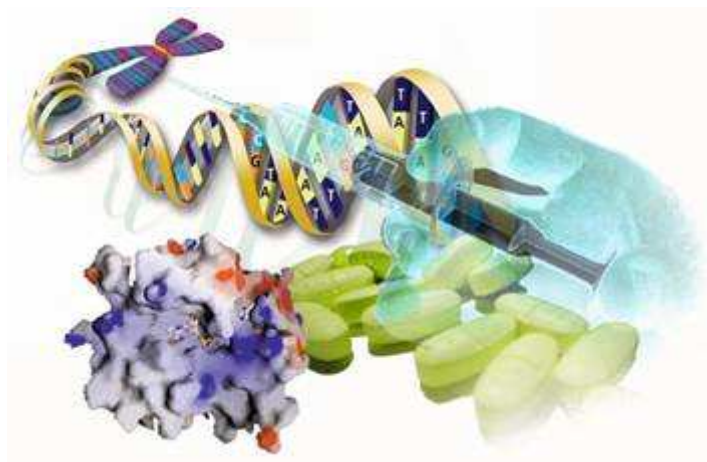


ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



VI. Aplikace qRT-PCR

Aplikace

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 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 H₂O 15,0μl

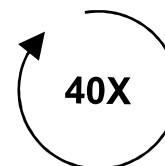
Vzorek DNA nebo standard 5,0μl

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

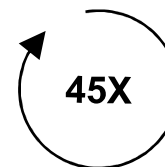
PCR

50°C 20min (Reverzní transkripce)

95°C 15min (Aktivace polymerázy)

95°C 15s

60°C 1min



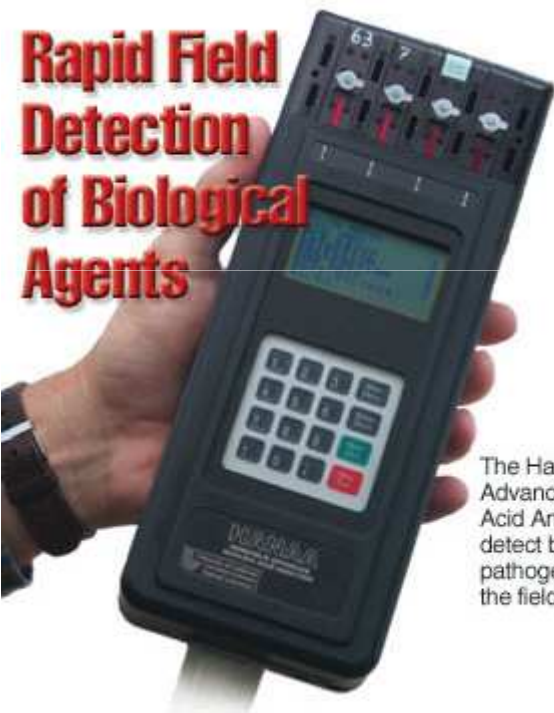
Aplikace

Terénní qRT-PCR

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



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



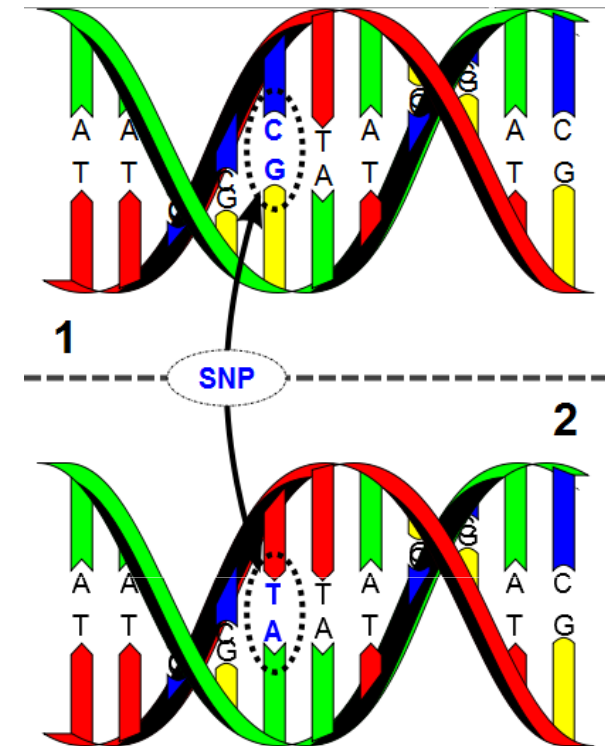
The Handheld Advanced Nucleic Acid Analyzer can detect biological pathogens in the field.

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

Aplikace

Jednonukleotidové polymorfism 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/>



NCBI Single Nucleotide Polymorphism

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM Books SNP

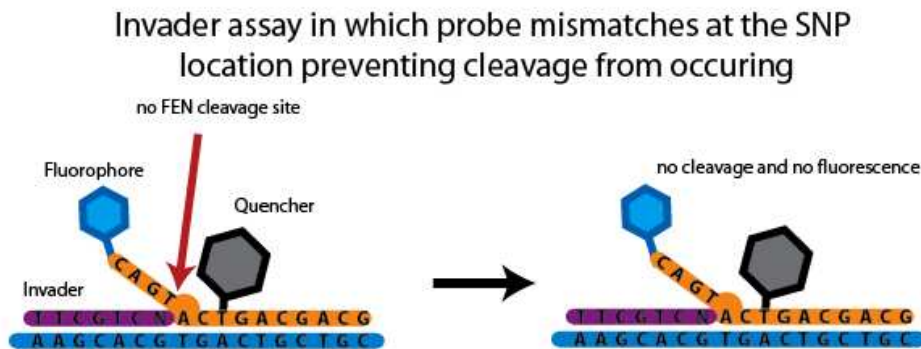
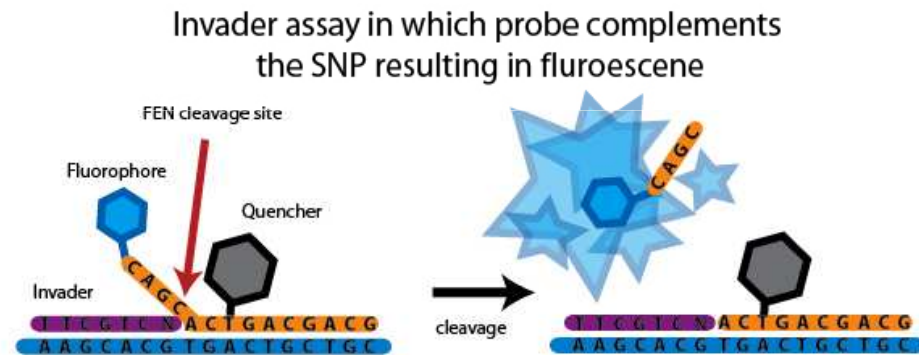
Search for SNP on NCBI Reference Assembly

Search Entrez SNP for Go

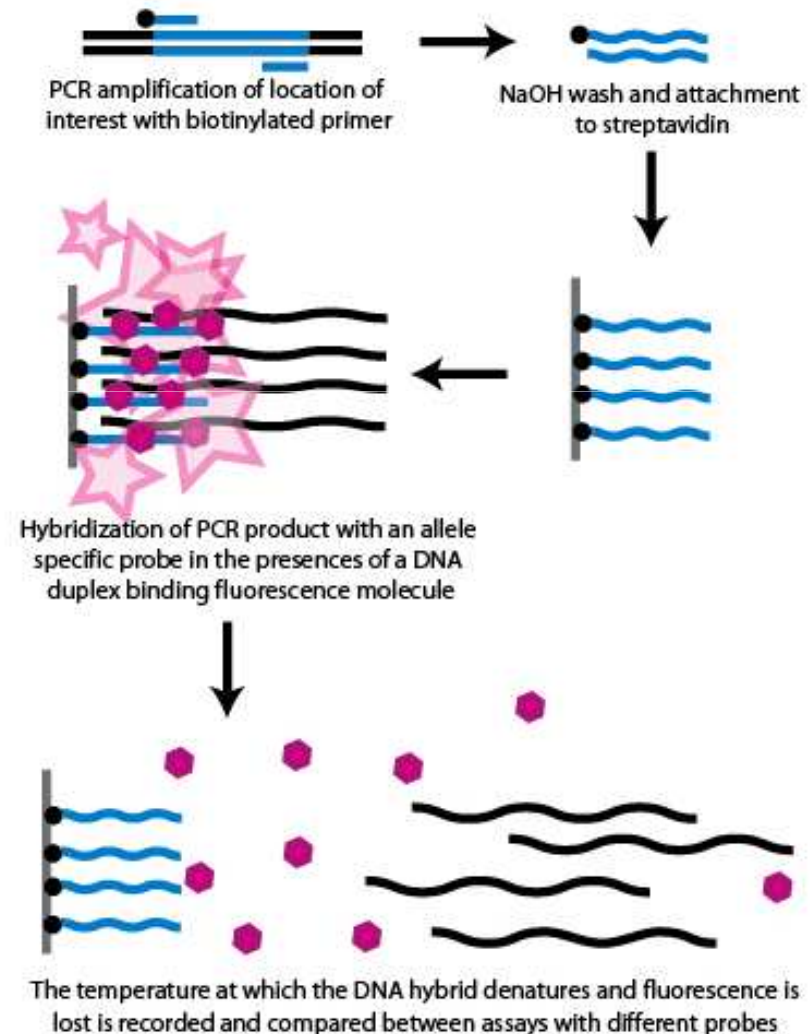
Aplikace

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.

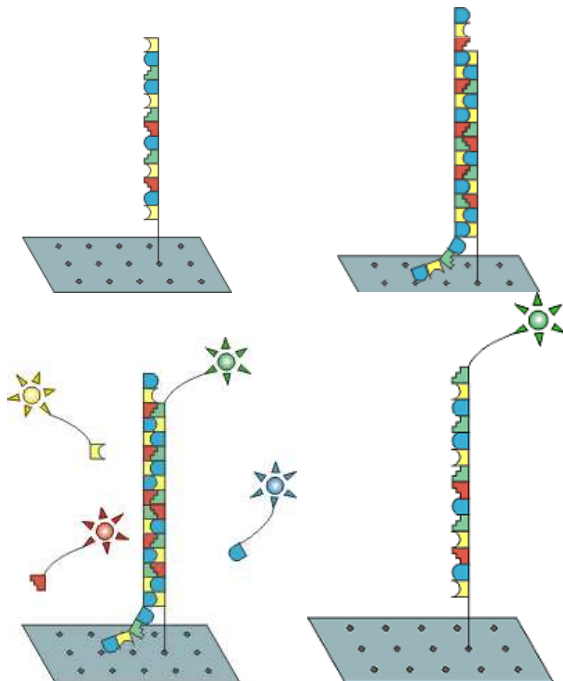


Aplikace

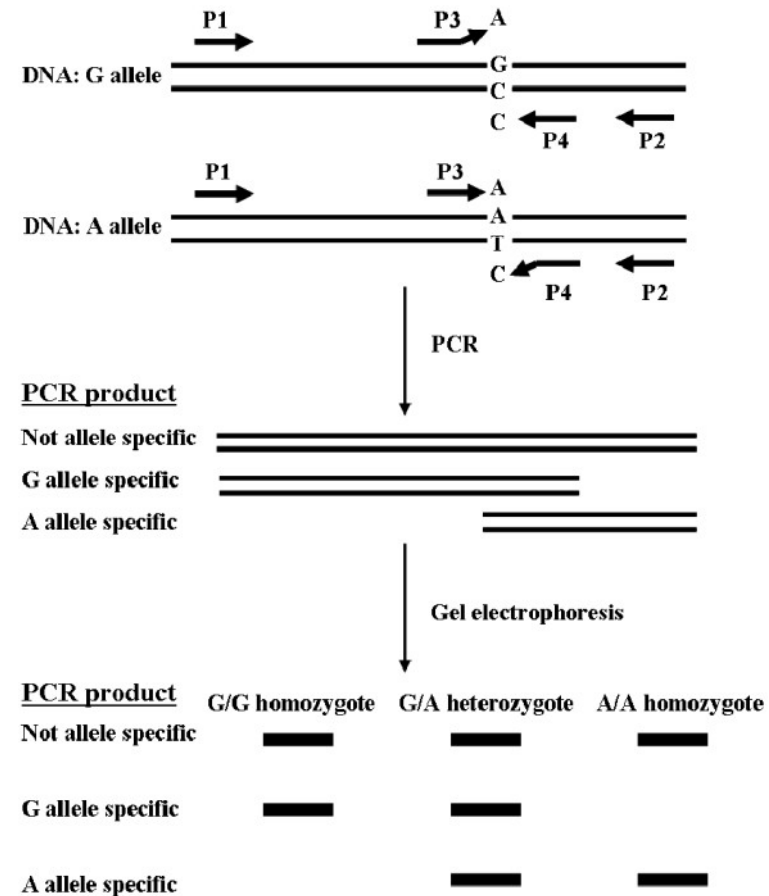
SNP genotypizace

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

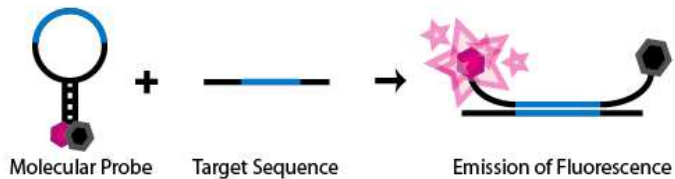
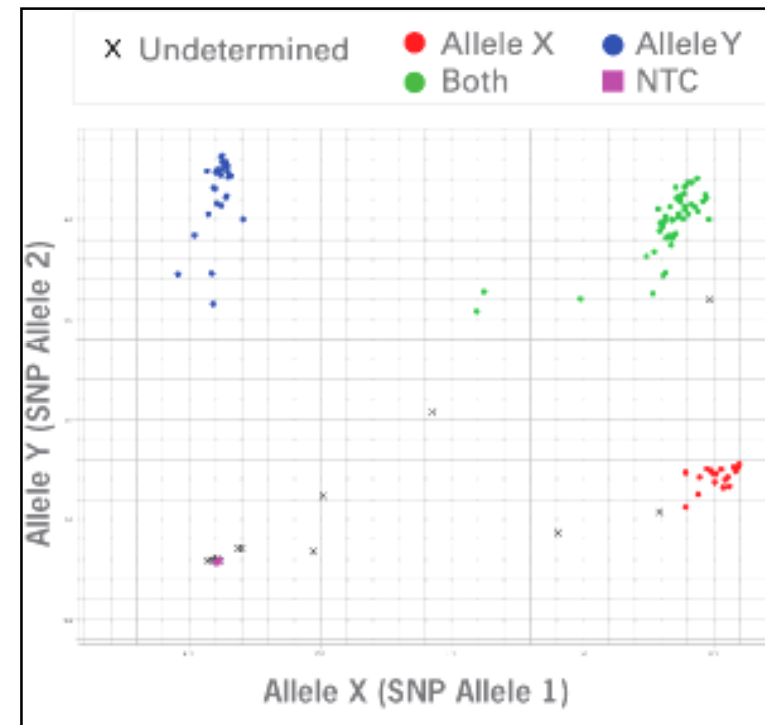
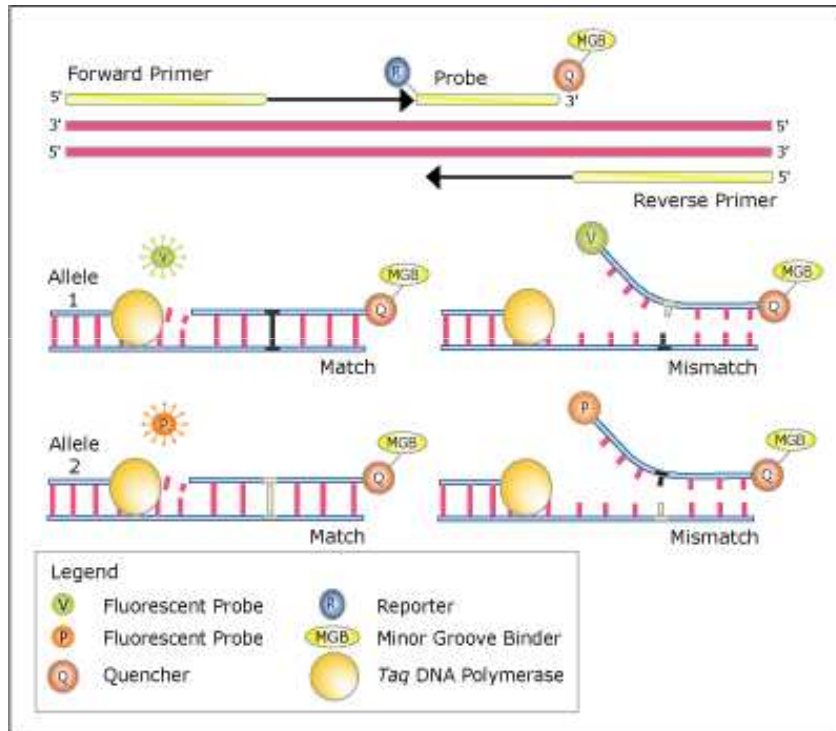


Aplikace

SNP genotypizace pomocí real-time PCR

Zejména molekulární majáky a TaqMan sondy

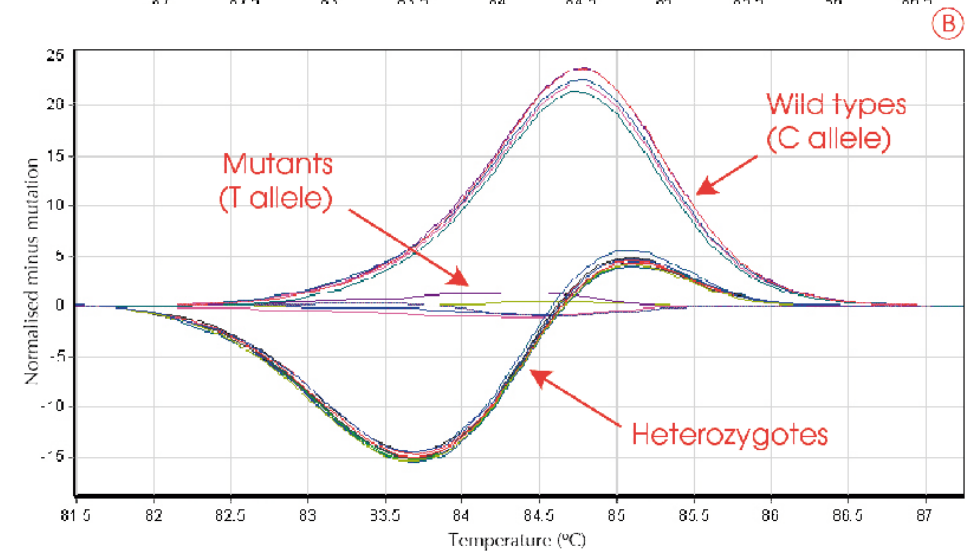
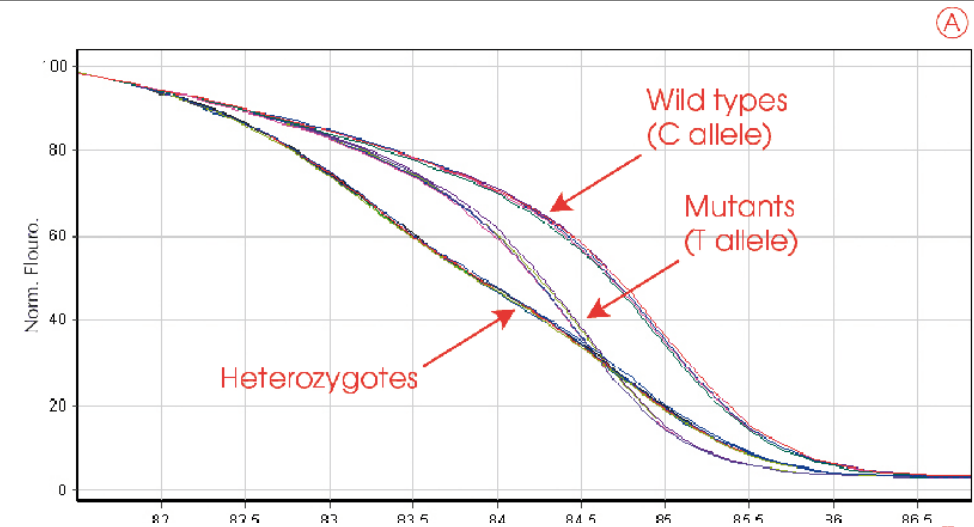
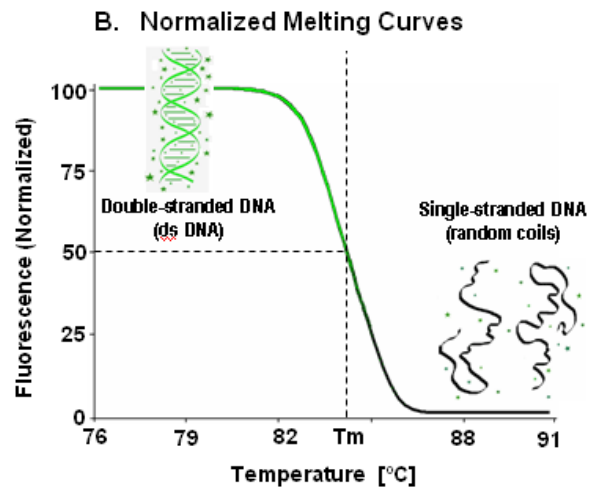
End-point analýza



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



Aplikace

Analýza křivek teplot tání = High resolution melting analysis

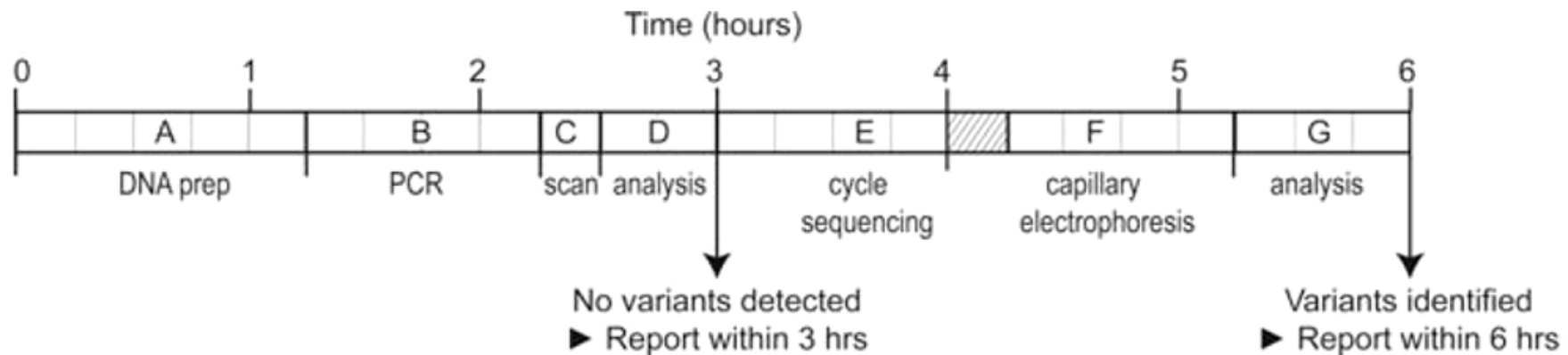
Výhody:

- Univerzální primery pro oblast nesoucí hledaný polymorfismus
- Jediný fluorofor (SYBR Green)
- „High throughput“, automatizace

Aplikace:

- SNP, mutace - genotypizace
- Typizace mikroorganismů

VÝHODA: ČAS



Aplikace

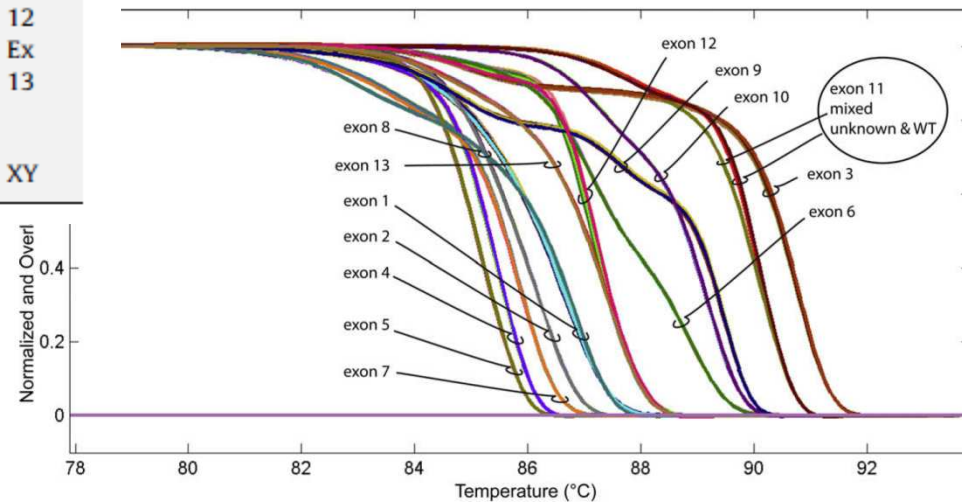
Příklad: Screening X-linked chronic granulomatous disease (OMIM 300481)

13 exonů + amelogenin

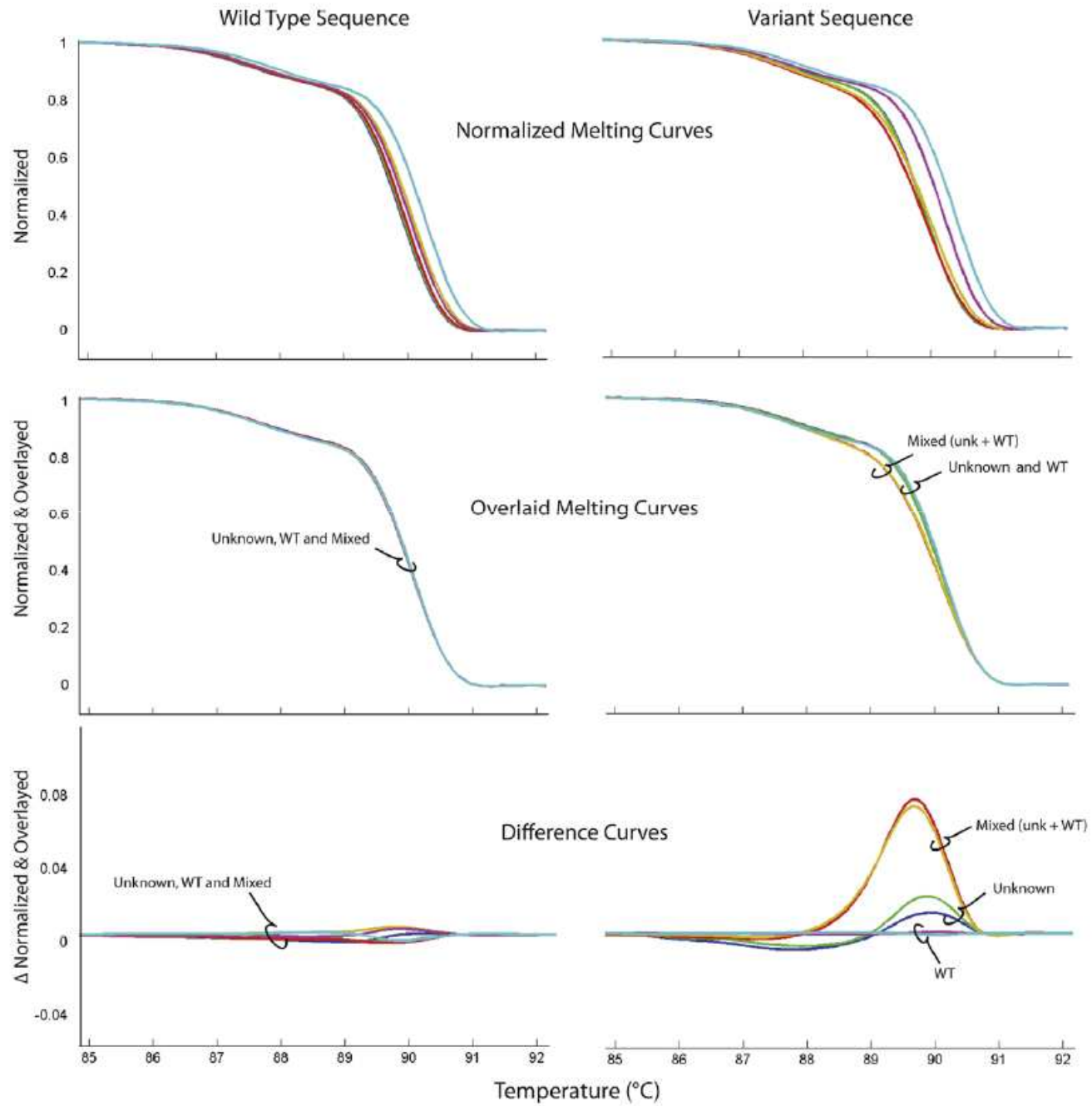
alternativa: sekvenování

Location of *CYBB* and amelogenin primers on X-linked chronic granulomatous disease primer plates.

	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
	1	8	1	8	1	8	1	8	1	8	1	8
B	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
	2	9	2	9	2	9	2	9	2	9	2	9
C	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10
D	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
	4	11	4	11	4	11	4	11	4	11	4	11
E	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12	5	12
F	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
	6	13	6	13	6	13	6	13	6	13	6	13
G	Ex		Ex		Ex		Ex		Ex		Ex	
	7		7		7		7		7		7	
H		XY		XY		XY		XY		XY		XY



Aplikace

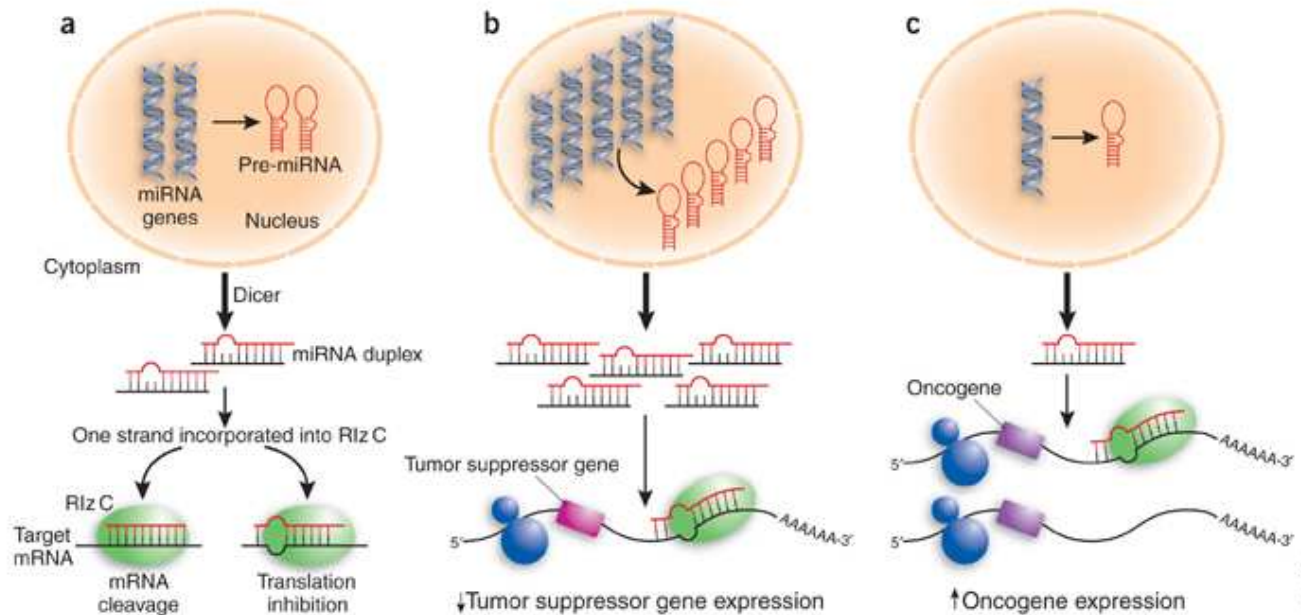
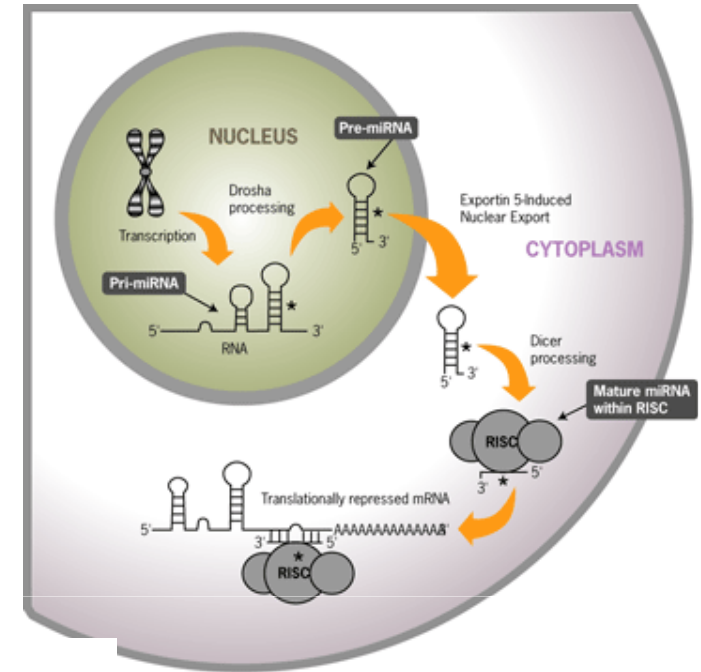


Aplikace

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

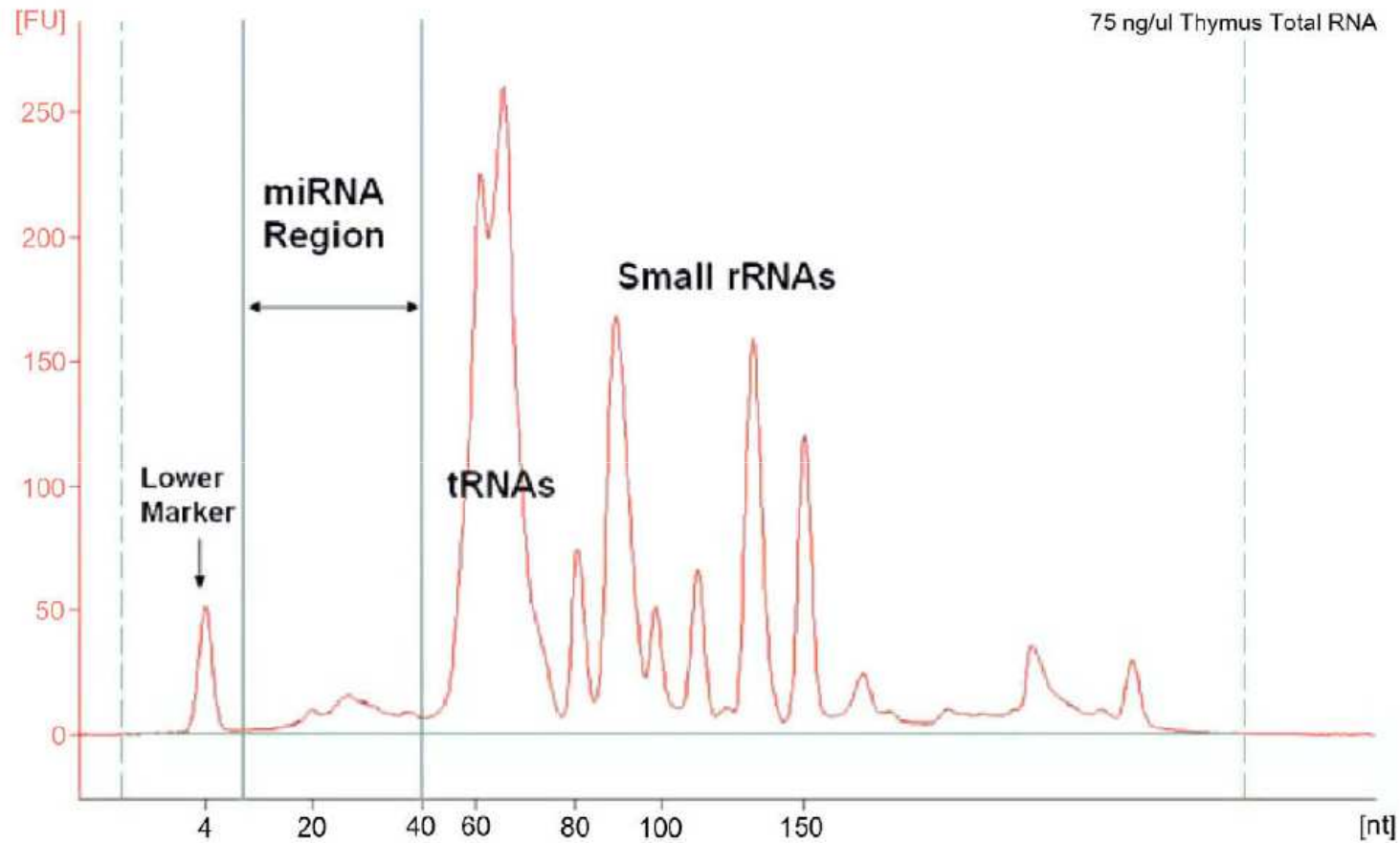
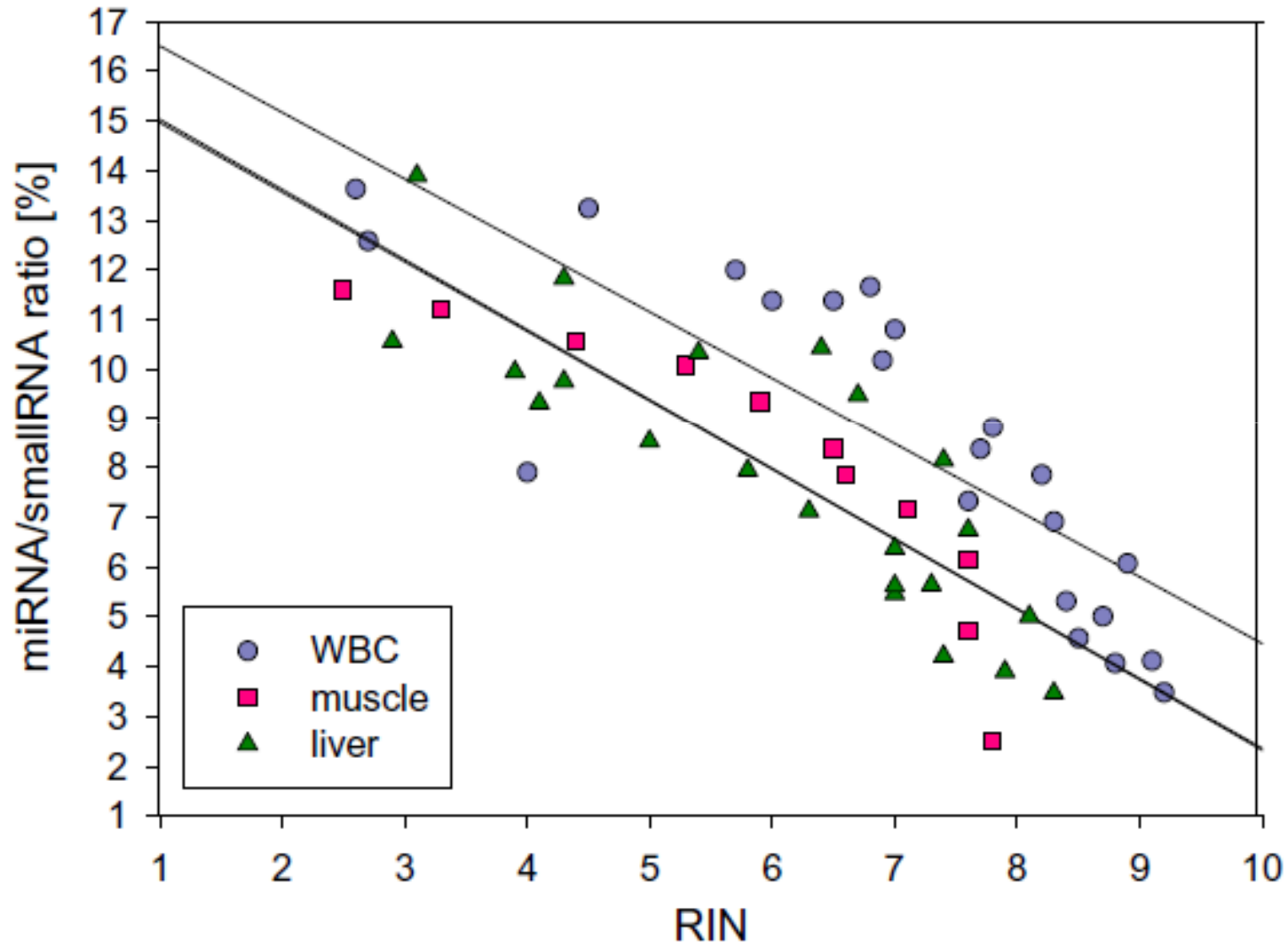


Fig. 1A. Image of a typical electropherogram for small RNA analysis performed with the Small RNA Assay on the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) (<http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5989-7002EN.pdf>).

Aplikace

Kritický bod: Izolace subpopulace malých RNA

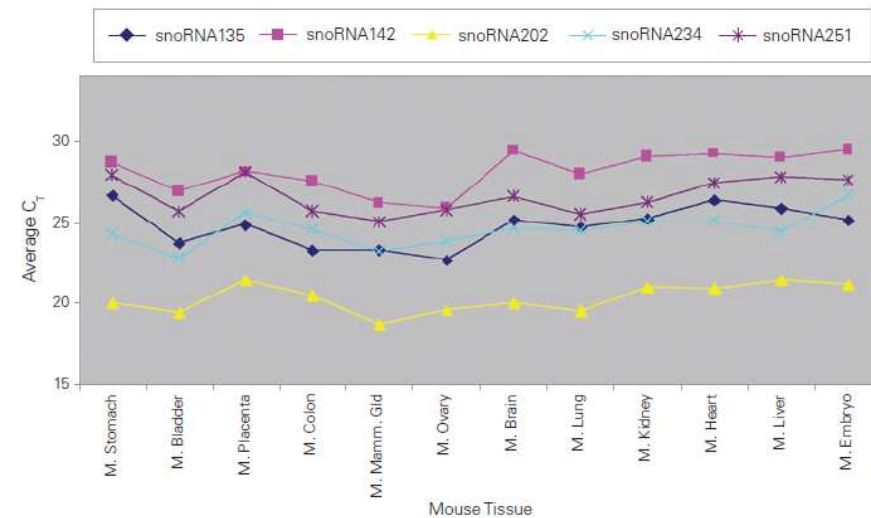
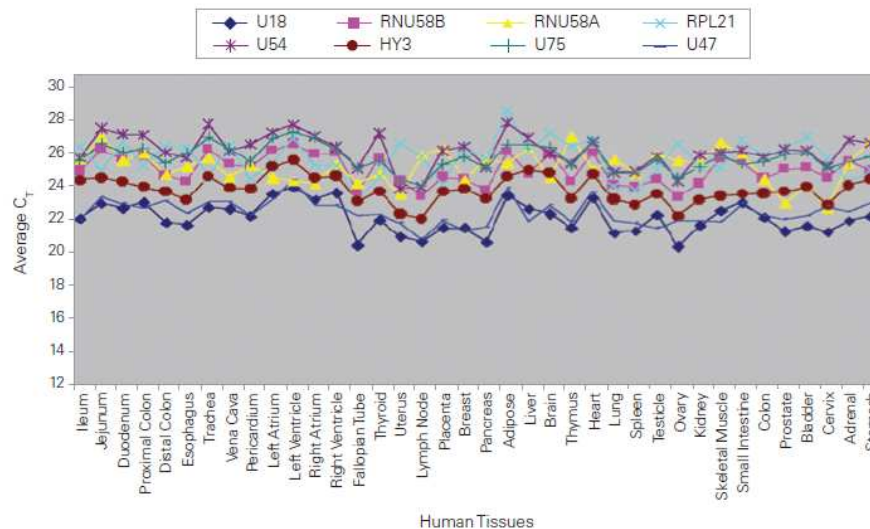
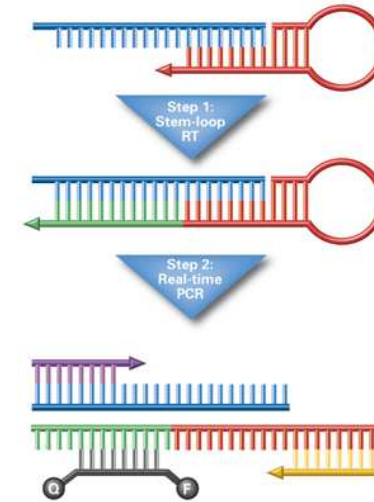


Aplikace

miRNA detekce

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

Endogenní kontrola: malá jaderná RNA (snRNA)



Aplikace

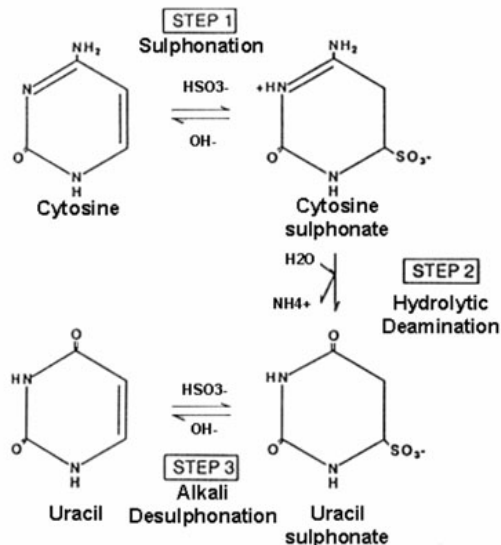
Analýza DNA metylací

- 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

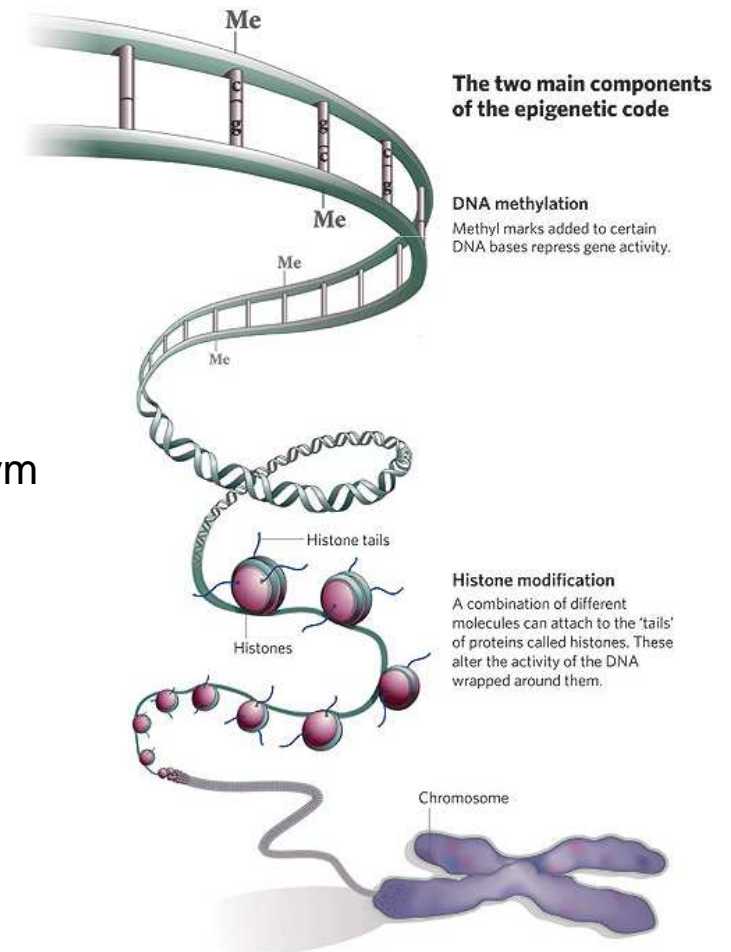
mC vs. C

mC vs. C

C + bisulfit = U
mC intaktní



Endonukleázy citlivé metylovaným sekvencím
BsoFI, HpaII, MspI and HhaI



Aplikace

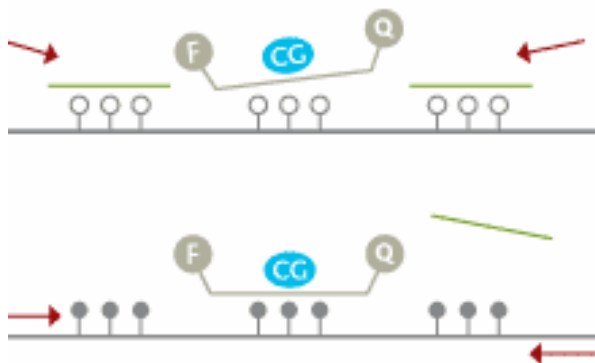
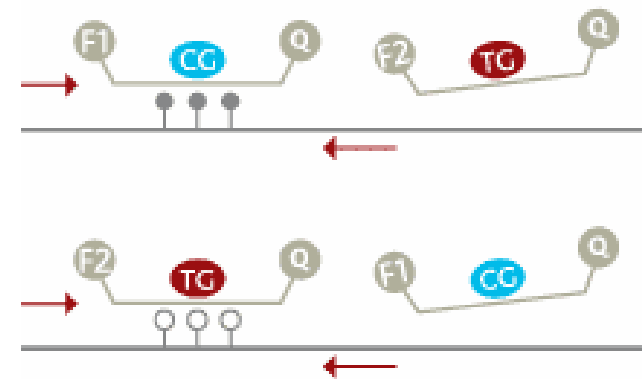
Kvantitativní analýza DNA metylací pomocí real-time PCR

Nemetylované cytosiny jsou konvertovány na U bisulfitovou metodou

1. Pro každou sekvenci dva páry primerů

nebo

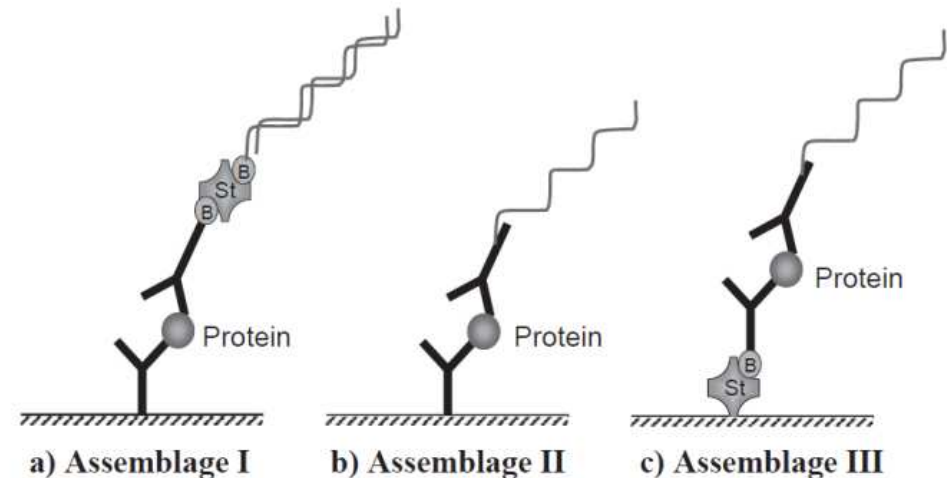
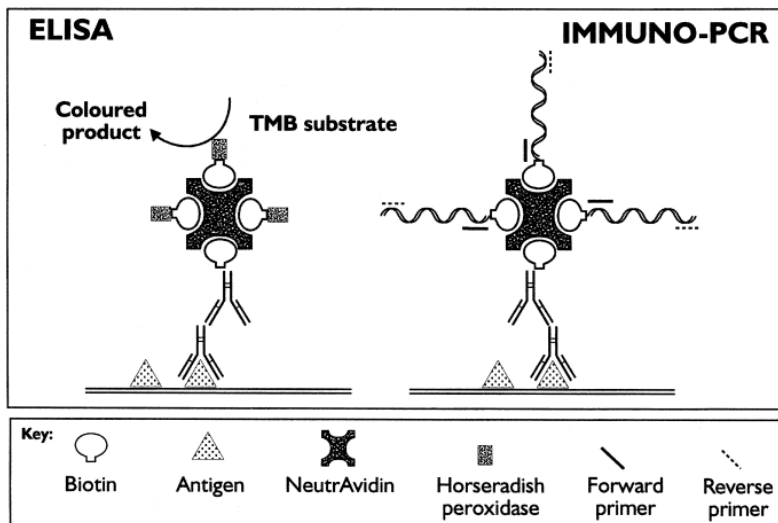
2. Jsou použity oligonukleotidy hybridizující k nemetylovaným sekvencím a blokující PCR



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

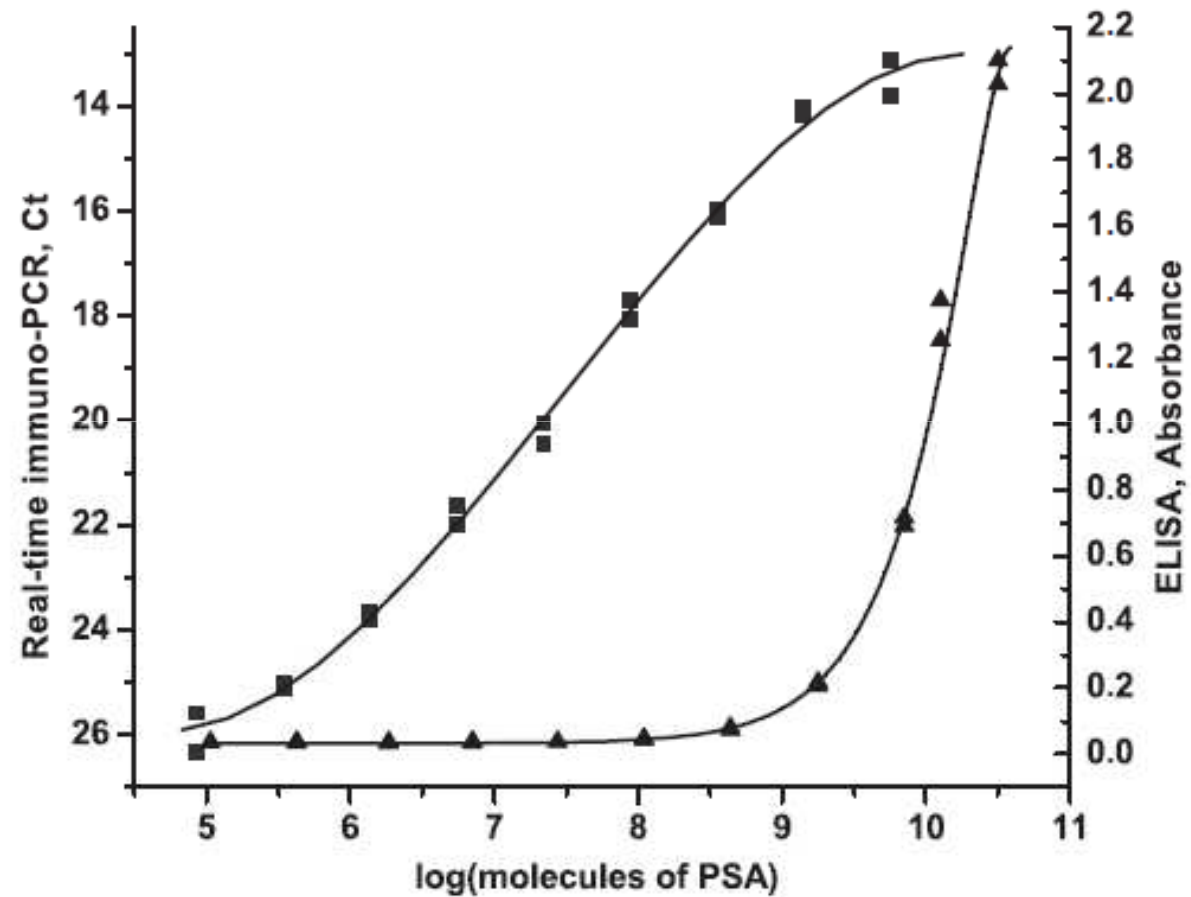


Fig. 5. Real-time immuno-PCR (assemblage II) (■) and ELISA (▲) readouts of standard samples (logarithmic scale).

ImunoPCR – stanovení PSA v laser-mikrodisekovaných buňkách

Human Pathology (2008) 39, 1474–1482



ELSEVIER

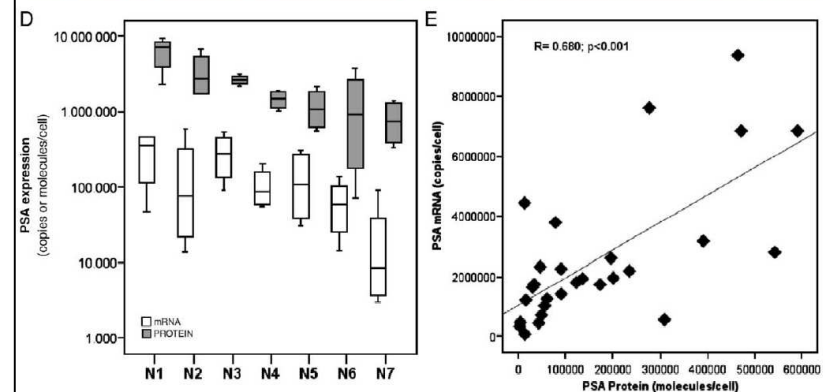
Human
PATHOLOGY

www.elsevier.com/locate/humpath

Original contribution

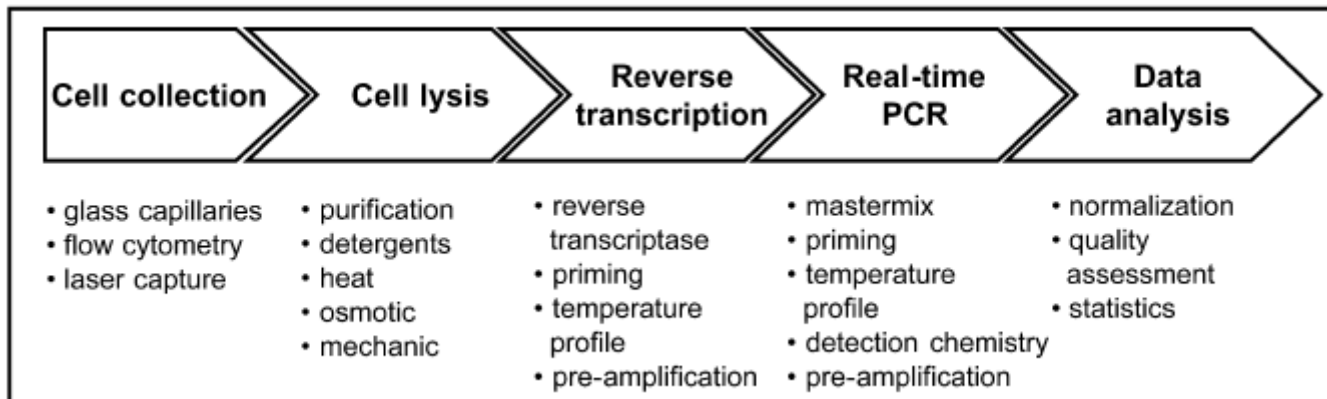
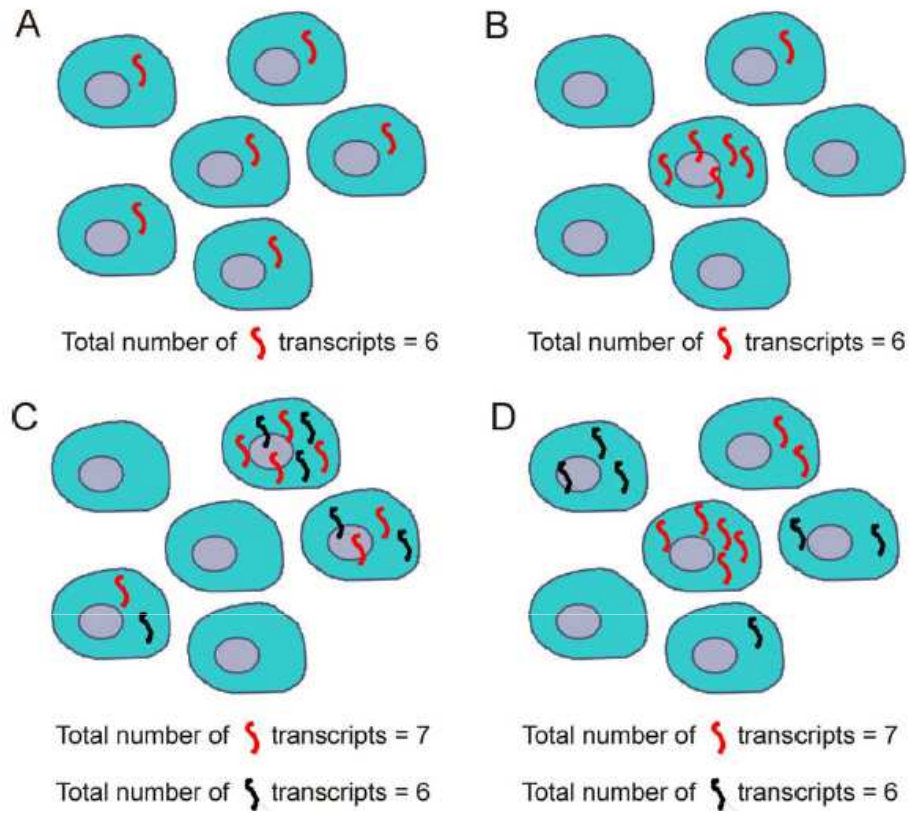
Prostate-specific antigen mRNA and protein levels in laser microdissected cells of human prostate measured by real-time reverse transcriptase–quantitative polymerase chain reaction and immuno–quantitative polymerase chain reaction

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,



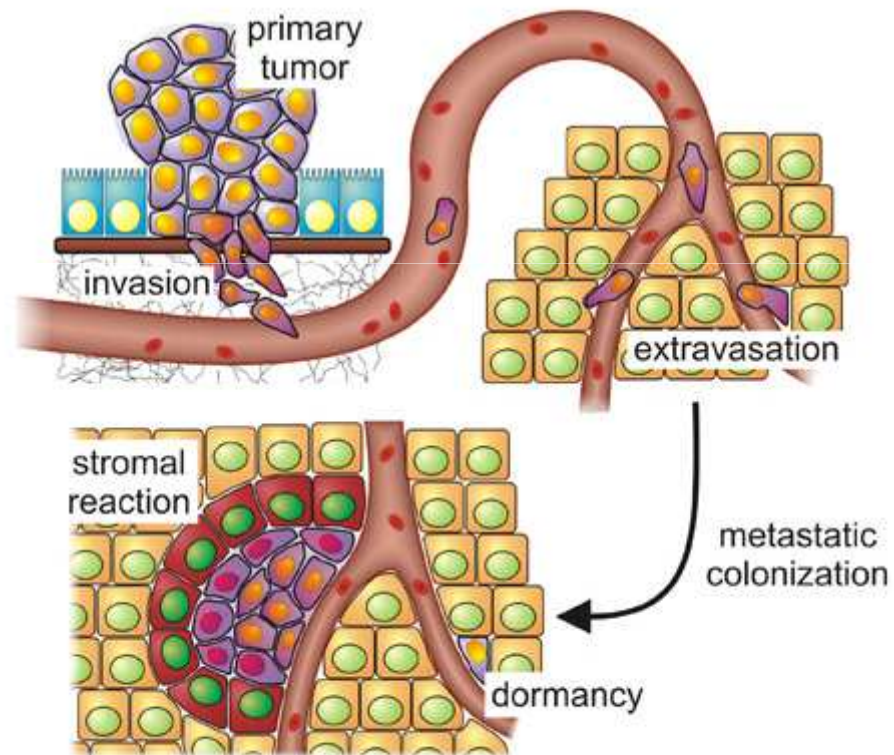
Aplikace

Single cell profiling



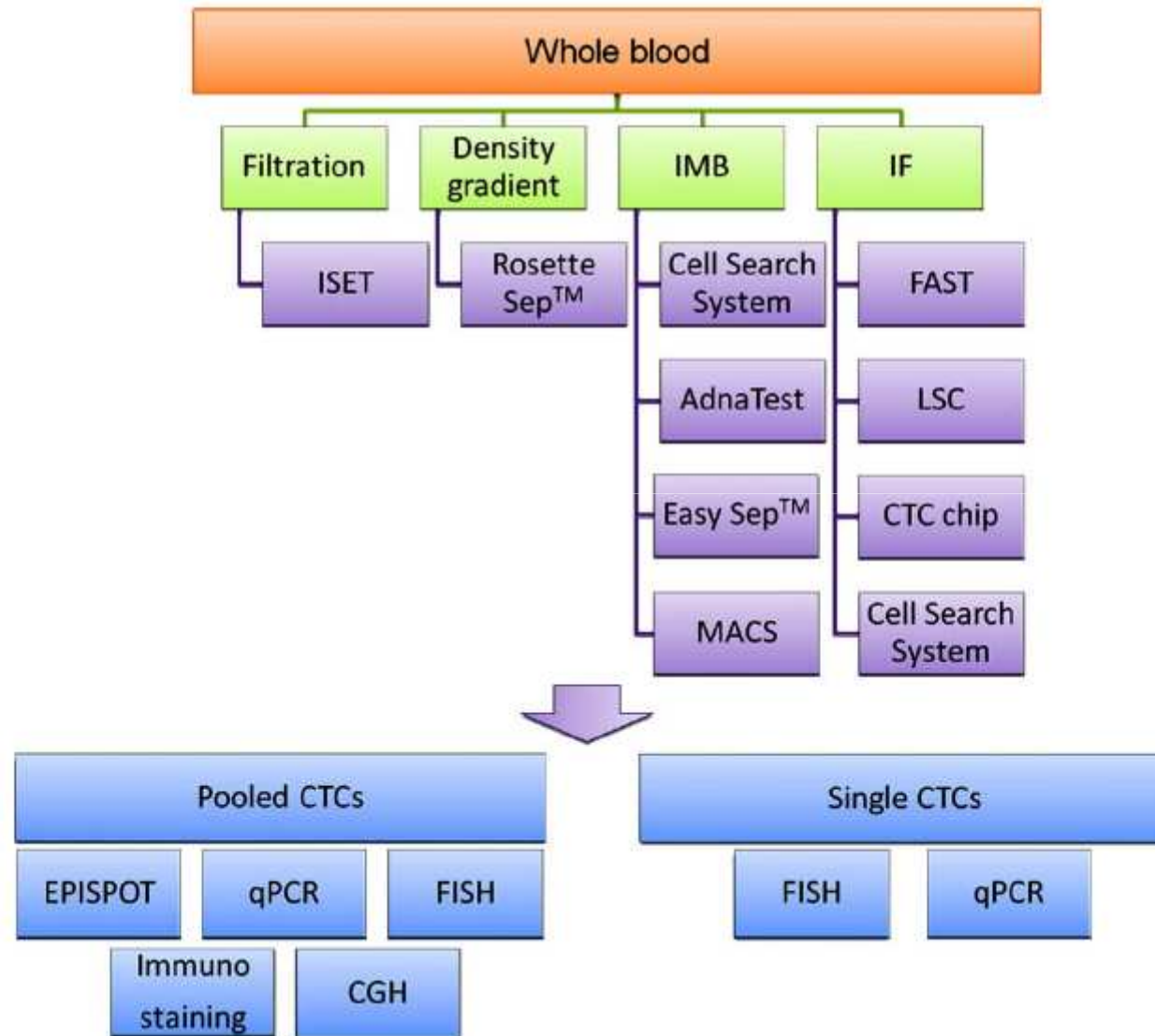
Aplikace

Circulating tumor cells (CTCs)



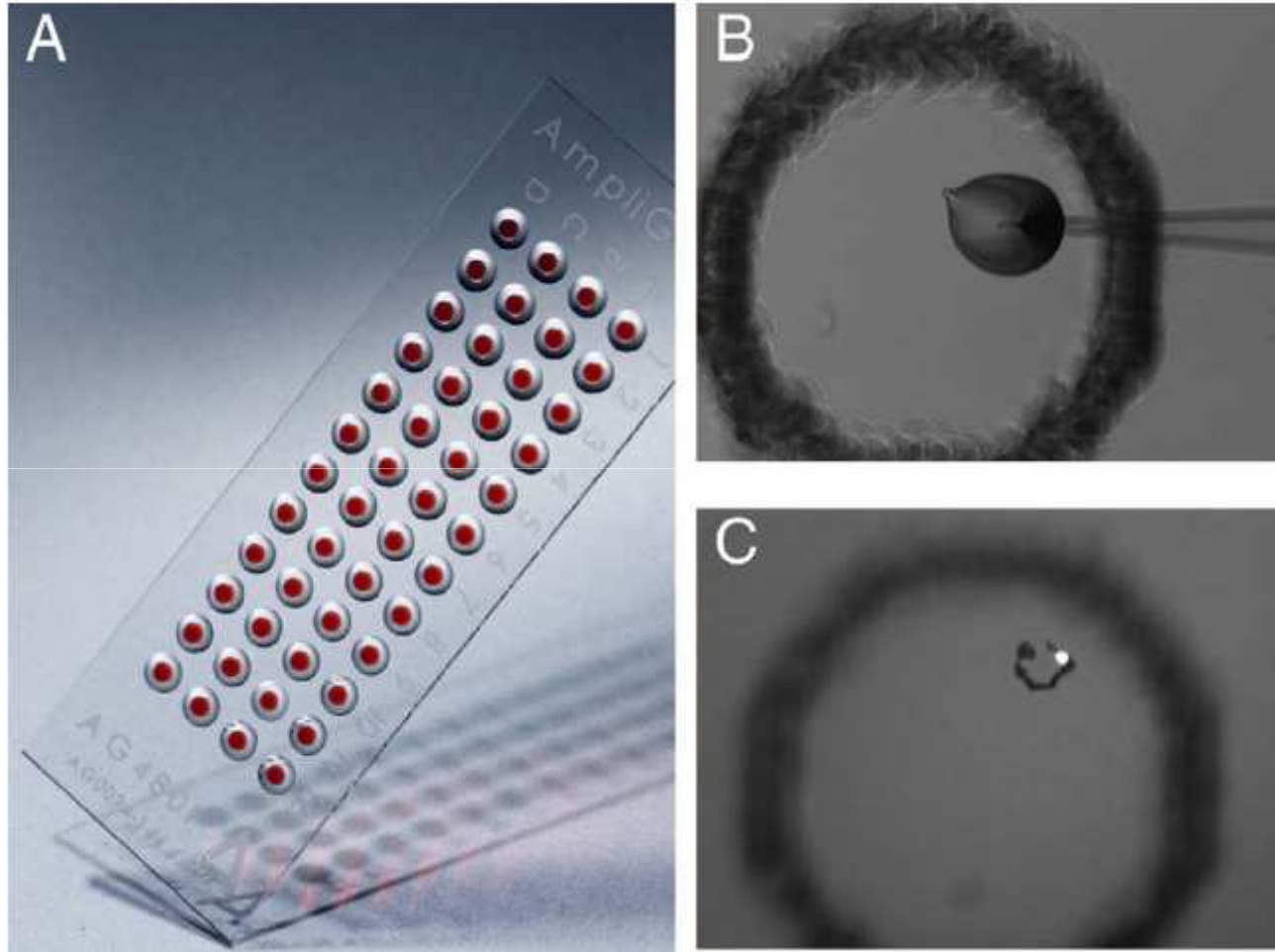
Aplikace

Circulating tumor cells (CTCs)



Aplikace

Circulating tumor cells (CTCs)

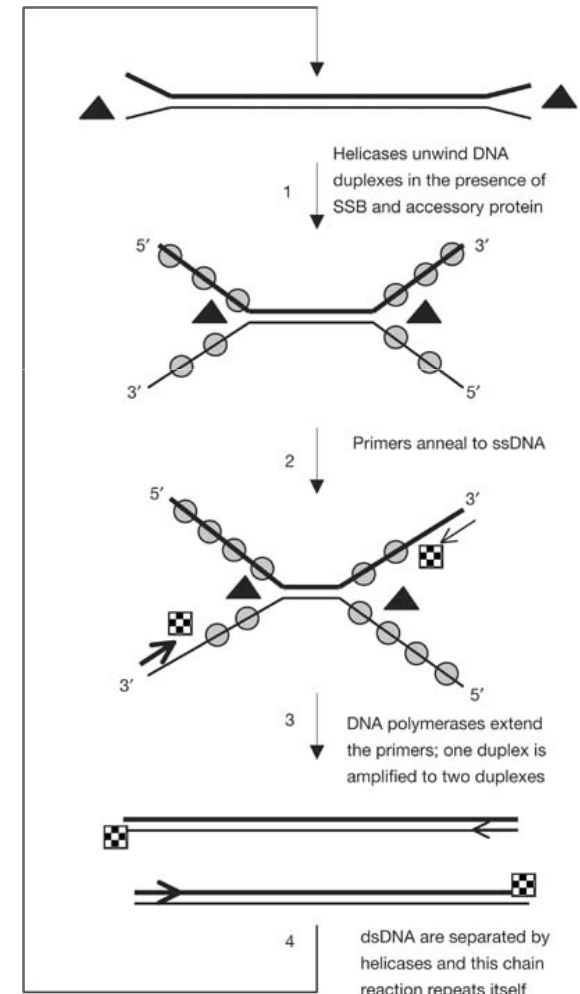
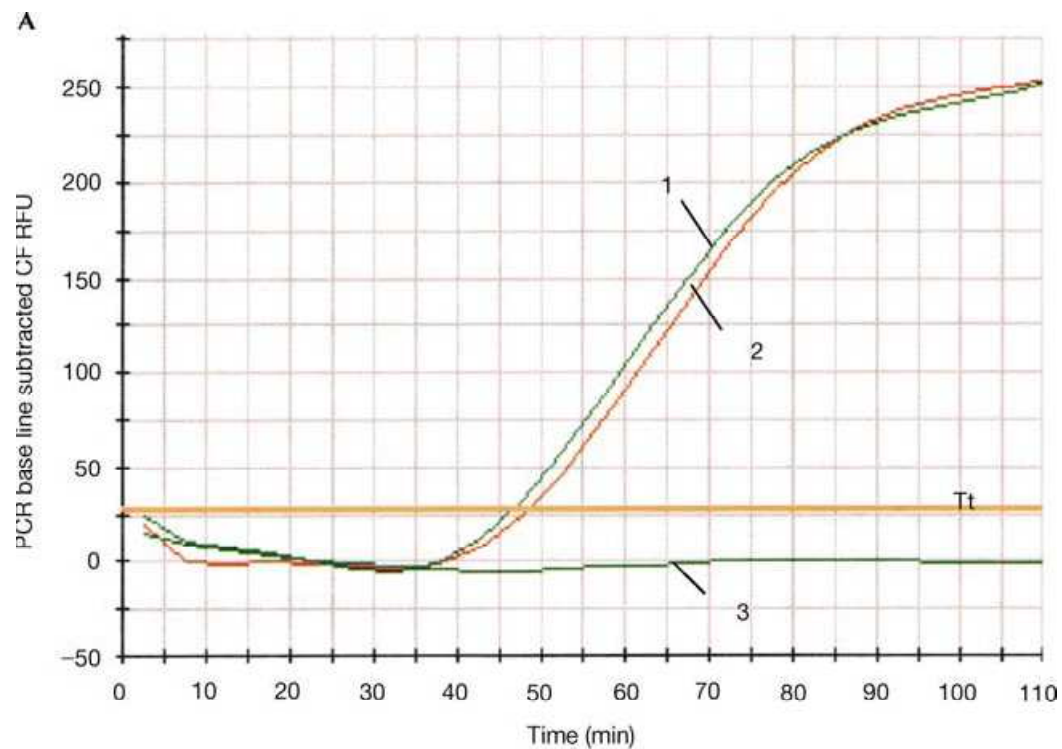


Aplikace

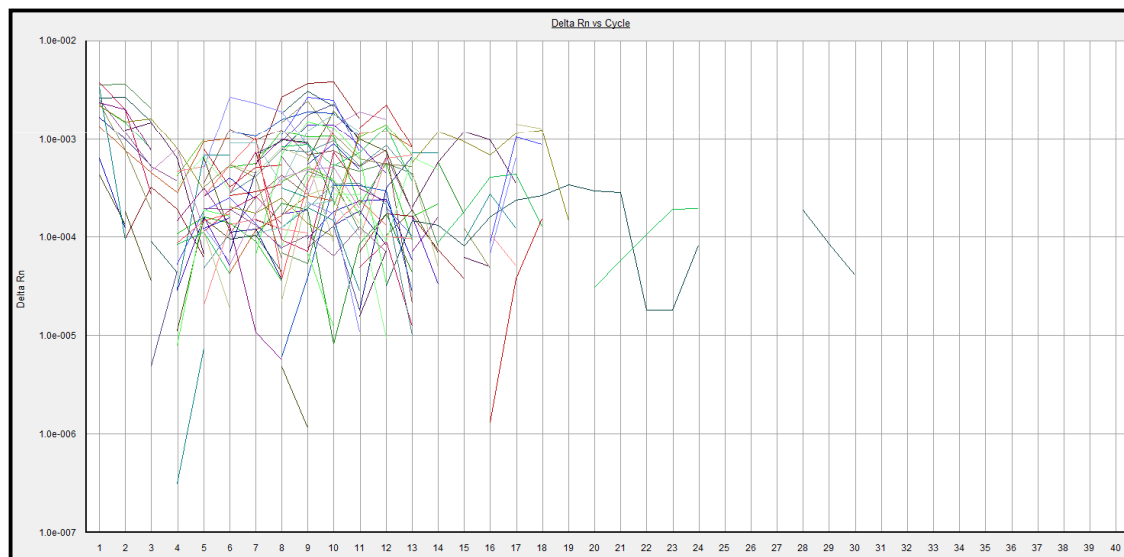
Amplifikace DNA bez PCR?

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



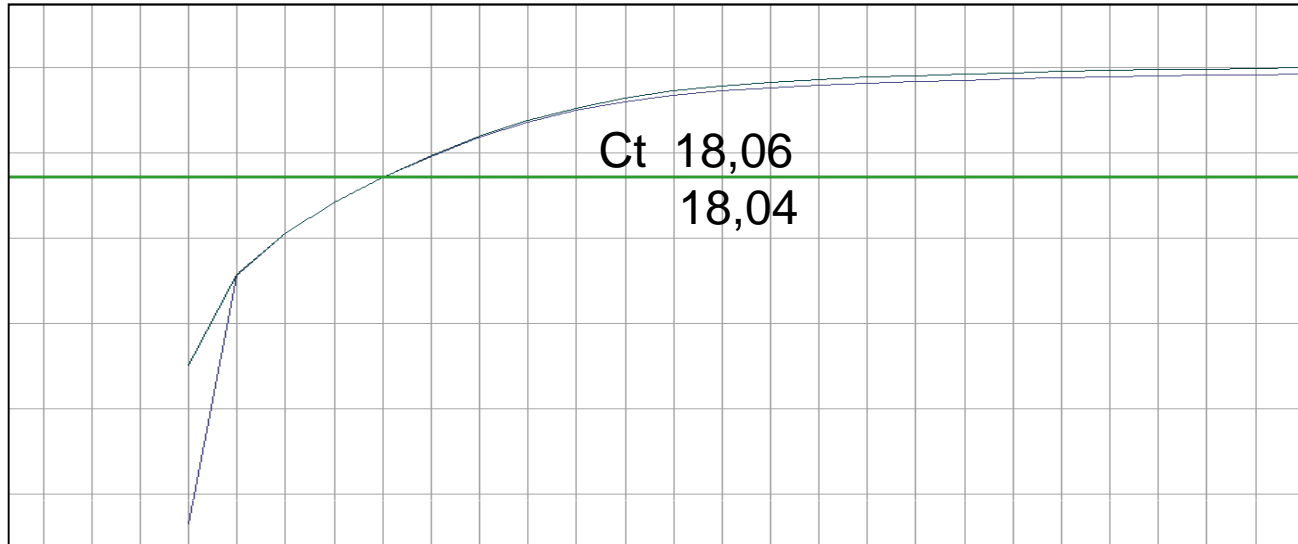
ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



VII. Troubleshooting

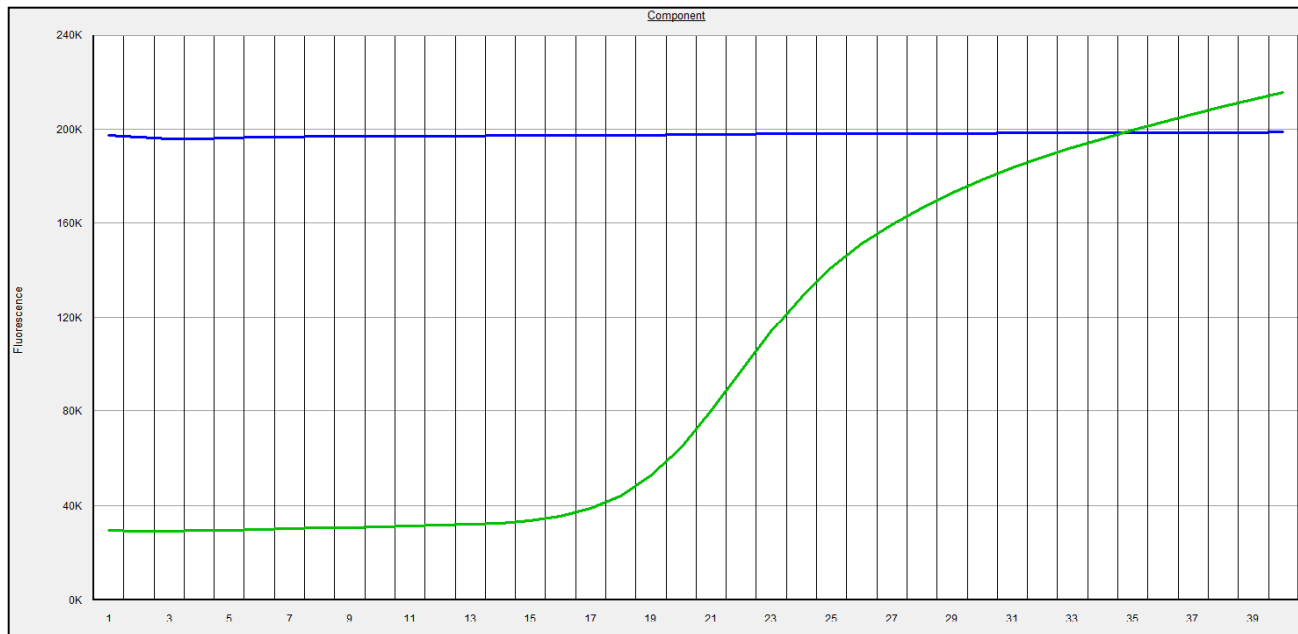
Problémy v qRT-PCR analýze

Jak vypadá správný amplifikační výstup?



Duplikátní reakce

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



Problémy v qRT-PCR analýze

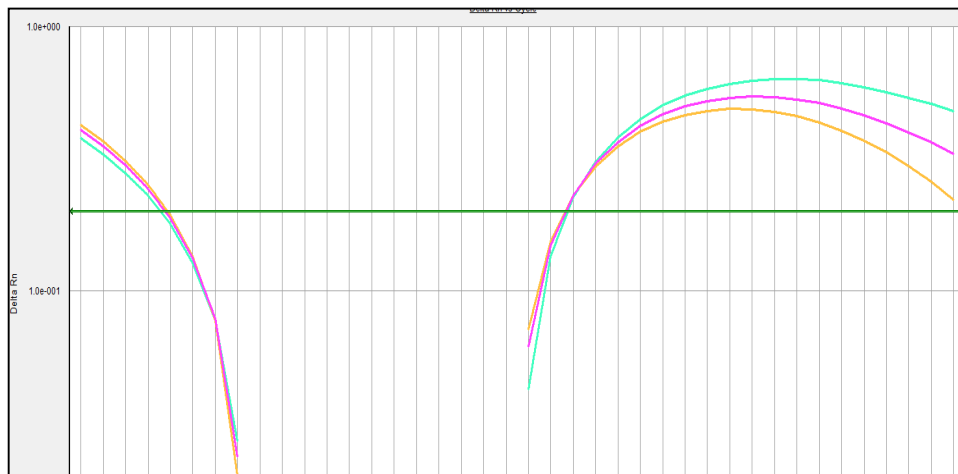
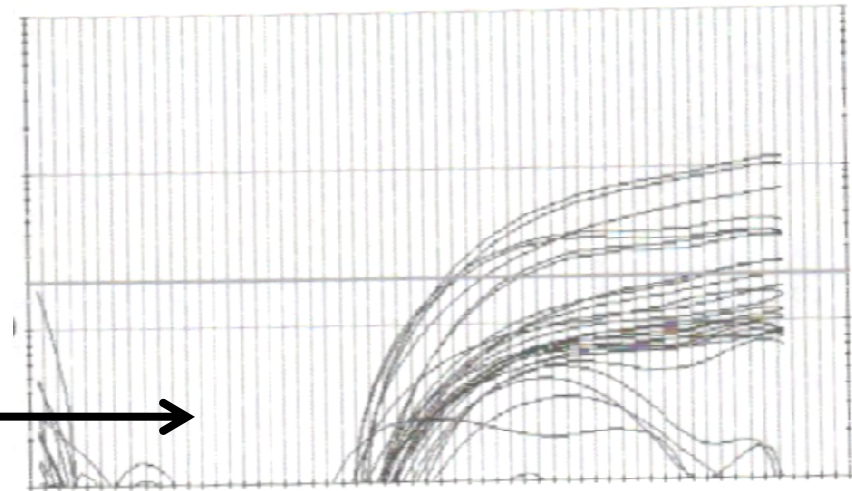
Problém 1:

Příliš mnoho templátu

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

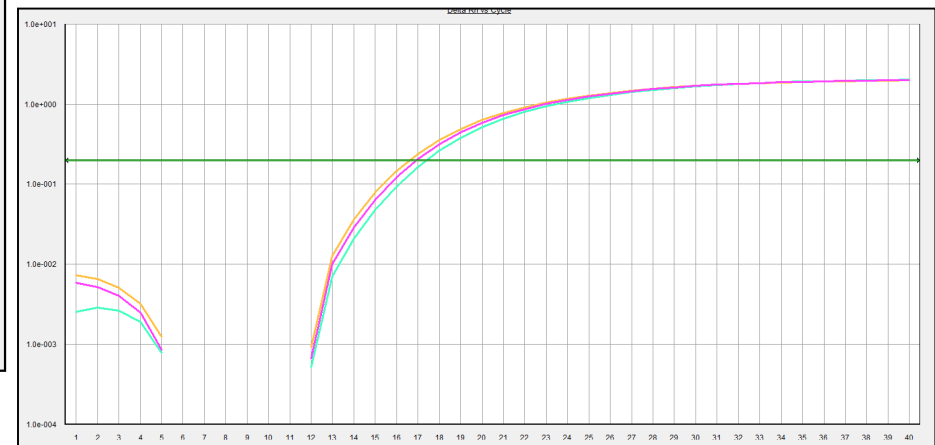
Řešení:

- 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

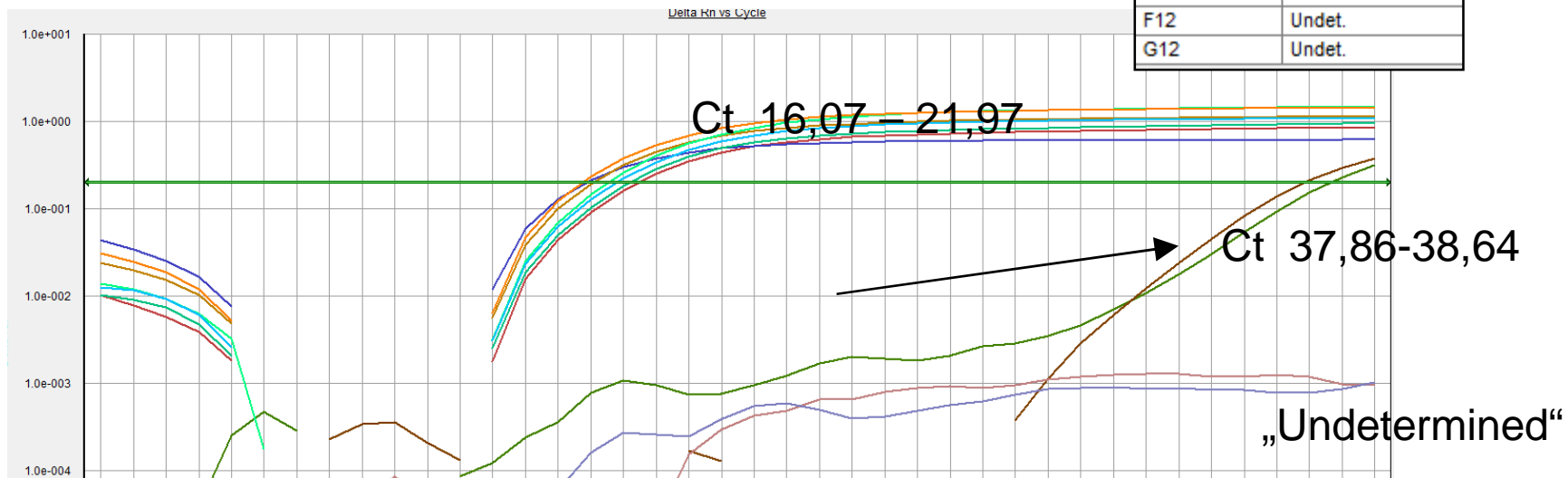
Problém 2:

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

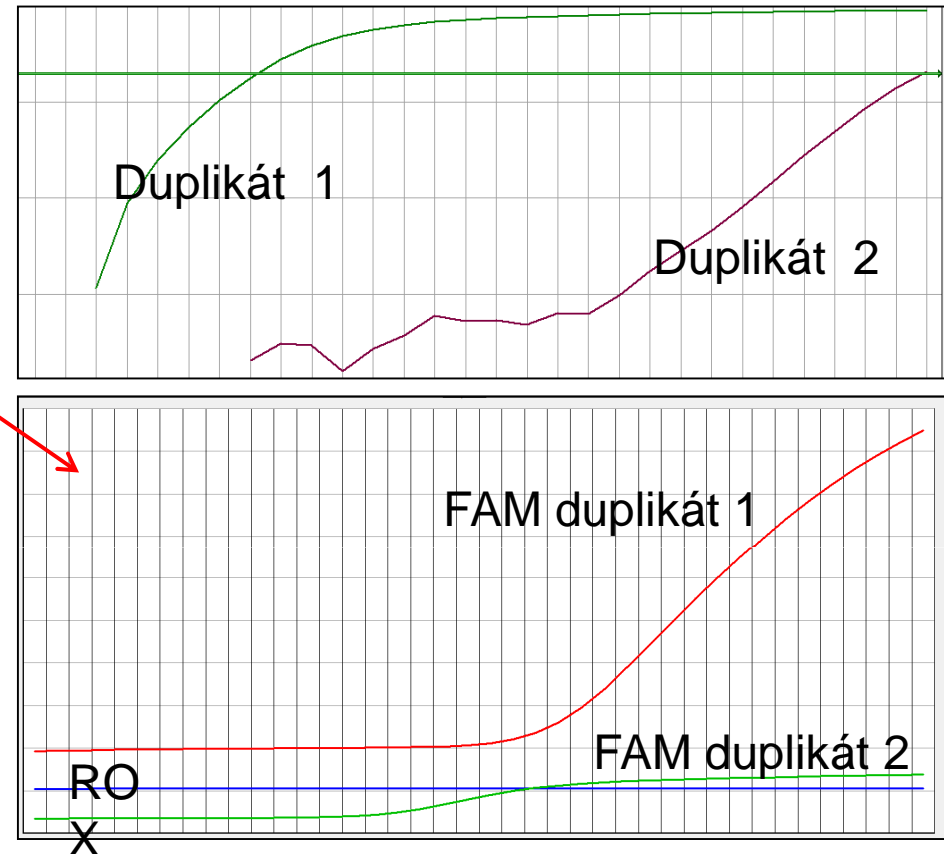
Problém 3:

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.)



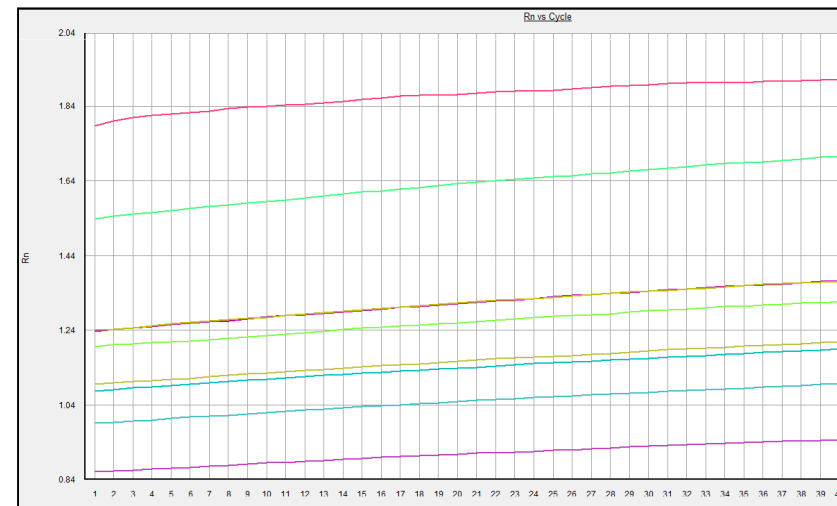
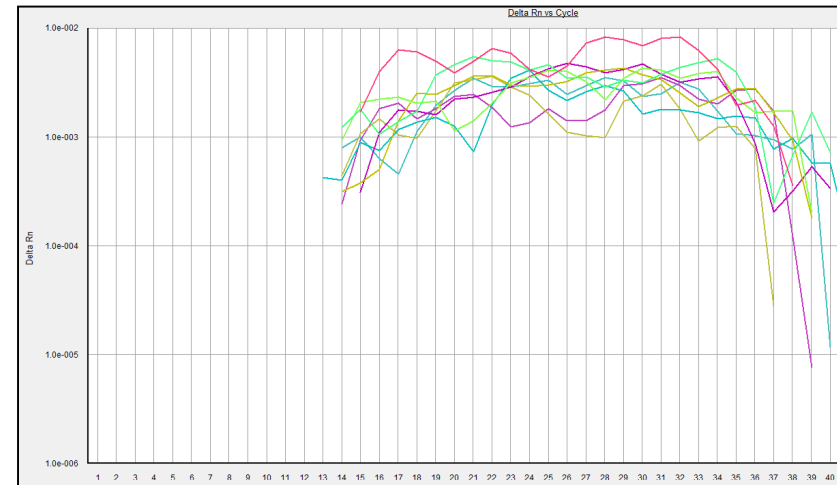
Problémy v qRT-PCR analýze

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:

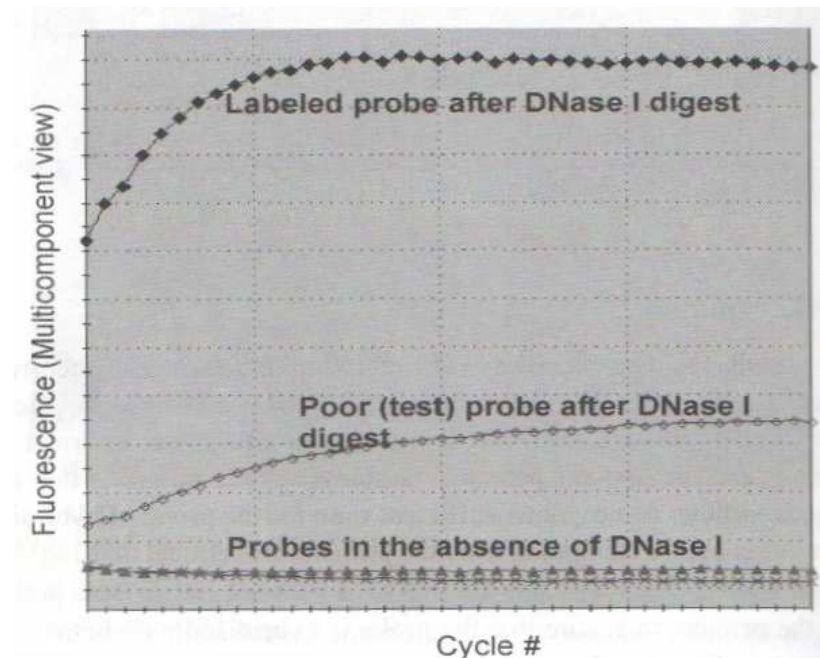
Nefunguje sonda

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

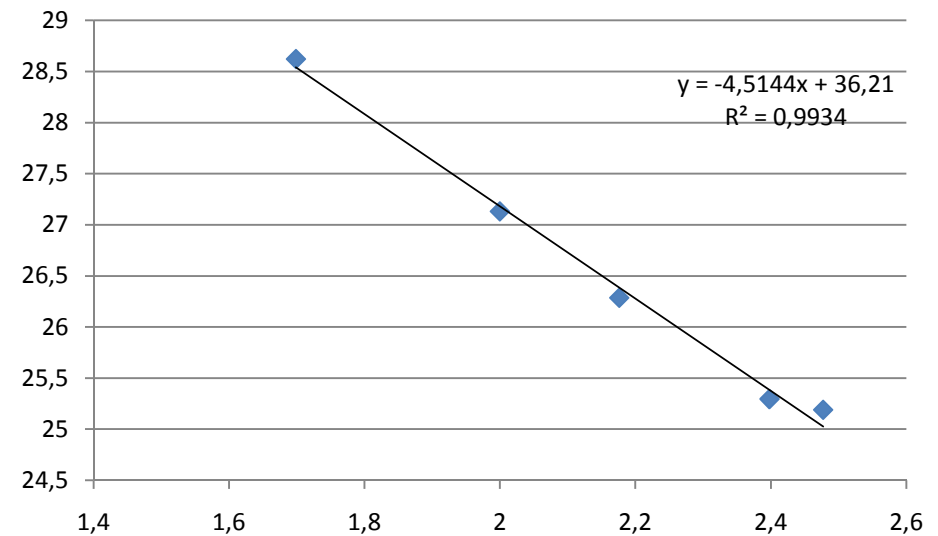
Problém 6:

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

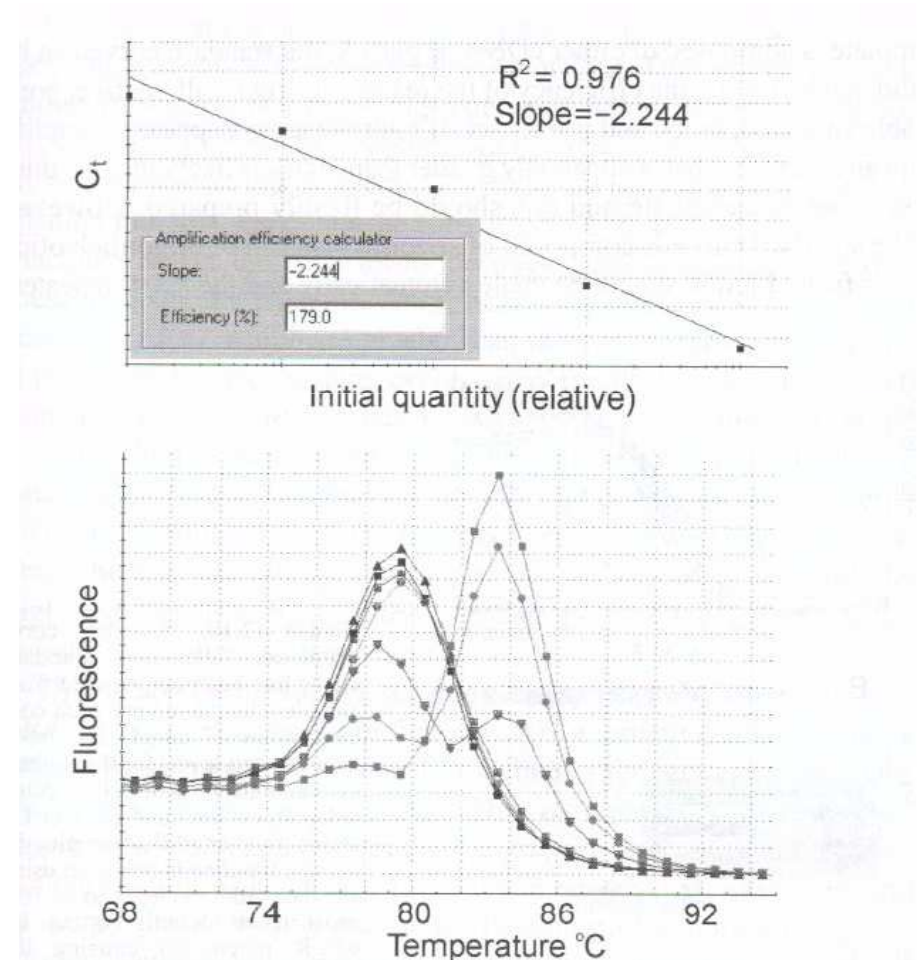
Problém 7:

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

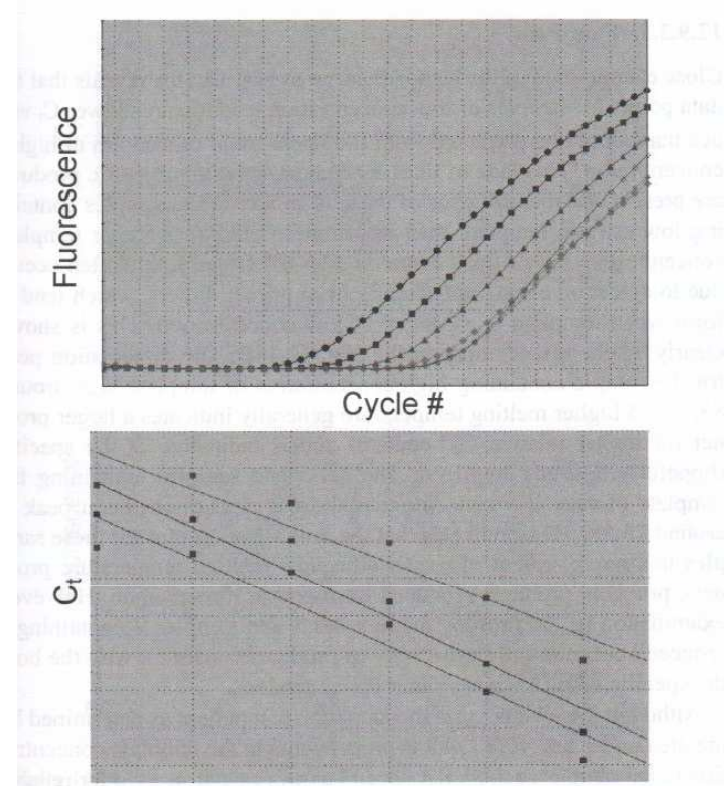
Problém 8:

Nelze naředit standardy na nižší koncentraci

- Přítomnost kontaminující DNA

Řešení:

- nové standardy
- ověřit čistotu RNA vstupující do procesu



Problémy v qRT-PCR analýze

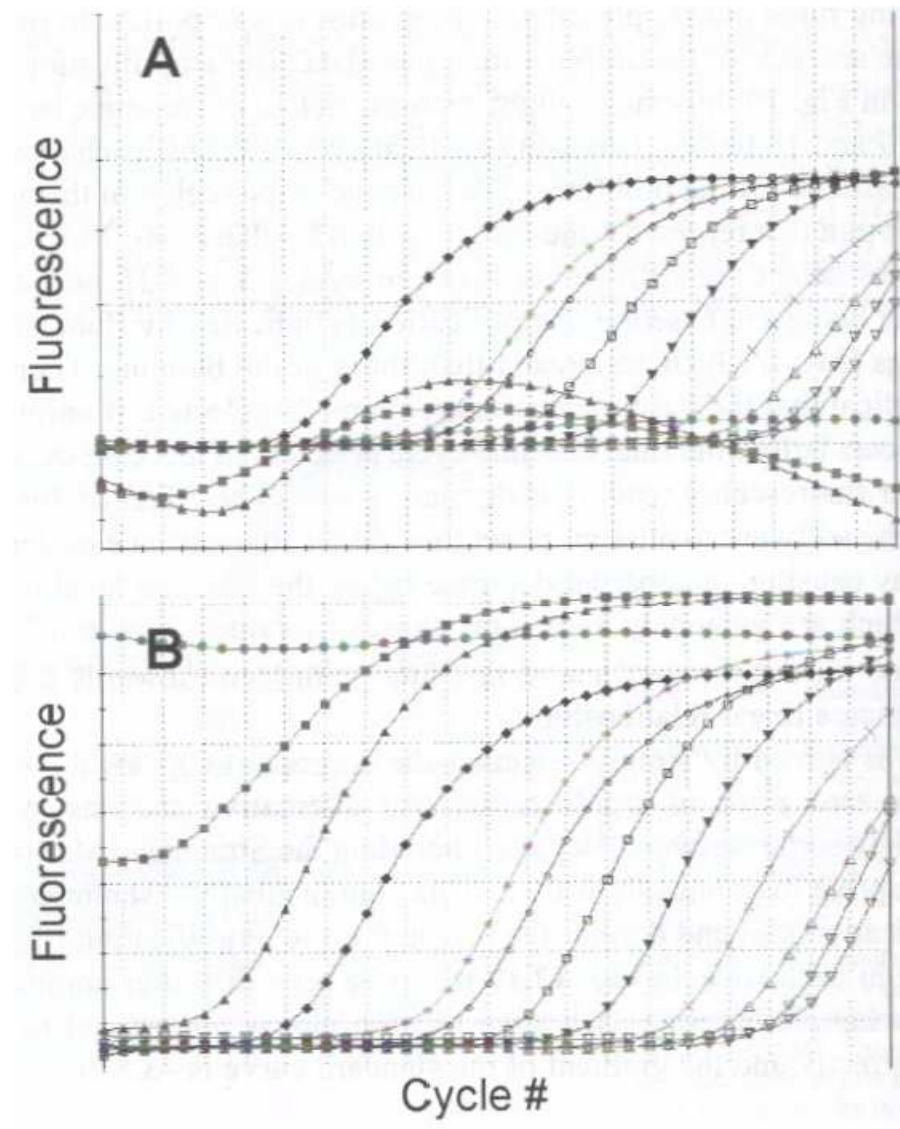
Problém 9:

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

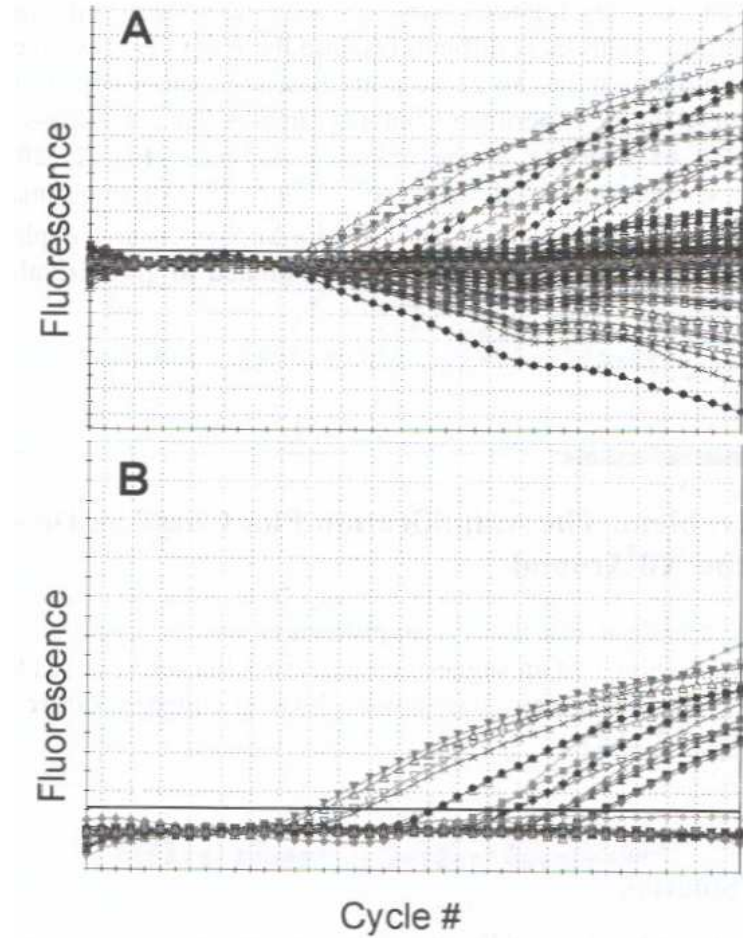


Problémy v qRT-PCR analýze

Problém 9:

Amplifikační grafy vypadají divně

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



Problémy v qRT-PCR analýze

Po této předášce máte představu o tom, 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

9. *Úvahy nad experimentálním designem* *Statistické minimum* & MIQE

Minimum standard for the provision
of information in quantitative PCR

Kvantifikační strategie

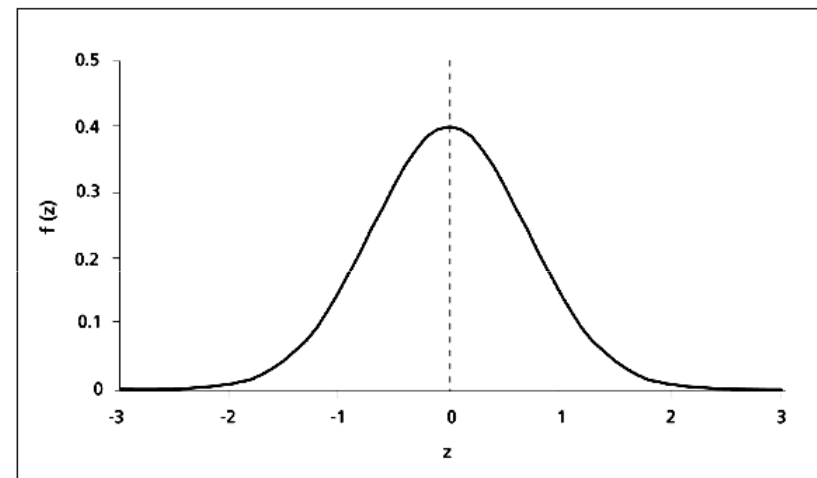
Statistické vyhodnocení

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

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

Parametrické testy

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



Genová exprese (expresní poměry) mívá obvykle normální rozložení, pokud je vyjádřena v log scale.

Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení

Neparametrické testy

- Neznáme parametry rozložení

- Testování rozdílů mezi nezávislými skupinami (Independent samples)

dva vzorky, u kterých porovnáваме průměry některé z proměnných

- Mann-Whitey U test; Kolmogorov-Smirnov test

více skupin

- Kruskal-Wallis test; Mediánový test

- Testování rozdílů mezi závislými skupinami

- Porovnávání proměnných, zjišťovaných na jednom vzorku

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

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

- Testování vztahů mezi proměnnými

- Regrese a korelace (Spearmanův/Pearsonův korelační koeficient)

- Standardní křivky

Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení

Kdy použít který test

Parametrické vs. neparametrické testy

RT-PCR

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

-> **neparametrické testy**

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

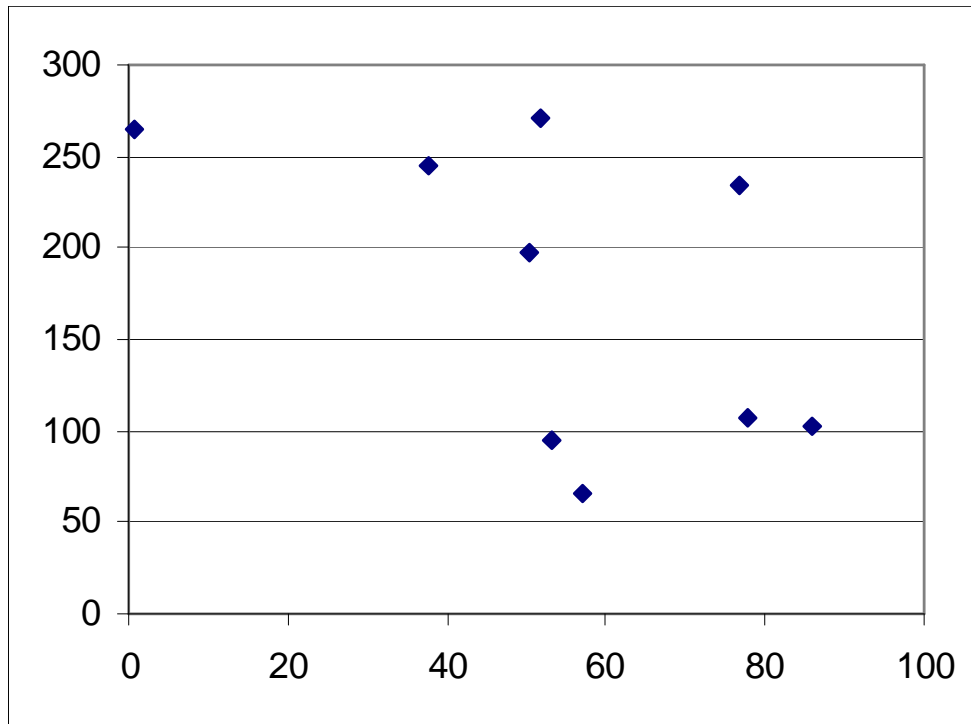
Neparametrické testy jsou méně náchylné k α -chybám (nesprávné zamítnutí nulové hypotézy), ale jsou méně citlivé než parametrické (např. srovnání p u para < p u neparametrických testů), jako signifikantní označí větší rozdíl než parametrické testy.

Kvantifikační strategie

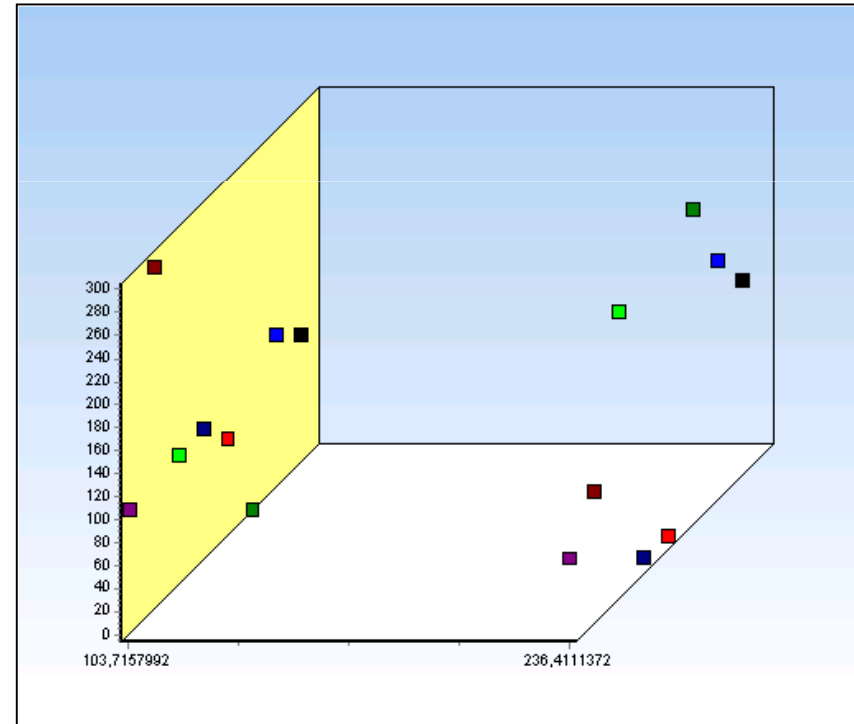
Statistické vyhodnocení

Analýza více genů/vzorků (clustering)

Dvourozměrný graf



Třírozměrný graf



Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení

Analýza více genů/vzorků (hledání trendů, clustering)

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

Př. 10000 genů... (microarray)

Principal component analysis (PCA)

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

Původní osy jdou nahrazeny tzv. komponentami

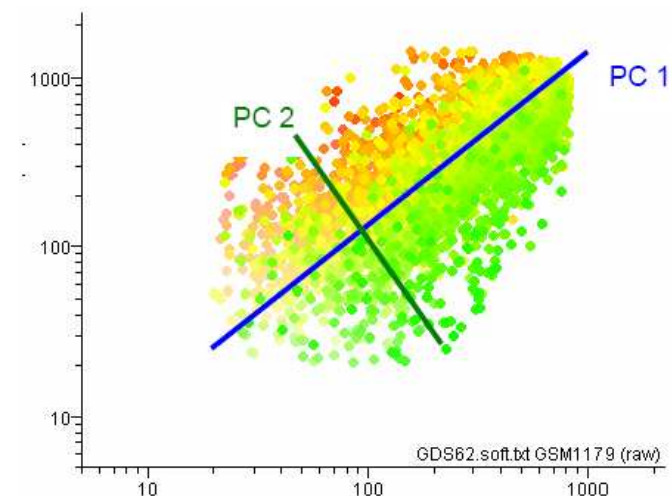
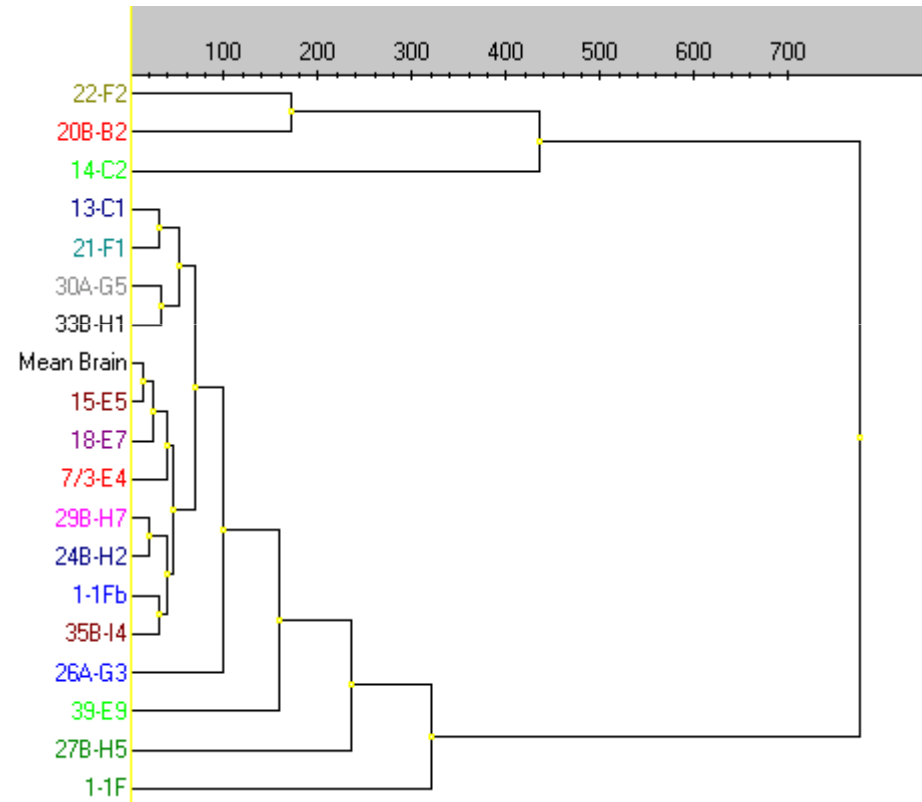
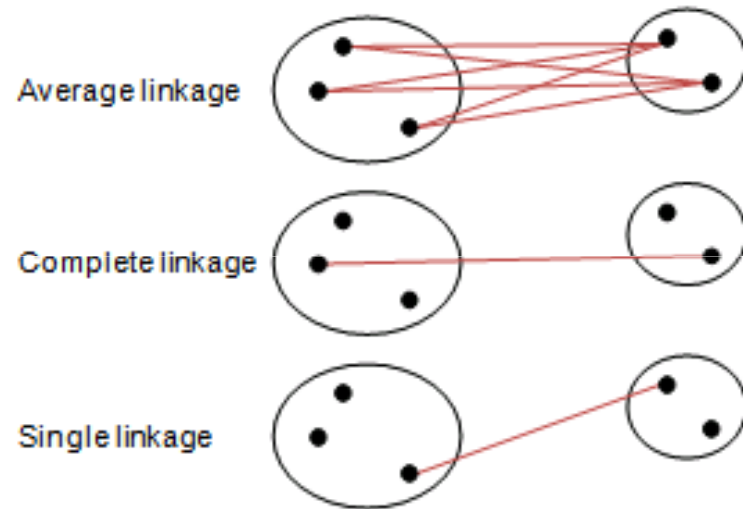


Fig 1: Football-shaped data set with two main components.

Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení – shluková (clusterová) analýza

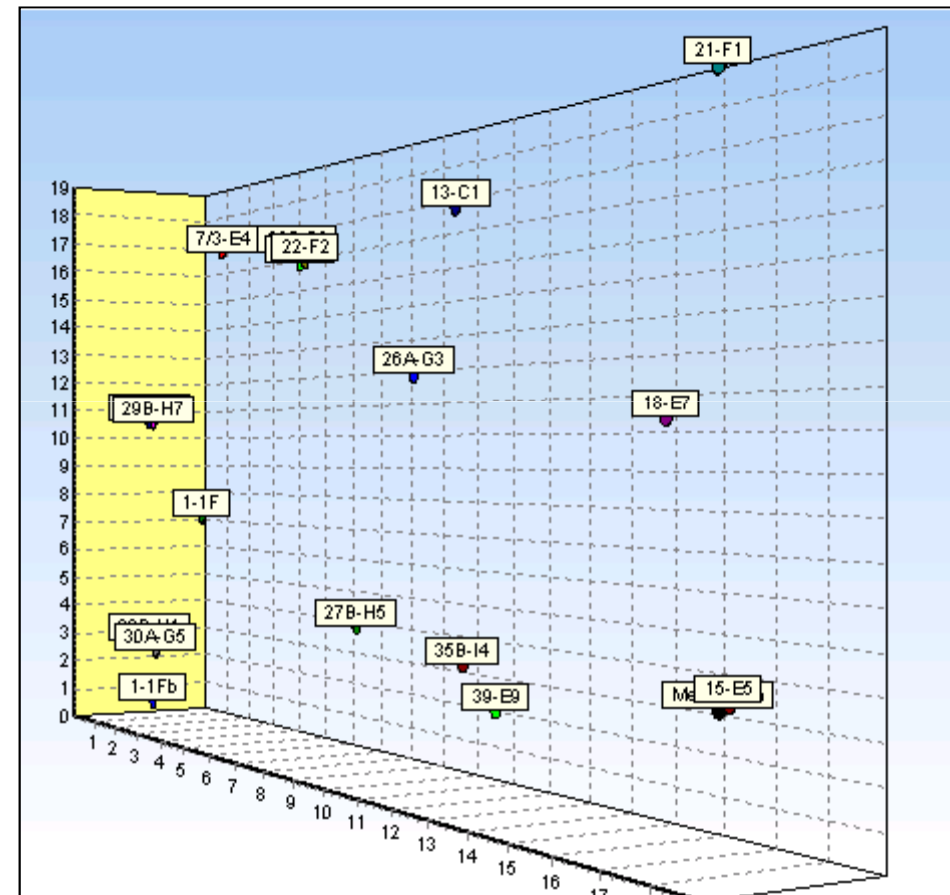
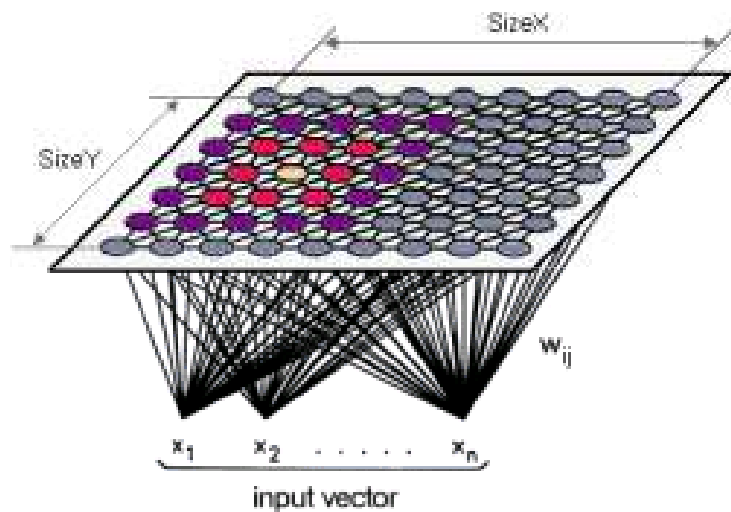
Dendrogramy



Kvantifikační strategie

Statistické vyhodnocení – shluková (clusterová) analýza

Self organizing maps (ANN, Kohonen)



Kritická místa statistického vyhodnocení

Kontrola dat (outliers)

Úprava efektivity PCR

Kompenzace variability mezi jednotlivými PCR (inter-plate calibration)

Normalizace na stejné množství vzorku (RNA/DNA)

Průměrování technických replikátů

Výpočet množství/poměrů

Vlastní statistická analýza

Variabilita a její příčiny

Biologická variabilita

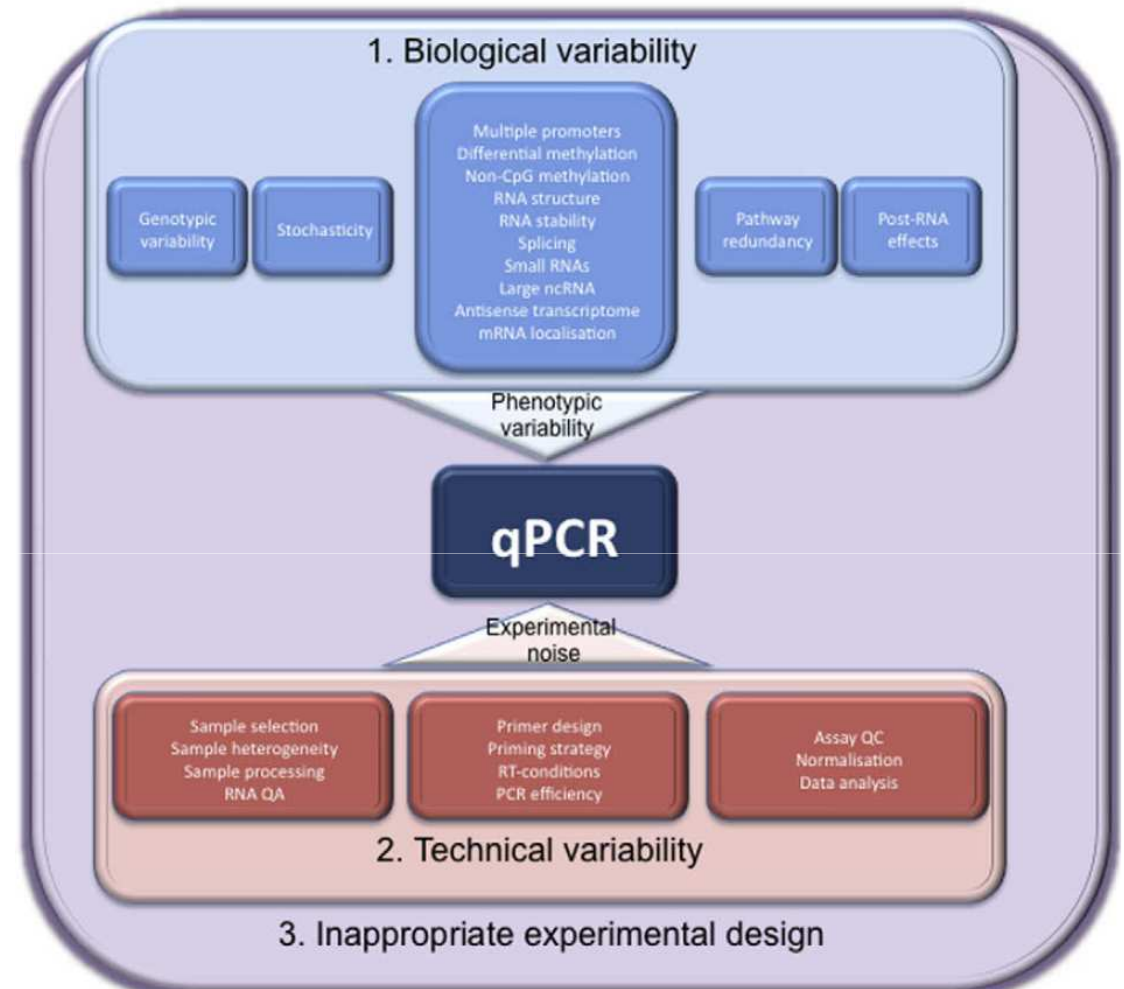
– experimenty odrážejí různorodost reality – nebudou nikdy identické

Technická variabilita

– chyby v měření, znemožňující adekvátní popis reality

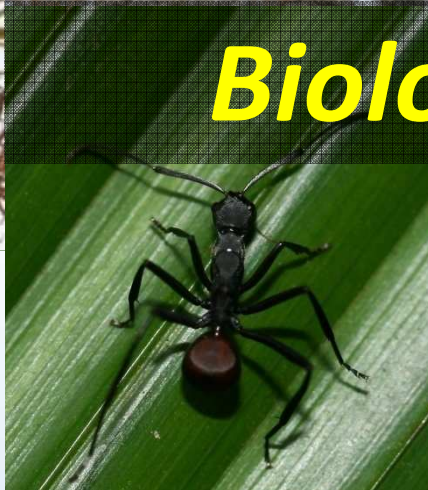
Experimentální design

– chybná hypotéza vedoucí k výsledkům platným pouze v rámci experimentu
– biologické nebo klinické významnosti
– data overestimation



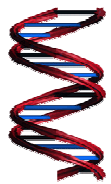


Biologická variabilita



Biologická variabilita

- kombinace genotypových a fenotypových variací mezi jedinci
- tkáně a buňky – dynamické systémy se schopností komplexní adaptace a reakce na různé podmínky



Genetická variabilita

polymorfismy, copy-number variace, alternativní splicing, posttranskripční a posttranslační regulace, epigenetické modifikace



Fenotypová variabilita

environmentální interakce, intra- a extraindividuální faktory (věk, životní/reprodukční cyklus, pohlaví, čas, nutriční stav...)

Biologická variabilita

Stochastická variabilita na úrovni kinetického šumu
biochemických reakcí uvnitř jediné buňky

= dynamické chování jediné buňky není přesně reprodukovatelné



Expresní profily jednotlivých buněk **se liší**,
i v rámci homogenní kultury

Interakce mezi regulačními molekulami a DNA
Lokalizace mRNA a proteinů v rámci buňky
Epigenetické modifikace



**I geneticky identické buňky ve stejném prostředí
mohou mít různý fenotyp**

Biologická variabilita

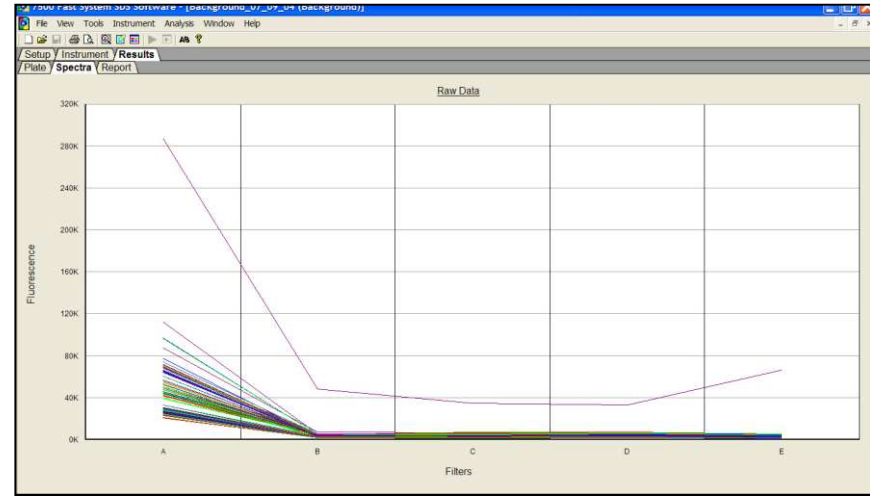
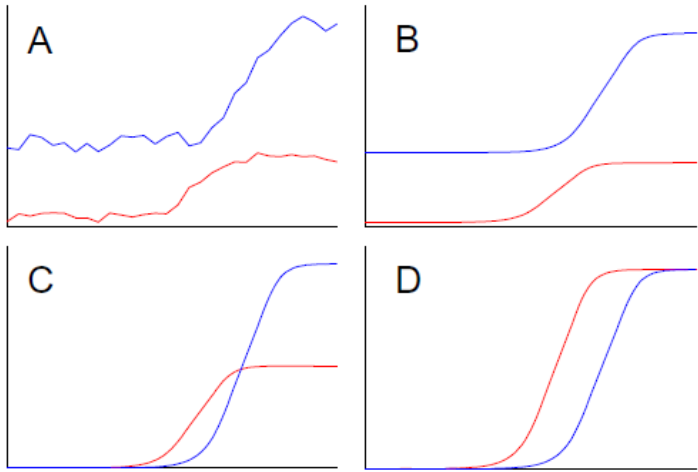
Biologické informační dráhy jsou robustní, redundantní, závislé na buněčném, tkáňovém i environmentálním kontextu



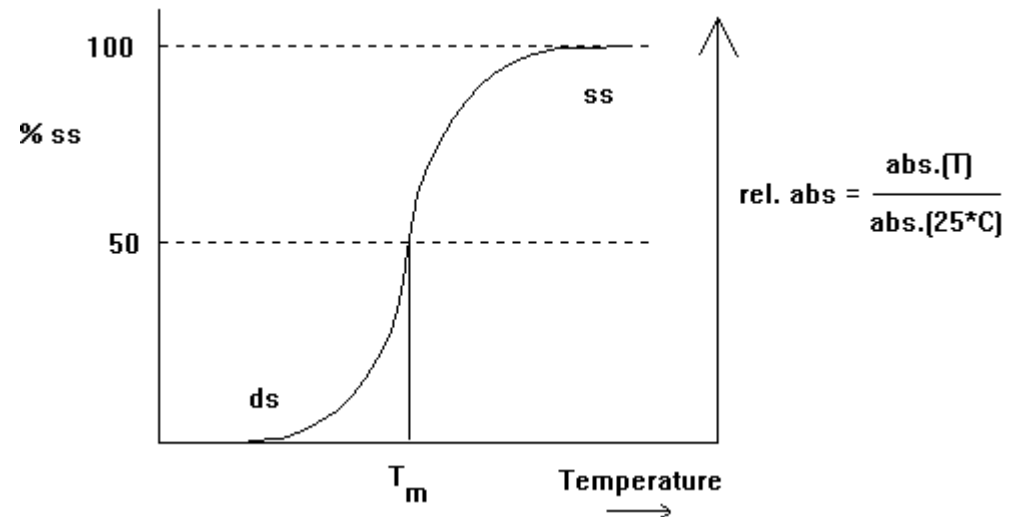
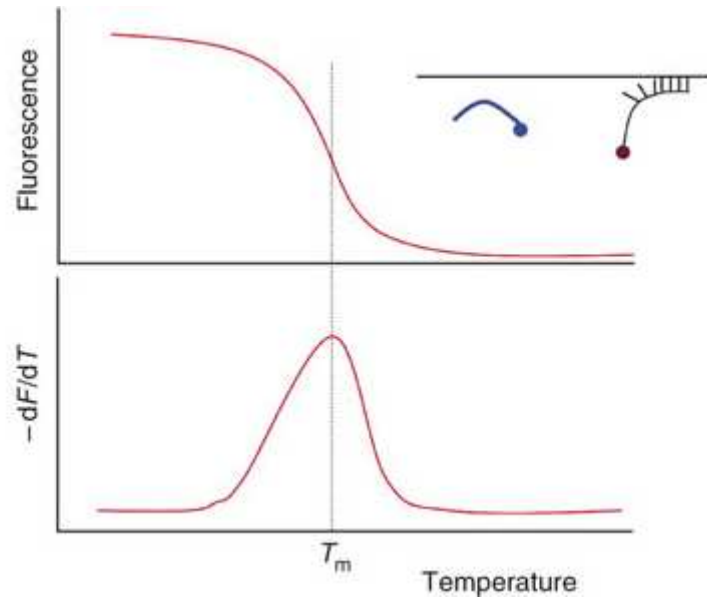
Biologicky relevantní interpretace pozorovaného jevu a jeho odlišení od přirozené variability a heterogenity v daném systému vyžaduje správný experimentální design, analytické metody a vhodný statistický model



Slepě nepřejímat cizí protokoly, přemýšlet 😊



Technická variabilita



$$\text{rel. abs} = \frac{\text{abs.}(T)}{\text{abs.}(25^{\circ}\text{C})}$$

Technická variabilita

PCR & qPCR

jednoduchá, snadná, rychlá, citlivá metoda

→ **Popularita ve vědecké komunitě**

adaptace, úpravy, specifikace protokolů...

→ **Publikace dat s různou kvalitou**


problematická data zpochybňují i oprávněné interpretace

→ **Nutnost standardů**

Technická variabilita

S.A. Bustin/Methods 50 (2010) 217-226

221

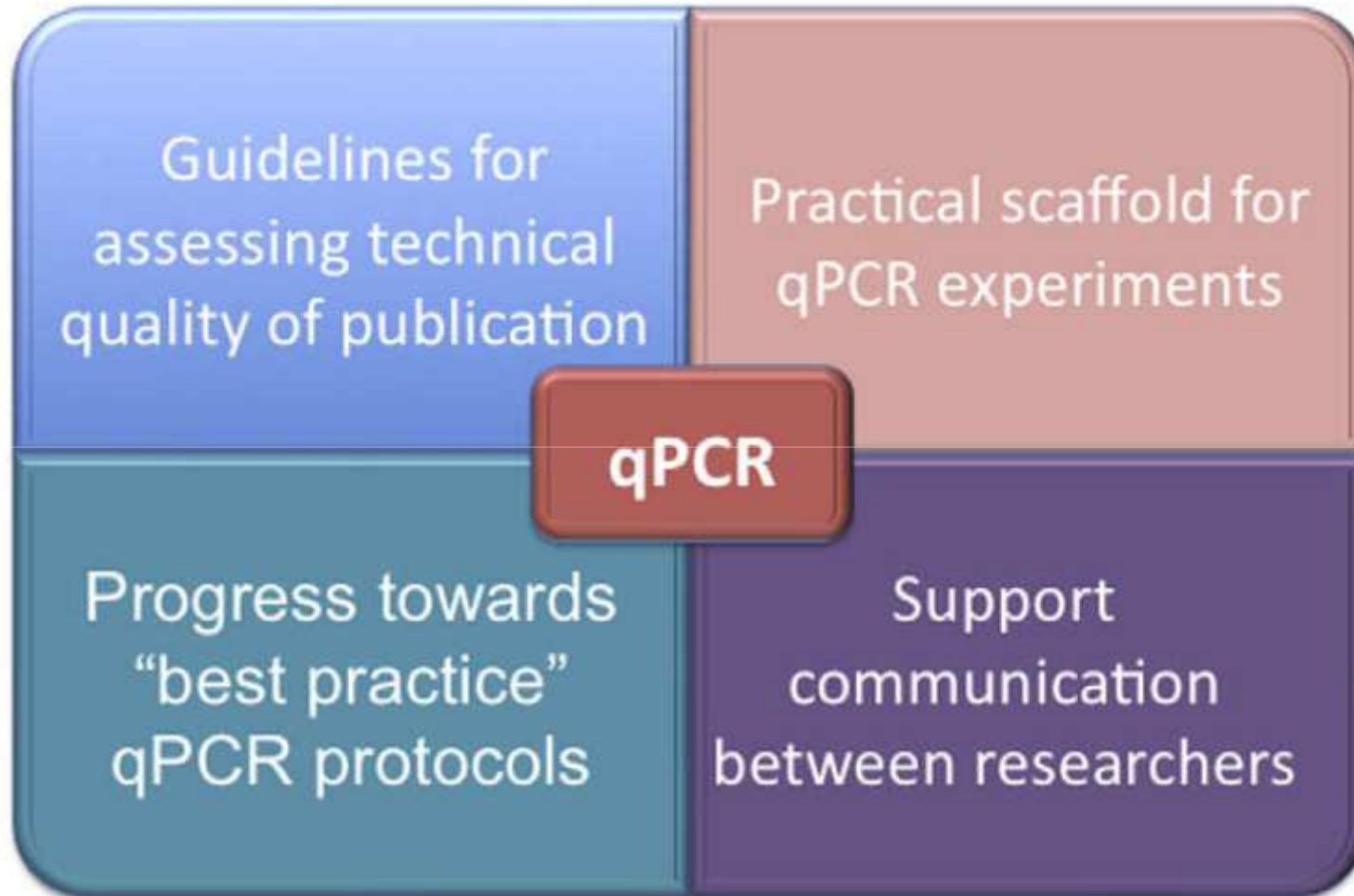


Publication Parameter	A	B	C	D
RNA QA	Agilent	gel	x	Agilent
Primers probes	Assay on demand	✓	✓	✓
RT	✓	✓	✓	✓
cDNA priming	oligo-dT	x	random hexamers	x
Temp/vol/time	✓/✓/✓	✓/✓/✓	x/✓/✓	x/x/x
PCR efficiency	x	x	x	x
Normalisation	single, unvalidated RG	single, unvalidated RG	unvalidated 18S rRNA	single, unvalidated RG
Biological replicates	x	x	x	x

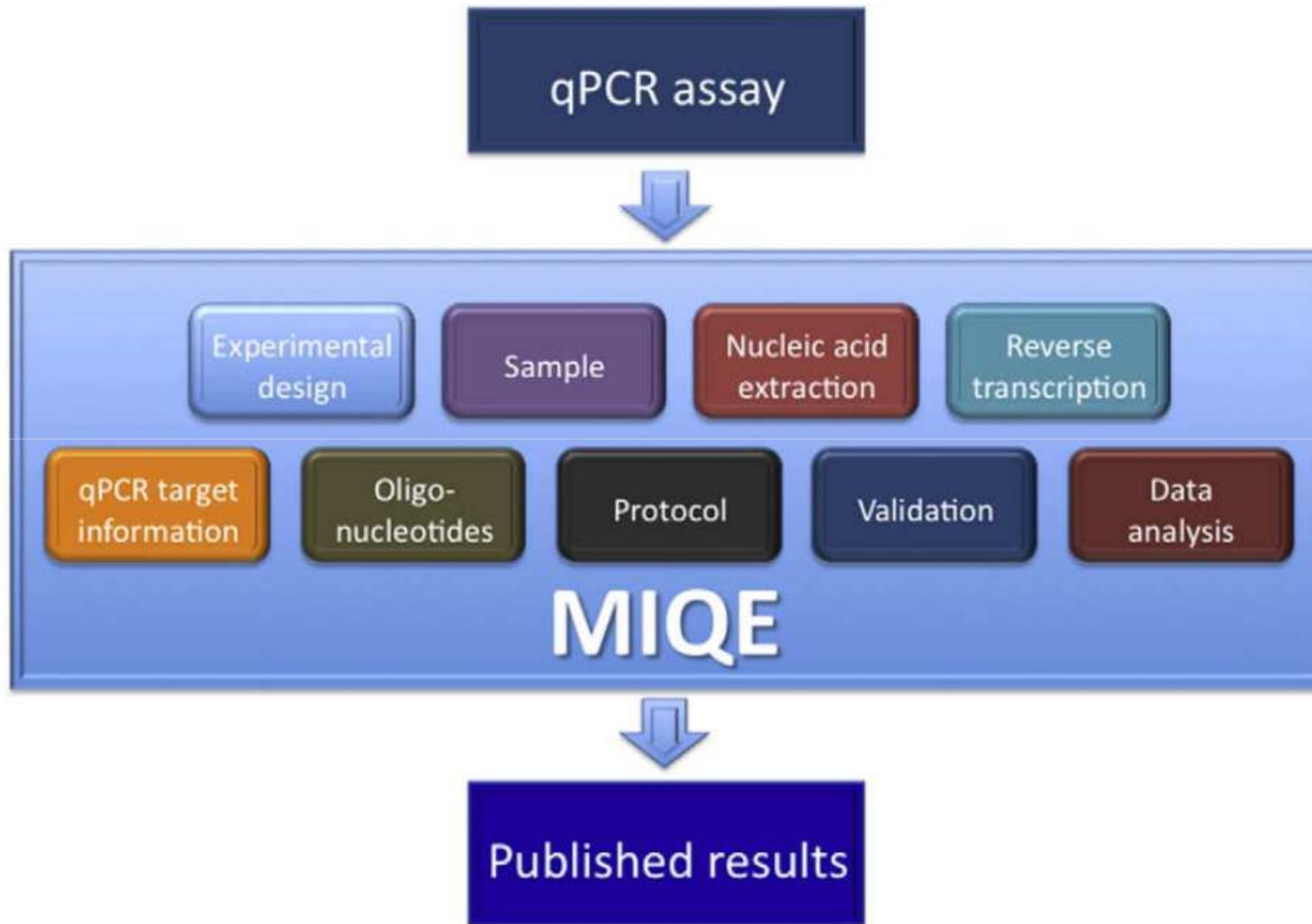
Fig. 4. Analysis of four randomly chosen 2009 qPCR publications. The Materials and Methods sections of four publications were analysed for information content. A red cross denotes no information provided, a green tick denotes information provided.

Bustin SA. 2010. Methods 50(4):217-226.

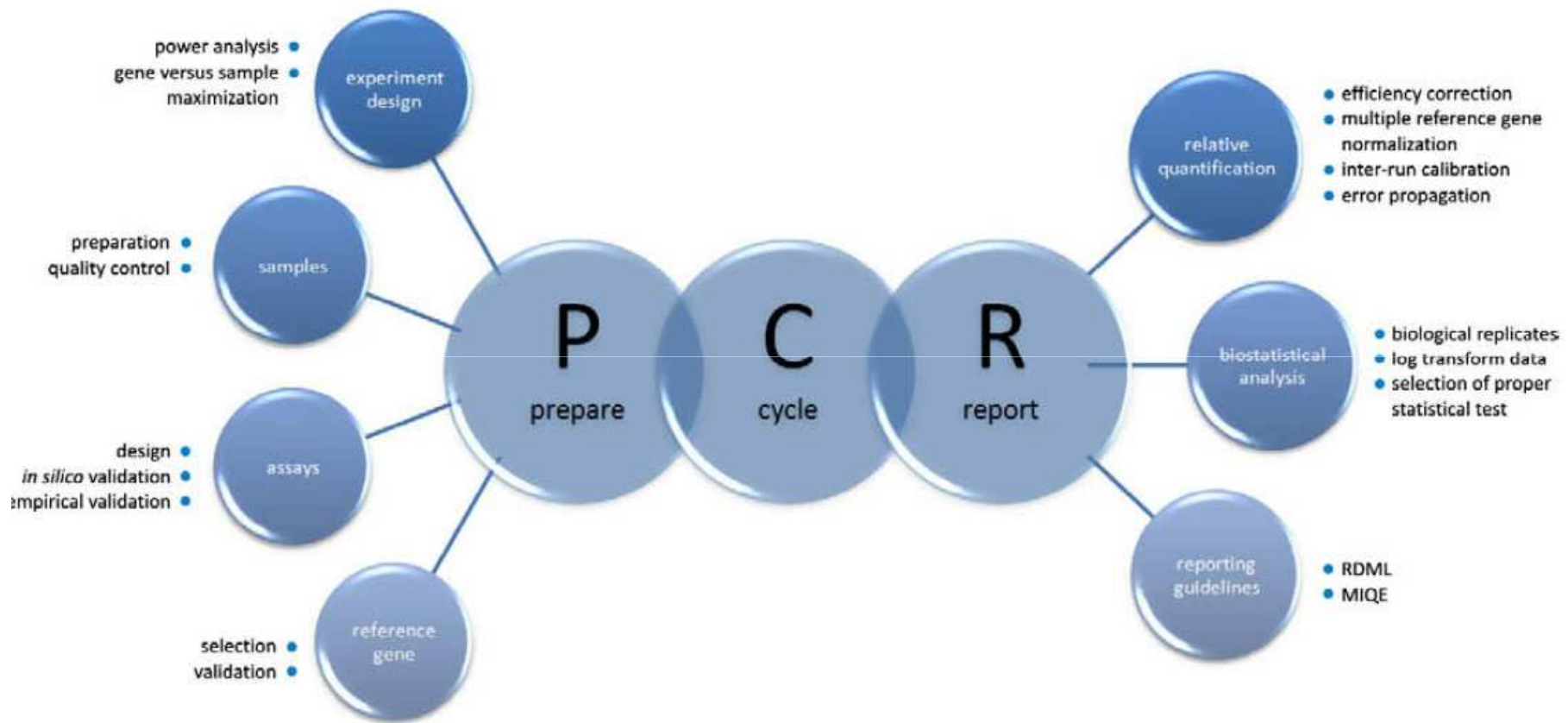
Cíle standardizace



Technická variabilita



Experimentální design



Derveaux S. et al. 2010. Methods 50(4):227-230.

Typický experiment

1. Plán
2. Izolace RNA
3. RT
4. qPCR

Minimalizace propagace technických chyb (errors of measurement) v experimentu

Gene vs. sample maximization

Technické chyby jsou nezávislé v každém experimentálním kroku a aditivní

Plánování experimentu – příklad: exprese jednoho genu ve dvou myších:

Schéma: např. 2 x 3 x 3 x 3

Subjekty	2	myši	2
Vzorky	3	3 odběry vzorků a izolace RNA	6
RT	3	3 RT ze každého vzorku	18
PCR	3	3 PCR replikáty z každé RT	54

Design and Optimization of Reverse-Transcription Quantitative PCR Experiments

Ales Tichopad,^{1,2*} Rob Kitchen,³ Irmgard Riedmaier,¹ Christiane Becker,¹ Anders Ståhlberg,^{2,4} and
Mikael Kubista^{2,5}

Table 1. Variance in biological experiments.^a

	Confounding variance		Studied variance
	Intersubject variance	Processing noise	Treatment effect
Source	Different baseline expression	Sampling	The difference between groups induced by treatment
	Different responses to treatment	RT	
		qPCR	
Intervention	Randomize	Replicates	Maximize effect (e.g., dose selection)
	Large N	Normalization to internal standard or spike	
	Paired measures		

^a The confounding variance consists of the intersubject variance and the processing variance. To maximize the resolution of the effect, the confounding variance must be substantially lower than the effect.

Design and Optimization of Reverse-Transcription Quantitative PCR Experiments

Ales Tichopad,^{1,2*} Rob Kitchen,³ Irmgard Riedmaier,¹ Christiane Becker,¹ Anders Ståhlberg,^{2,4} and
Mikael Kubista^{2,5}

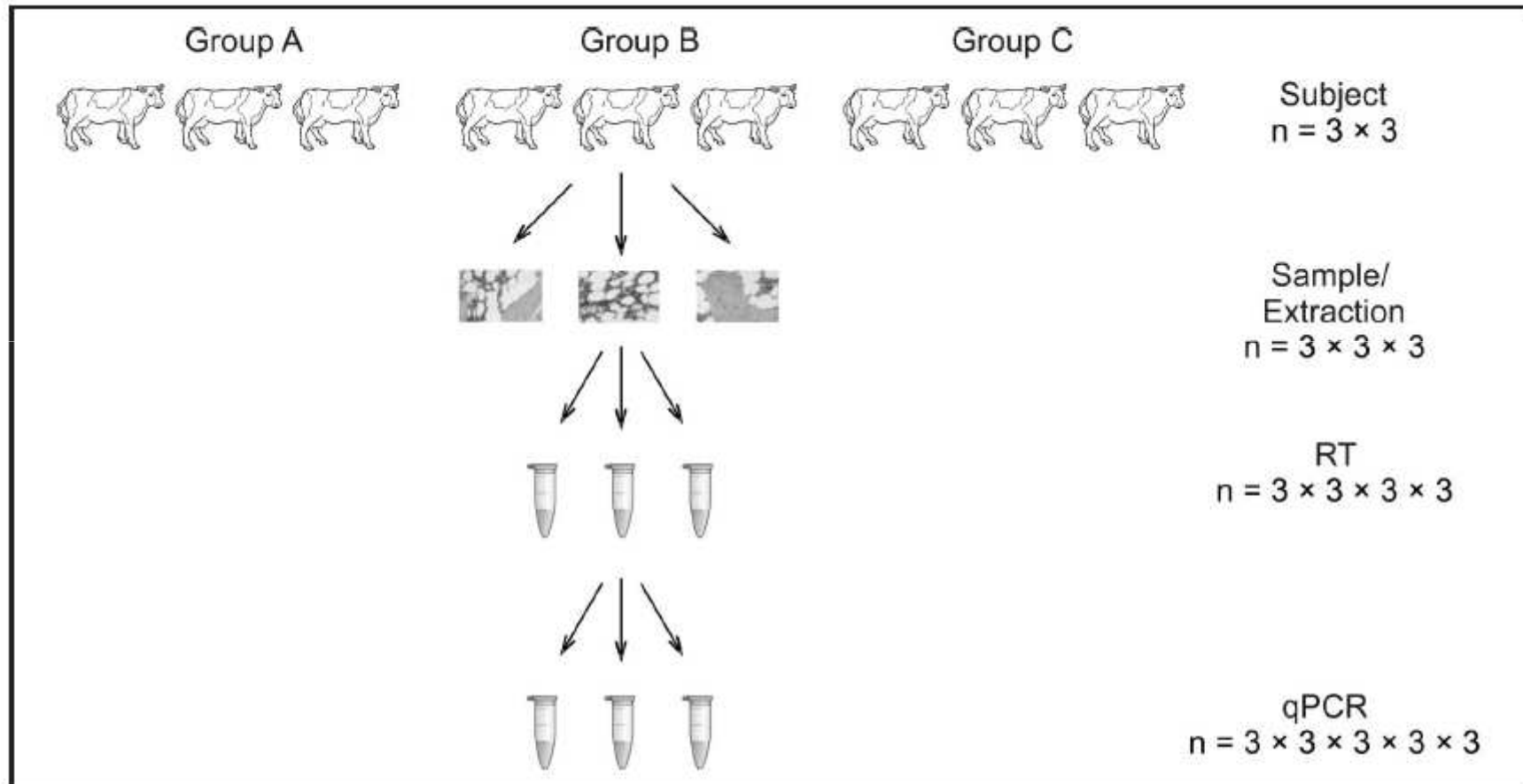


Fig. 1. Comparison of 3 groups with a nested experimental design.

Each group consists of 3 subjects, from which 3 samples are collected and extracted. The extracted and then split into 3 RT reactions, which are then finally into 3 qPCRs. The nested design is $3 \times 3 \times 3 \times 3 \times 3$ and produces a total of 81 Cq values.

Každý krok vnáší do analýzy variabilitu, kterou lze charakterizovat

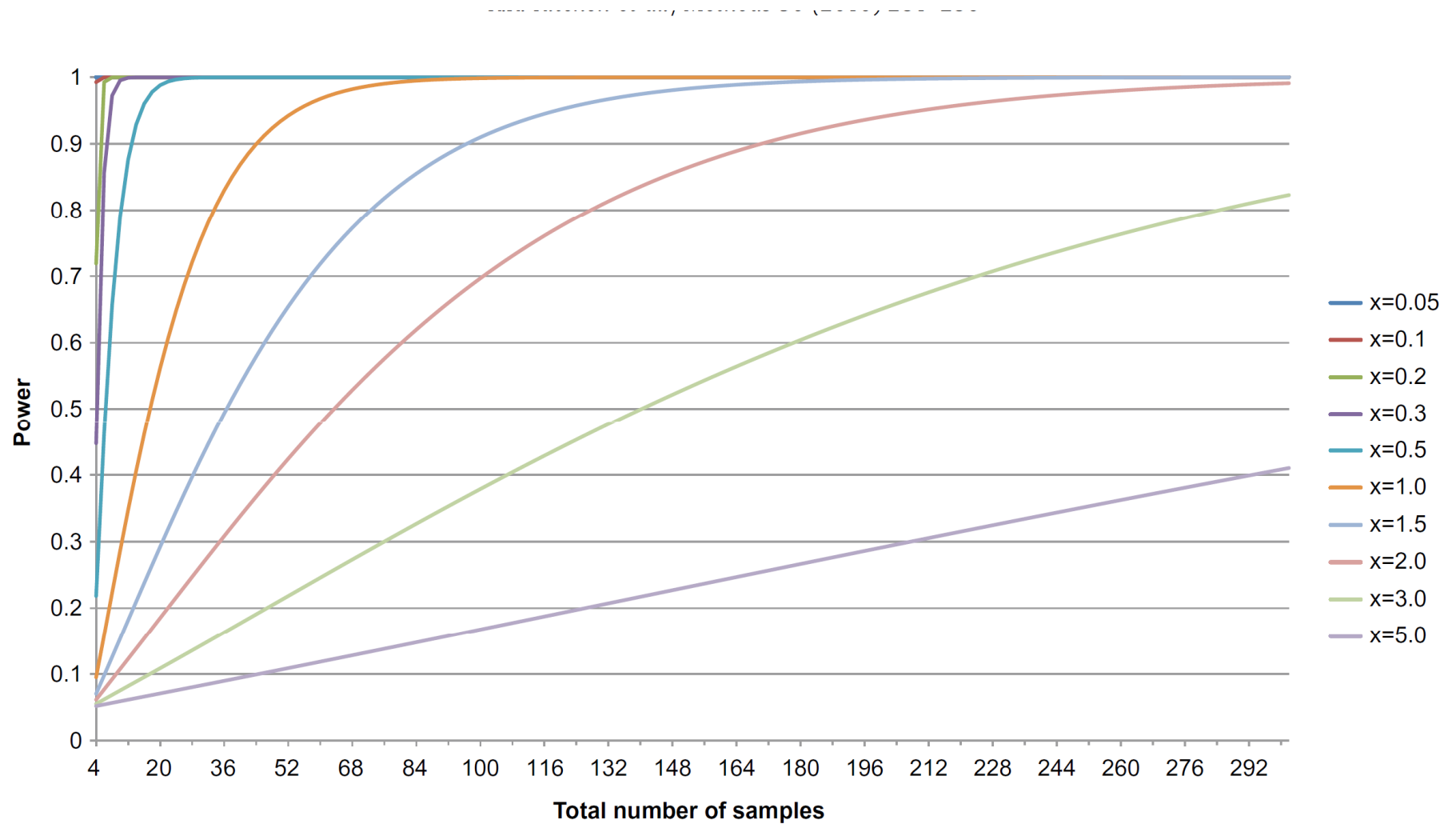
$$Cq_{gijkl} = \mu_g + \alpha_{gi} + \beta_{gij} + \gamma_{gijk} + \delta_{gijkl}$$

$$\sigma_{Cq}^2 = \sigma_g^2 + \sigma_i^2 + \sigma_j^2 + \sigma_k^2 + \sigma_l^2$$

$$vc_x = 100 \times \sigma_x^2 / (\sigma_i^2 + \sigma_j^2 + \sigma_k^2 + \sigma_l^2),$$

where $x = i, j, k, \text{ or } l$.

Určení faktorů , které omezují variabilitu systému umožňuje kalkulovat náklady



Conclusion

Jak navrhnout správný experiment?

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

Variabilita dat

Nežádoucí

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

Řešení: replikáty, normalizace k internímu standardu

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

Řešení: opakovaná měření, normalizace ke kontrolní skupině

Hledaná

Rozdíly mezi testovanými skupinami

Náhodný sampling, velký soubor

KONEC



Merry Christmas

Clazy '01