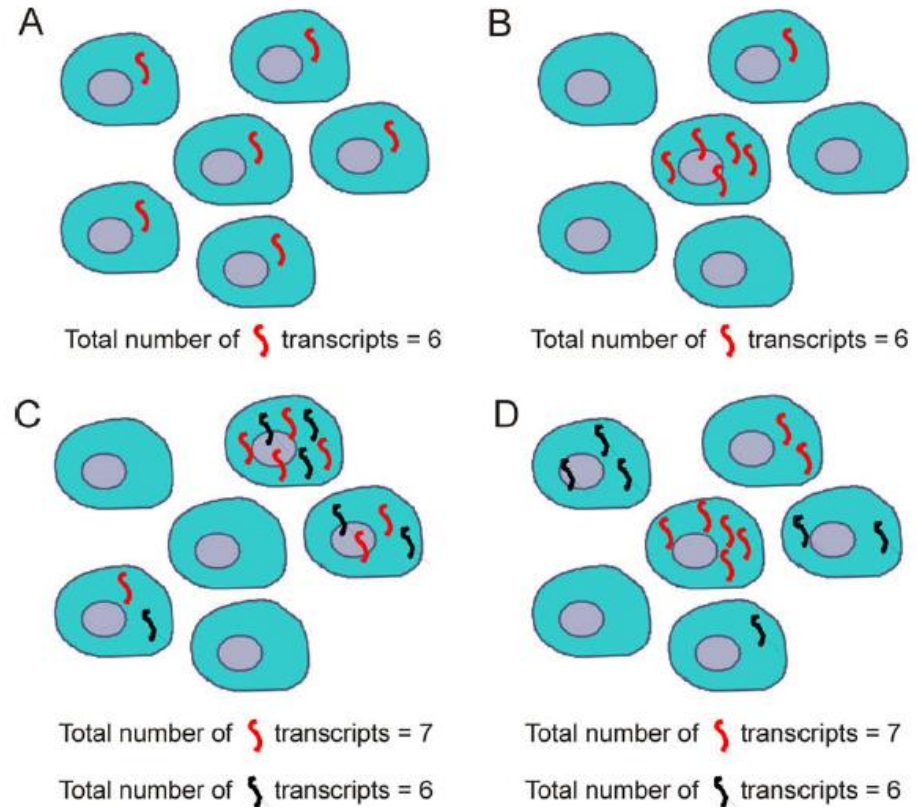
1. Pro každou sekvenci dva páry primerů

nebo

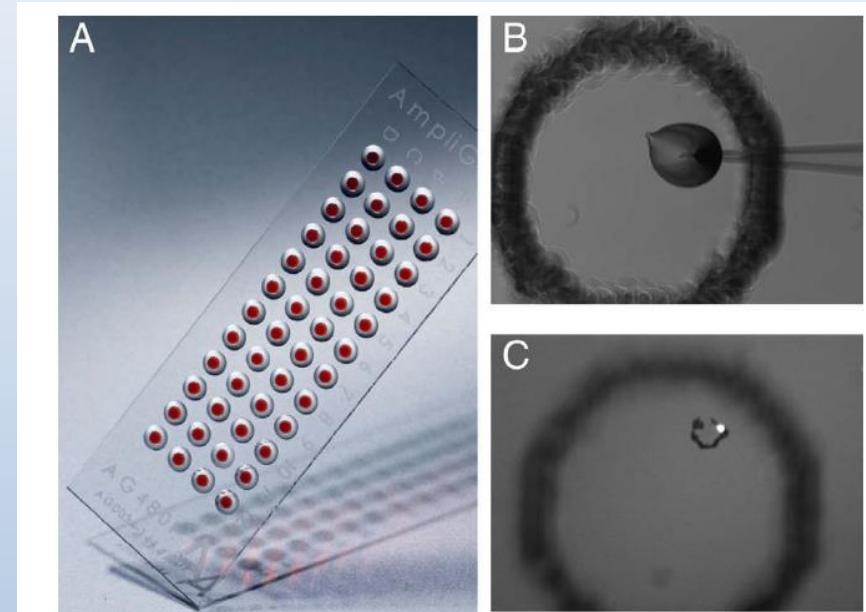
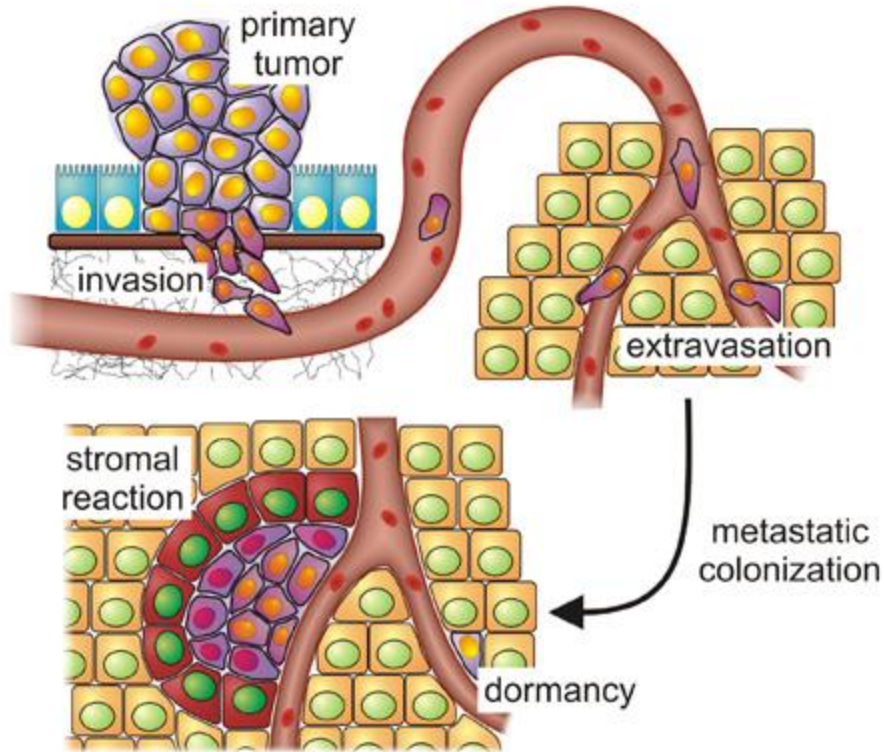
2. Jsou použity oligonukleotidy hybridizující k nemetylovaným sekvencím a blokující PCR



## Single cell profiling



## Circulating tumor cells (CTCs)



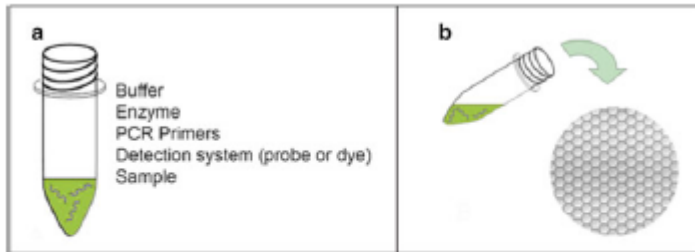
# Droplet digital PCR

- Precizní sensitivní stanovení NK
- Kombinuje klasické PCR postupy s fluorescenčním stanovením produktu
- Rozdělení PCR reakce na stovky až tisíce subreakcí – někde dojde k replikace, někde ne – přítomnost/nepřítomnost hledané sekvence
- Subreakce individuálně analyzovány
- Ratio pozitivních a negativních reakcí – počáteční množství molekul templátu
- Absolutní kvantifikace bez externích standard

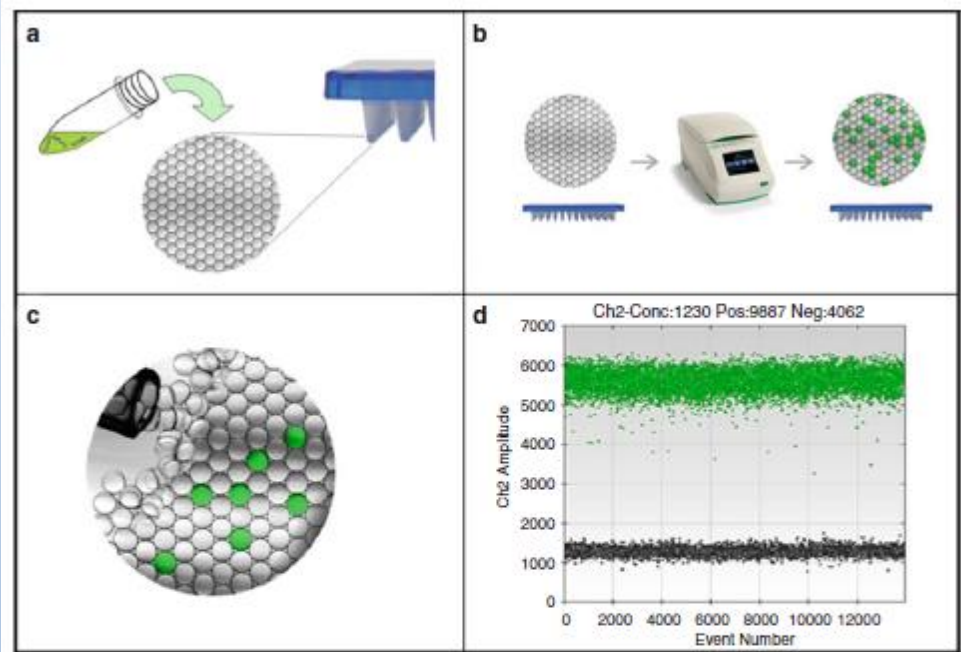
# ddPCR - využití

- Kvantifikace virů a patogenů
- Genové exprese – pokud rozdíly menší než dva krát
- Copy number variations
- Single cell analysis
- Rare mutations....

# ddPCR



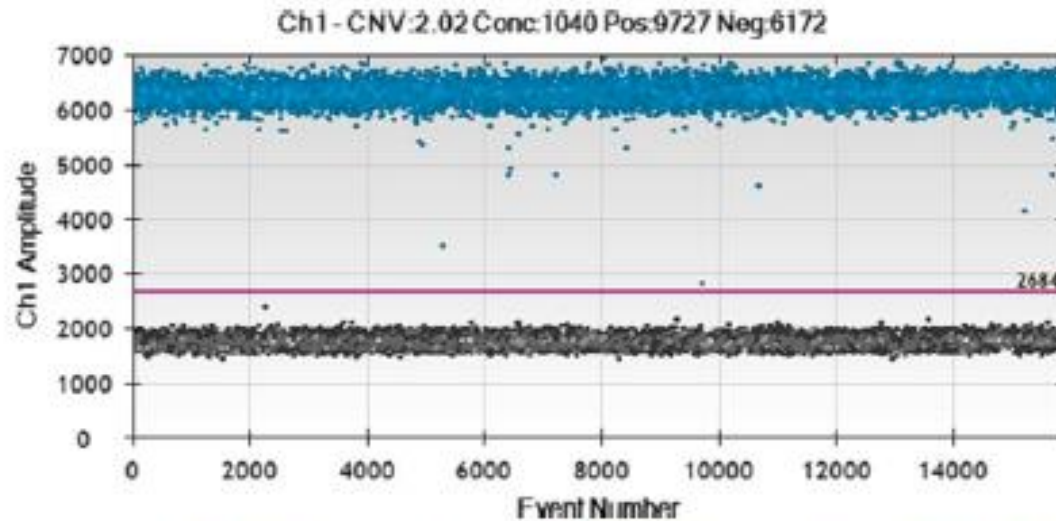
**Fig. 3** Components of a Digital PCR reaction and Partitioning. ddPCR reactions contain similar components to that typically used in a qPCR reaction. These components should be thoroughly mixed and then partitioned into uniform subpartitions



**Fig. 4** (a) Partitioned reactions are placed in a vessel compatible for the PCR amplification to take place. (b) Amplification can take place in a standard thermocycler using typical qPCR protocols. For example 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s and 60 °C for 1 min. No optical analysis is required at the amplification phase. (c) Individual subreactions are collected and subsequently interrogated for the presence of a positive fluorescent signal. (d) Individual reactions are deemed either a positive or negative event, counted, and the concentration is calculated



# ddPCR



**Fig. 5** Temporal plot of a ddPCR reaction. *X* axis represents individual subreactions in the order they were analyzed. *Y* axis represents fluorescent signal generated in each corresponding subreaction. *Blue dots* are deemed as positive events; *grey dots* are deemed negative. *Purple line* is the threshold for determining what is positive from negative (can be set automatically by software algorithms or manually as in the case above)