

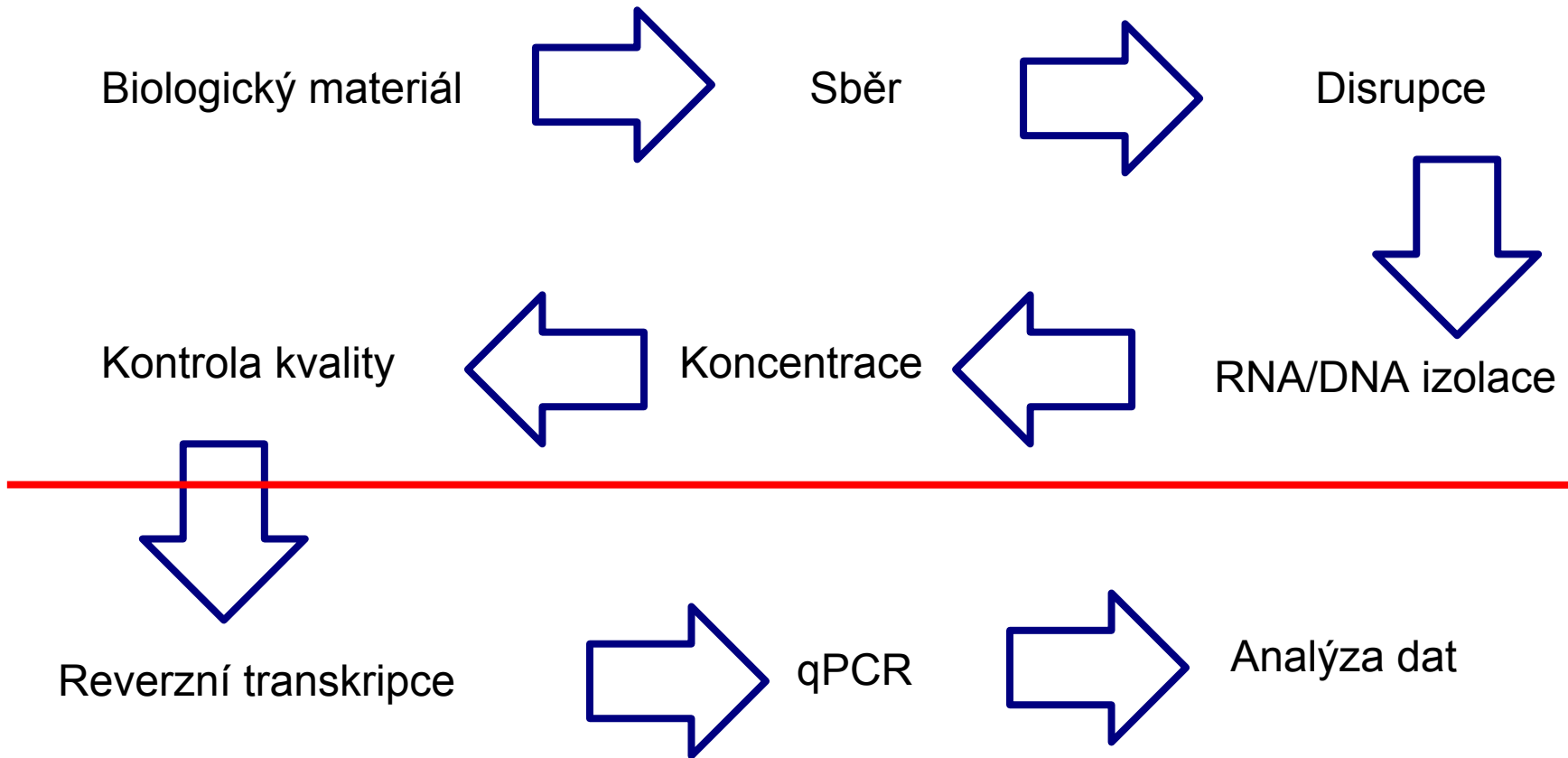
Extrakce RNA- limitující faktor v kvantitativní analýze genové exprese

Radek Šindelka

Oddělení Genové Exprese, BTU AV ČR
a
TATAA Biocenter, Praha



tataabiocenter



Jak může špatná kvalita RNA znehodnotit naměřené výsledky

- degradace a indukce exprese
 - relativní kvantifikace, expresní profily
- chemická inhibice (lipidy, hem, etc.)
 - falešně negativní výsledky
- proteinová kontaminace
 - může také inhibovat RT nebo qPCR,
- kontaminace genomovou DNA
 - absolutní a relativní kvantifikace, expresní profily
- kontaminace
 - (single cell qPCR, falešně negativní výsledky)

Řešení

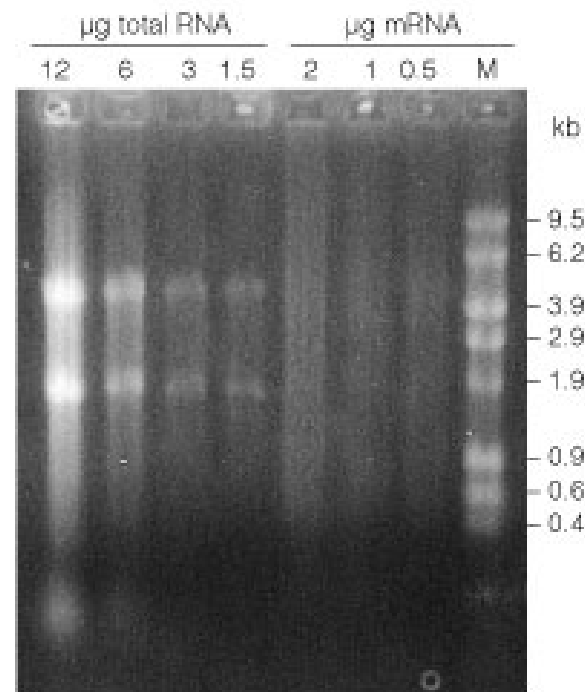
- degradace: odběr vzorku a uchování, disrupce, homogenizace, izolační metoda, kontrola kvality.
- inhibice a proteinová kontaminace: čištění vzorku, kontrola kvality.
- gDNA kontaminace: ošetření Dnázou, -RT reakce.
- kontaminace: laboratorní praxe, oddělené prostory pro RNA izolaci, RT + qPCR a post-PCR práci.

Řešení

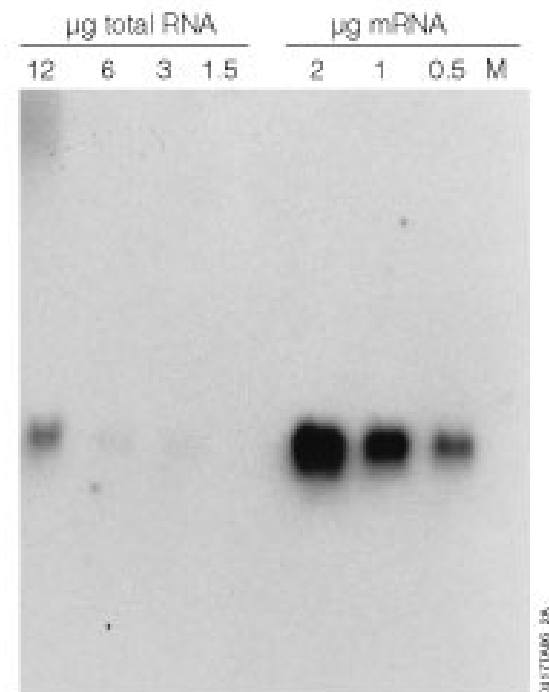
- degradace: odběr vzorku a uchování, disrupce, homogenizace, isolační metoda, kontrola kvality.
- Inhibice a proteinová kontaminace: čištění vzorku, kontrola kvality.
- gDNA kontaminace: ošetření Dnázou, -RT reakce.
- kontaminace: laboratorní praxe, oddělené prostory pro RNA izolaci, RT + qPCR a post-PCR práci.

Gelová elektroforéza

A. Gel analysis of RNA



B. Northern blot



Elektroforetické metody

Kombinace mikrofluidní technologie a kapilární elektroforézy

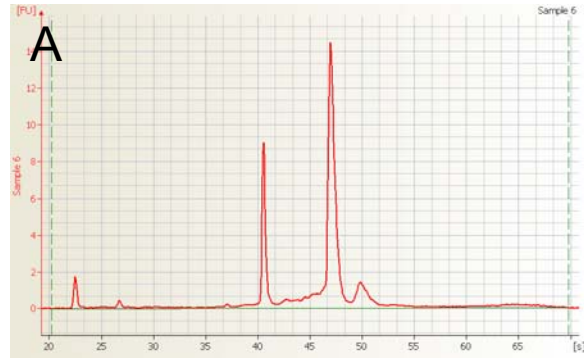
Agilent 2100 Bioanalyzer



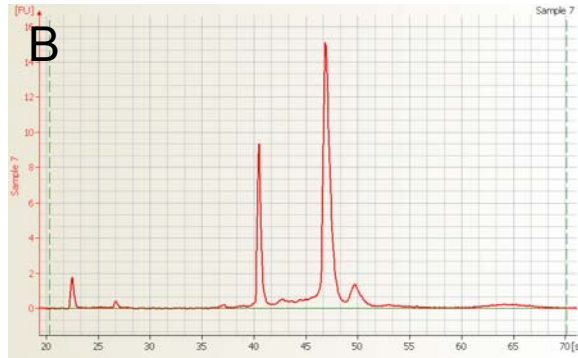
BioRad - Experion



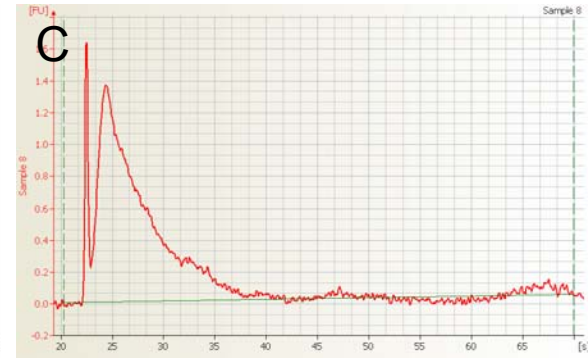
RNA integrity (Agilent Bioanalyzer)



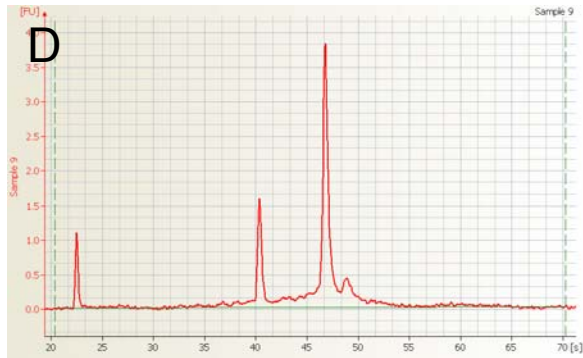
Conc. 110 ng/ul
Ratio: 2.5
RIN: 10



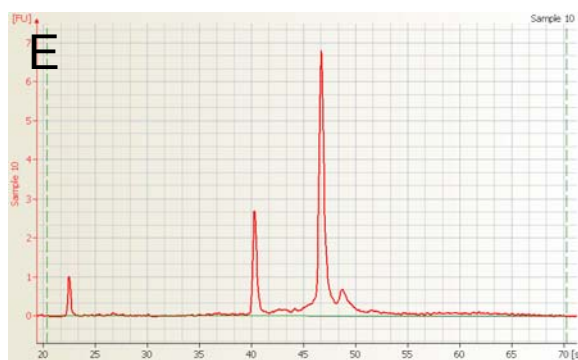
Conc. 110 ng/ul
Ratio: 2.5
RIN: 10



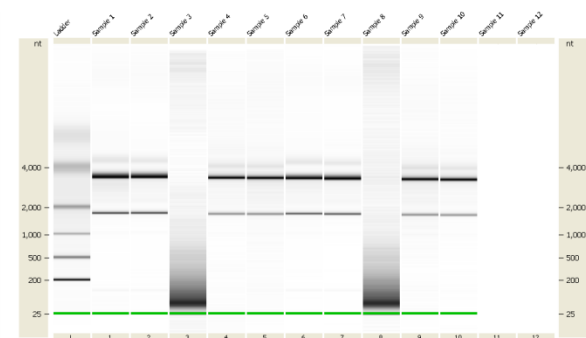
Conc. 62 ng/ul
Ratio: 0.0
RIN: 2.4



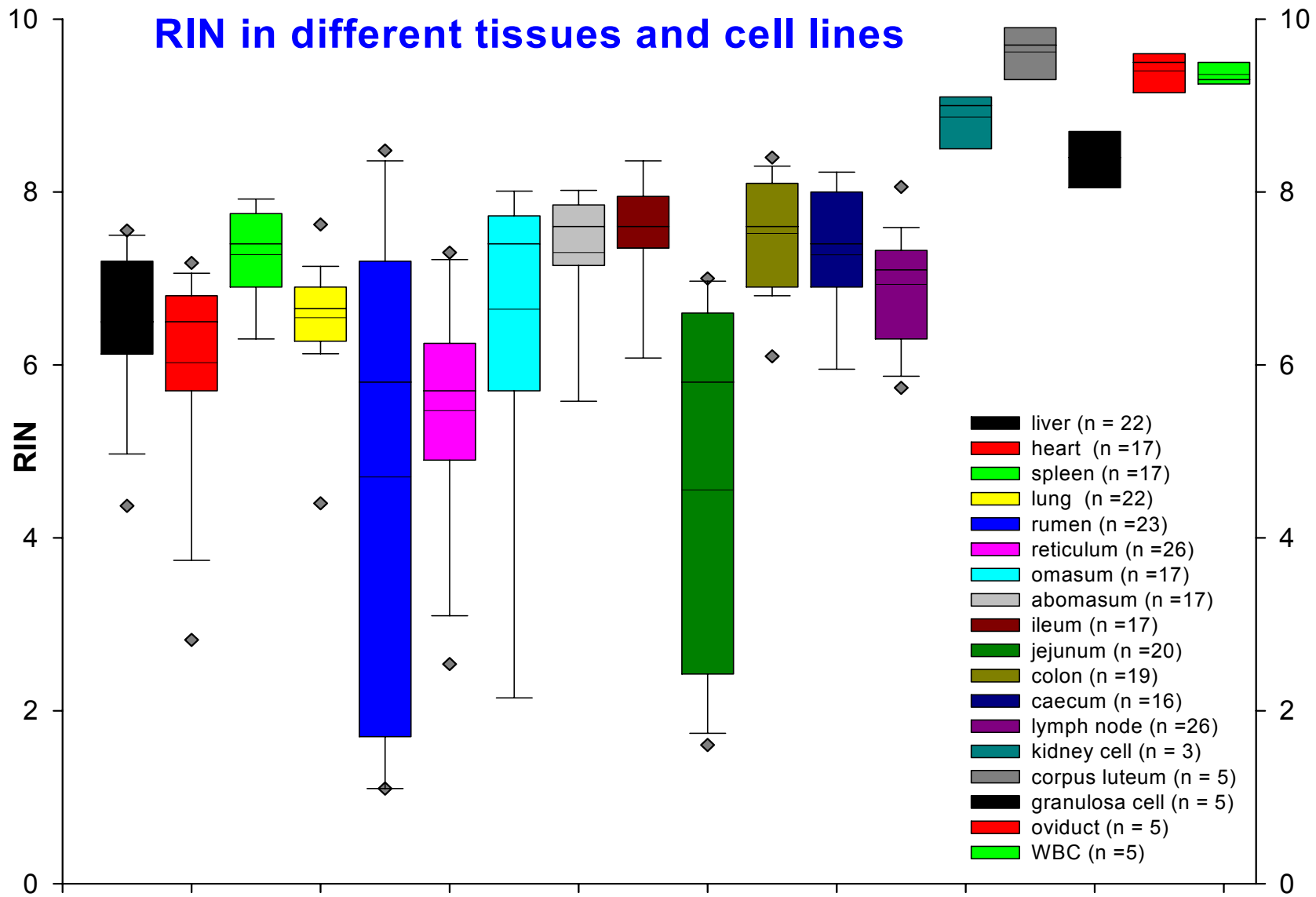
Conc. 30 ng/ul
Ratio: 2.7
RIN: 9.1



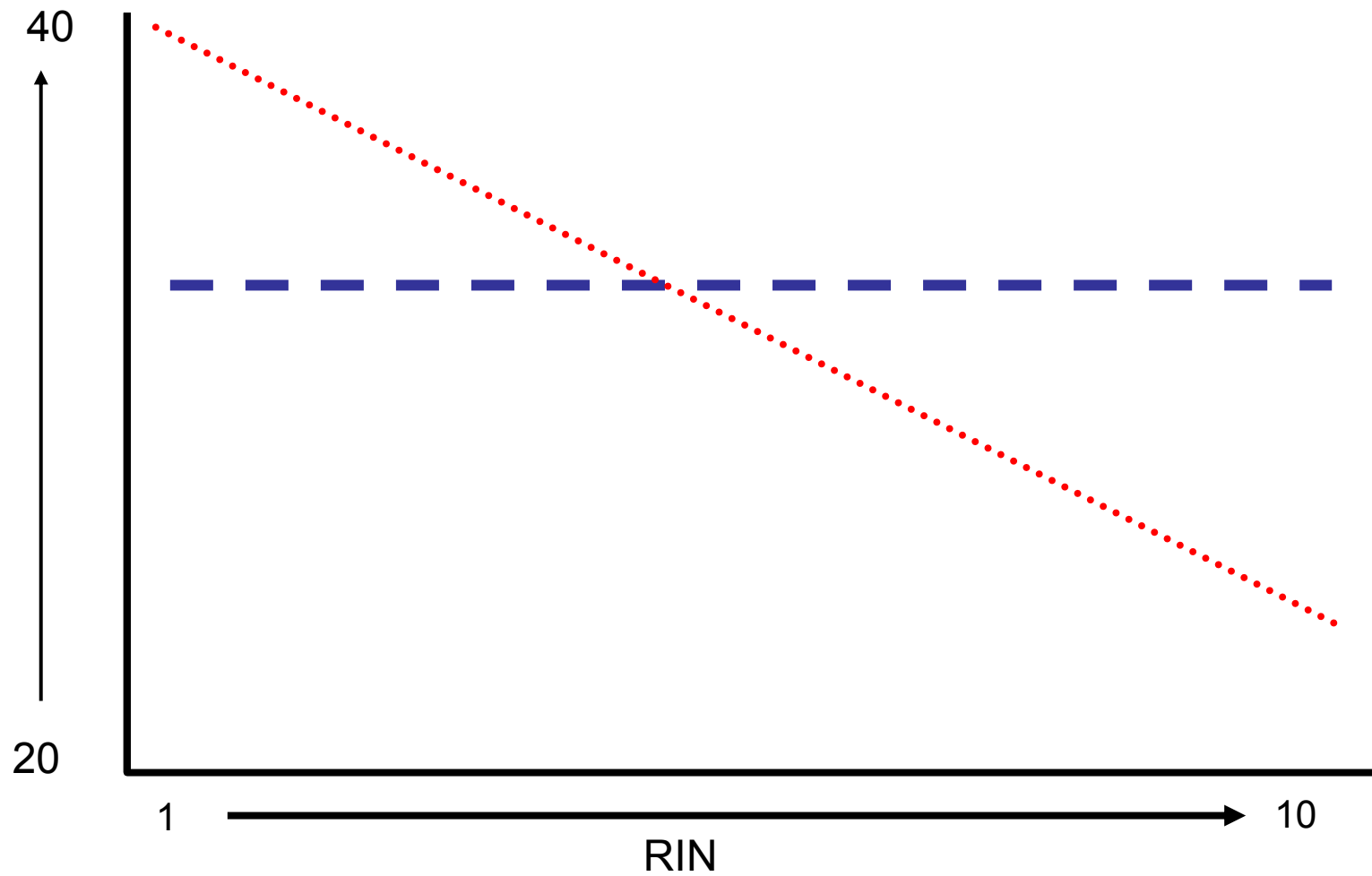
Conc. 43 ng/ul
Ratio: 2.6
RIN: 9.5



RIN in different tissues and cell lines

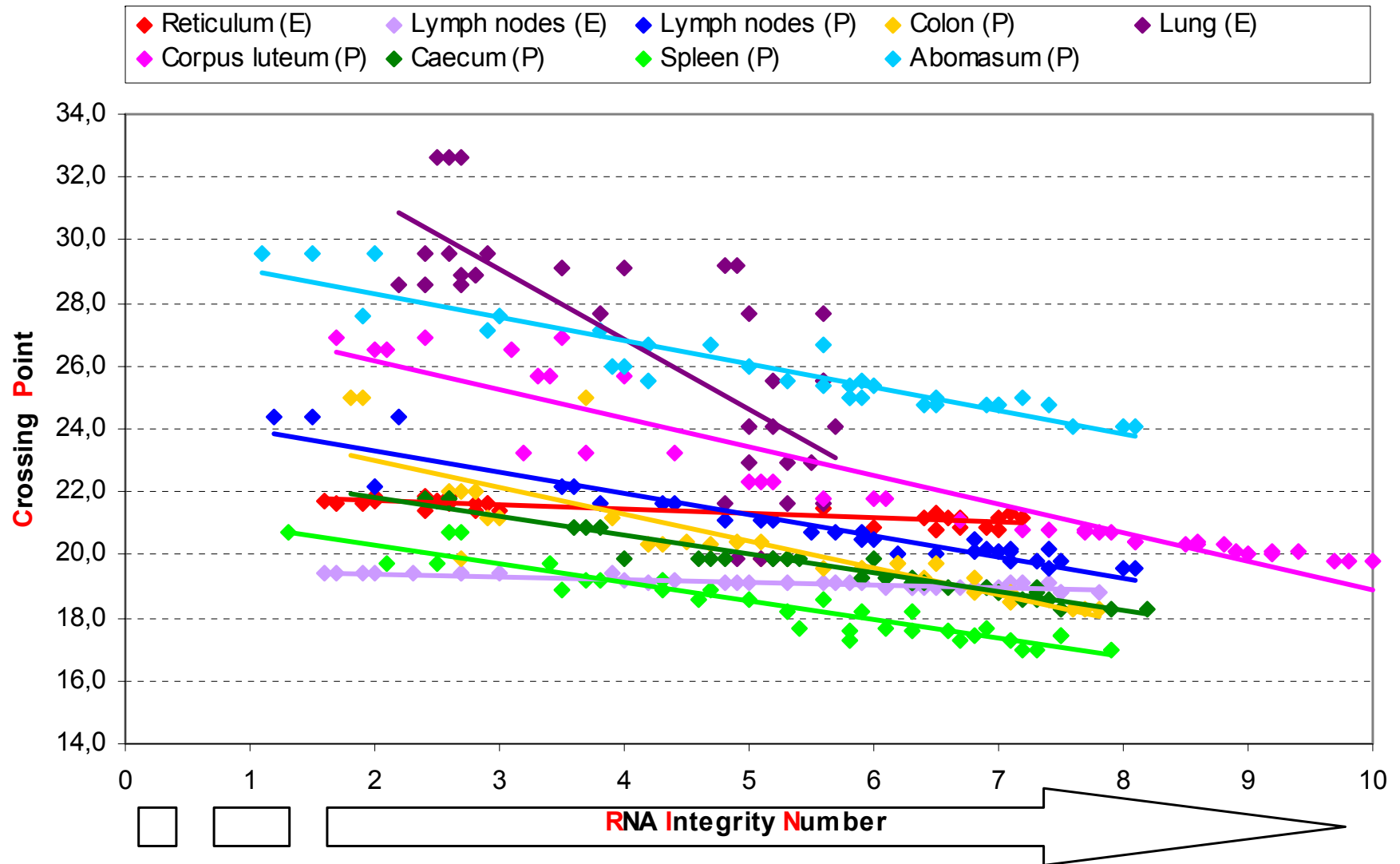


Potenciální efekt RNA degradace (RIN) na Ct



Vliv kvality celkové RNA na qPCR

IL-1: Crossing Point



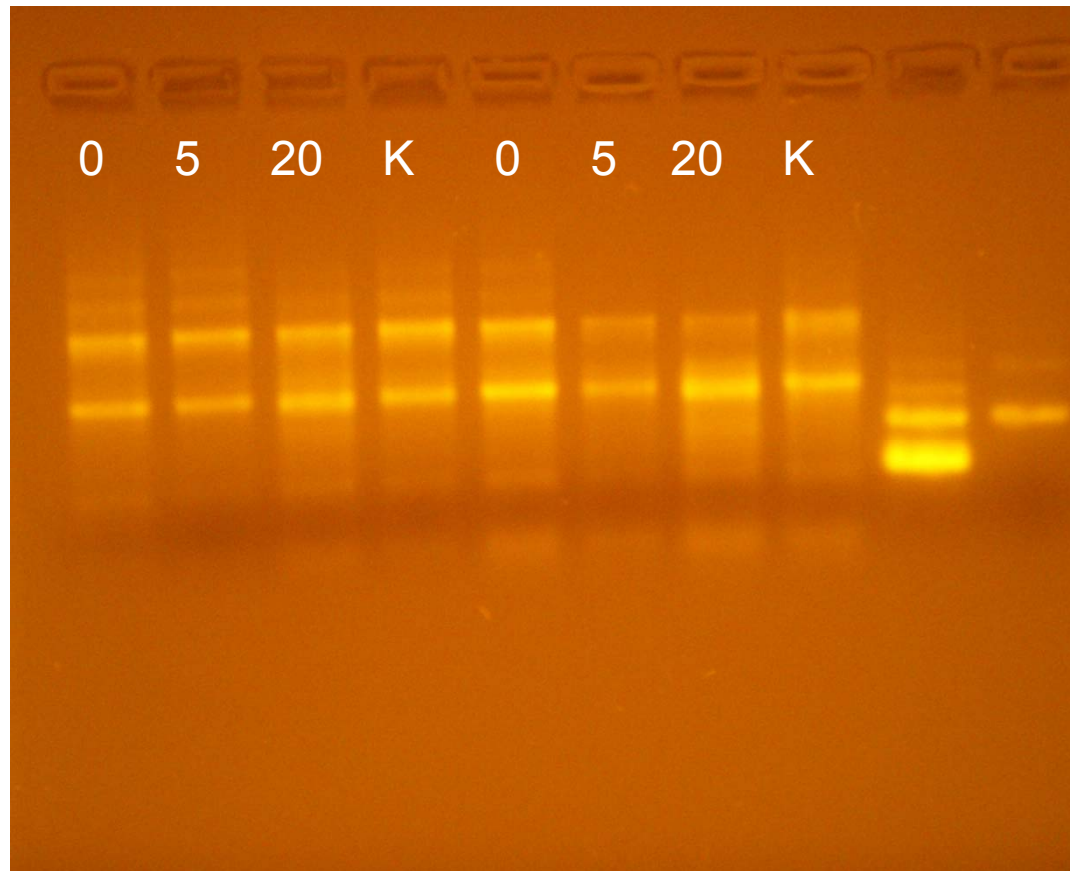
Data od: Michael Pfaffl and Simone Fleige, Freising

Kvalita RNA a stabilita genové exprese referenčních genů

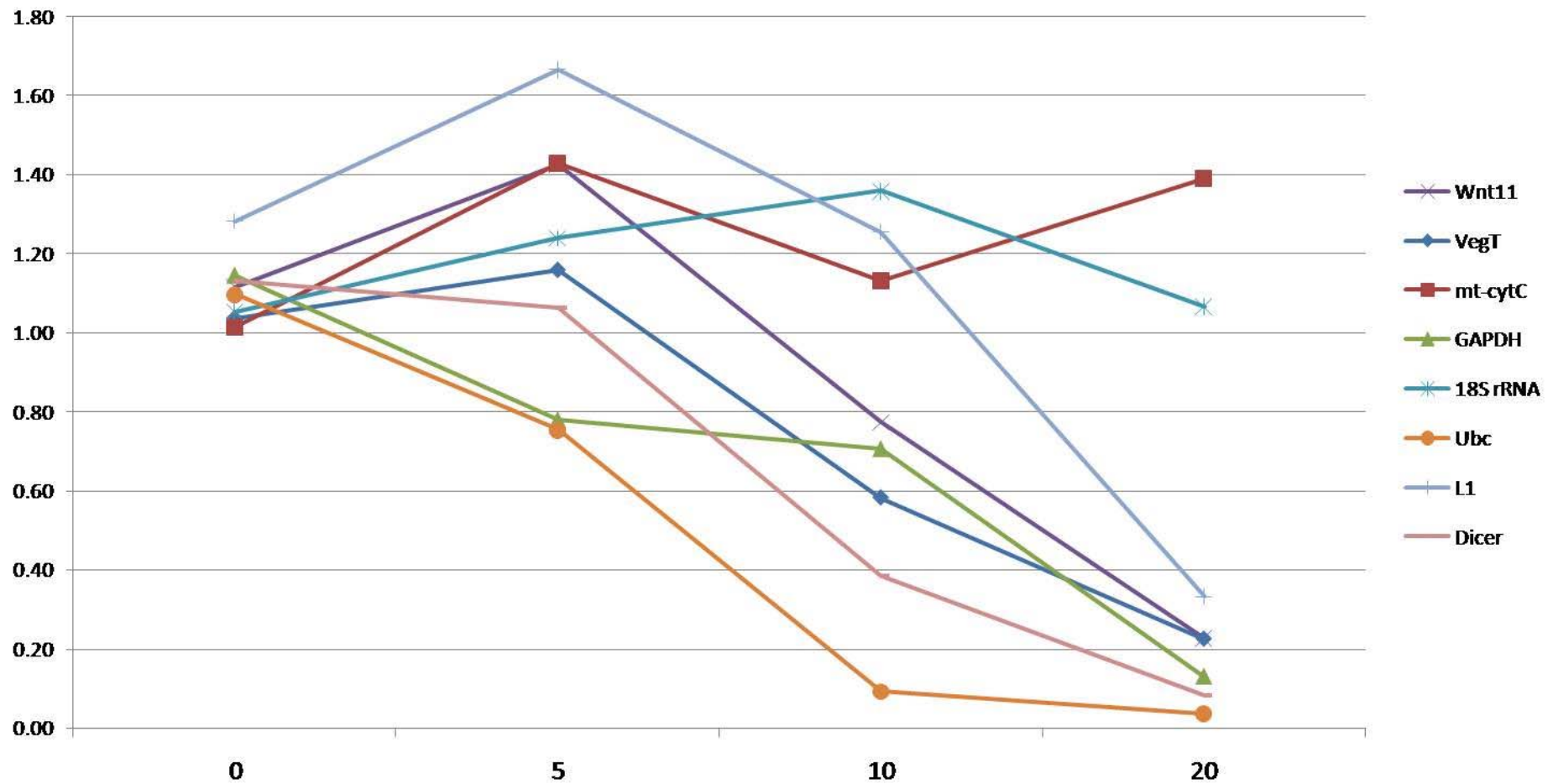
- Rozdíly v hodnocení referenčních genů

Step*	Degraded RNA (CRS samples)	Intact RNA (CRS samples)	Degraded RNA (NP samples)	Intact RNA (NP samples)
1	HPRT1	GAPD	HPRT1	YWHAZ
2	YWHAZ	YWHAZ	ACTB	B2M
3	B2M	RPL3IA	RPL3IA	RPL3IA
4	TBP	B2M	GAPD	UBC
5	RPL3IA	UBC	TBP	GAPD
6	UBC	HPRT1	YWHAZ	HMBS
7	ACTB	TBP	HMBS	HPRT1
8	GAPD	ACTB	SDHA	SDHA
9	HMBS- SDHA	HMBS- SDHA	B2M- UBC	ACTB- TBP

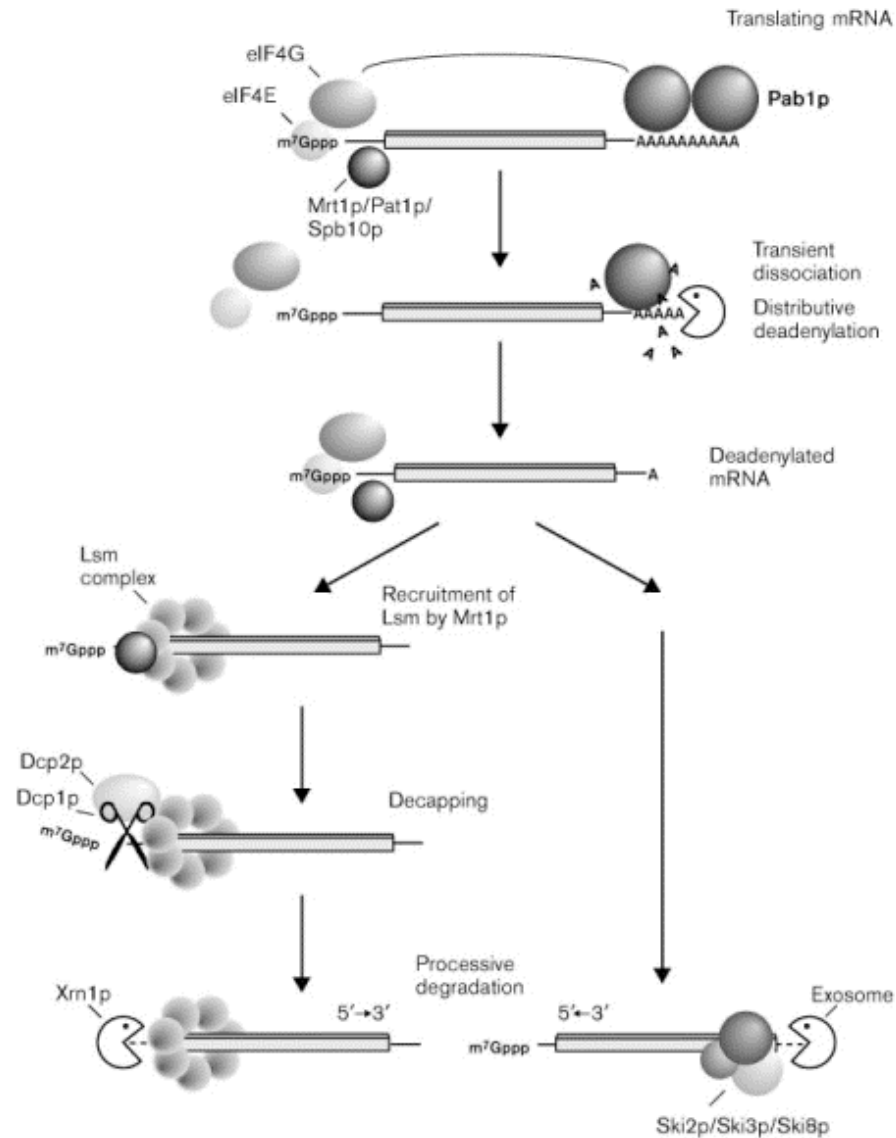
Degradace RNA v čase

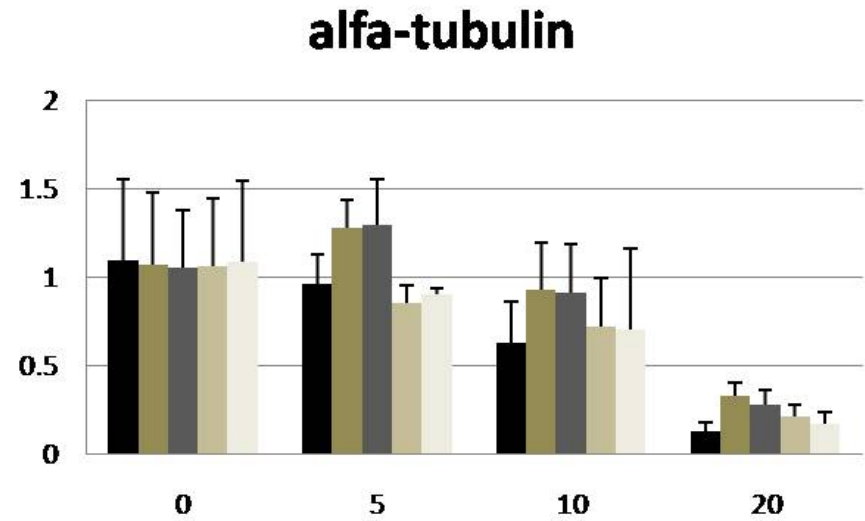
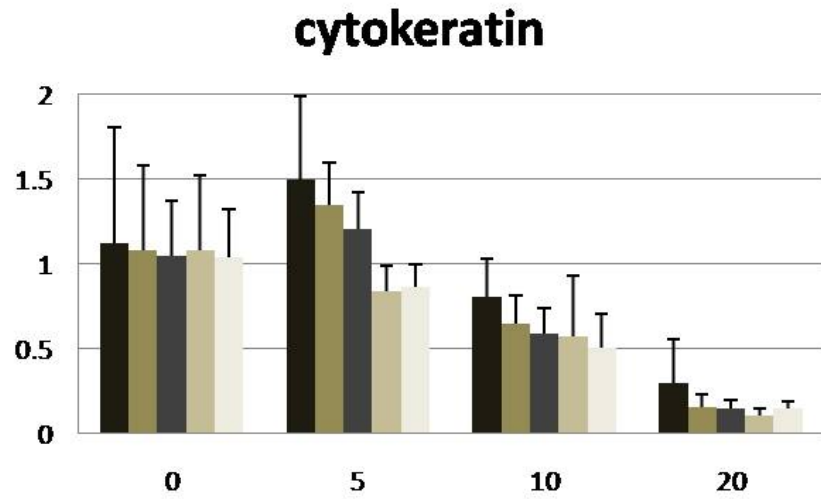
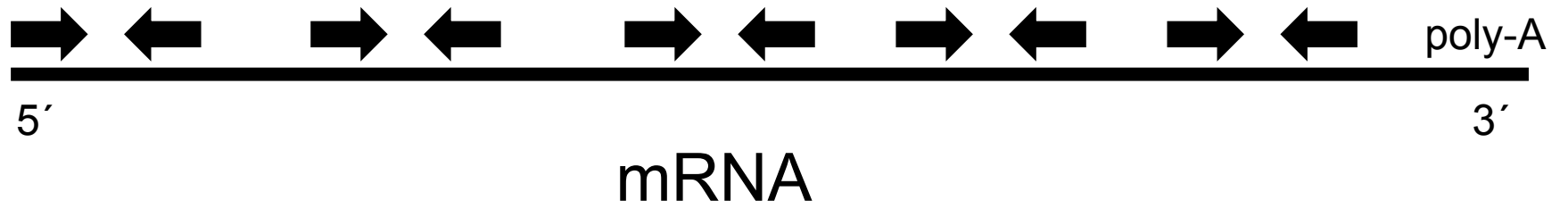


Degradace RNA v čase



Mechanism mRNA degradation





Děkuji za pozornost!

www.tataa.com

www.img.cas.cz/ge