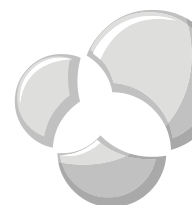


DIAGNOSTICKÝ KIT PRO DETEKCI MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ CHOROBY U KARCINOMU PANKREATU

Úvod

Jednou z nejvhodnějších metod pro detekci minimální reziduální choroby (Minimal Residual Disease - MRD) u pacientů se solidními tumory je metodika založená na principu real-time RT-PCR (reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase). Základní myšlenkou v detekci MRD výše uvedenou metodou je detekce exprese epiteliálních nádorových znaků v kompartmentech mesenchymálního původu. Jedná se o metodiku nepřímou, kdy na základě přítomnosti znaku, či jeho zvýšené exprese, lze prokázat přítomnost nádorových buněk v kompartmentech vzdálených primárnímu tumoru. Předmětem vyšetření je celková RNA vyizolovaná z buněk patientských vzorků (nativní nebo fixované tkáně, buňky kostní dřeně, krve, tělní tekutiny obsahující buněčný materiál). Tato celková RNA je v následujícím kroku přepsána reverzní transkriptázou do komplementární DNA (cDNA). Poté následuje vlastní real-time PCR, jejímž principem je stanovení množství kopií vyšetřovaného genu ve vzorku na základě standardizační křivky za použití specifických hydrolyzačních TaqMan sond.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time PCR) je enzymatická reakce, která je umožněna primery, specifickou fluorescenčně značenou sondou a termostabilní DNA-polymerázou, kdy průběh reakce je snímán termocyklérem v reálném čase na základě změn fluorescence. Po přidání standardů k reakci a vytvoření standardizační křivky lze hodnotit množství specifické vyšetřované sekvence ve vzorku. Ke každé polymeráze je dodáván reakční pufr o vhodném složení. Optimální koncentrace hořčičných iontů by měla být stanovena pro každý nový primerový pár, novou polymerázu a nový termocyklér. Výhodné je použití DNA-polymerázy s tzv. „HotStartem“, pro jejíž aktivaci je nutné 10 až 15 minutové zahřívání na 90-95°C. Primery jsou krátké oligonukleotidy (o délce cca 20bp), které vymezují amplifikovaný úsek DNA, specifická hydrolyzační TaqMan sonda je krátký oligonukleotid značený fluorescenční barvou a zhasěčem. Teplota nasedání primerů je orientačně vypočítána z nukleotidového složení a měla by být následně experimentálně ověřena při optimalizaci amplifikačního cyklu.



Kit obsahuje:

- CEA sense 0,015mM a CEA antisense 0,015mM – specifické primery
- CEA probe 1,25µM - TaqMan sonda
- CEA standard (10⁷ kopií CEA v 1µl)
- CEA positive control – vzorek cDNA s pozitivní expresí CEA
- EGFR sense 0,005mM a EGFR antisense 0,005mM – specifické primery
- EGFR probe 1,25µM - TaqMan sonda
- EGFR standard (10⁷ kopií EGFR v 1µl)
- EGFR positive control – vzorek cDNA s pozitivní expresí EGFR
- hTERT sense 0,005mM a hTERT antisense 0,005mM – specifické primery
- hTERT probe 1,25µM - TaqMan sonda
- hTERT standard (10⁷ kopií hTERT v 1µl)
- hTERT positive control – vzorek cDNA s pozitivní expresí hTERT
- dNTP 10mM mix (směs dTTP, dATP, dCTP, dGTP v poměru 1:1:1:1)
- Water DEPC-treated H₂O

Další potřebné chemikálie a vybavení:

- Hotstart DNA polymeráza s 5'- 3' exonukleázovou aktivitou
- Vortex
- Minicentrifuga
- Real-time PCR thermocycler
- PCR pracovní box
- PCR zkumavky
- 2,0 ml zkumavky
- špičky



Postup:

Chemikálie uchováváme při -18°C až -30°C . Před začátkem práce rozmrazíme na ledové tříšti CEA sense 0,015mM, CEA antisense 0,015mM, CEA probe 1,25 μM , EGFR sense 0,005mM, EGFR antisense 0,005mM, EGFR probe 1,25 μM , hTERT sense 0,005mM, hTERT antisense 0,005mM, hTERT probe 1,25 μM , dNTP 10mM mix, Water. Připravíme vhodnou HotStart Taq polymerázu s patřičným pufrem a MgCl_2 . Po rozpuštění vše krátce zvortexujeme a stočíme. HotStart Taq polymeráza se přidává přímo z mrazáku (pouze krátce stočit). Zapneme real-time termocyklér.

1. Příprava standardů: Součástí kitu je CEA standard obsahující 10^7 kopií CEA/ μl . Provedeme 10-násobné ředění až k 10^1 kopií CEA/ μl . Obdobně připravíme standardy EGFR a hTERT. Provedeme 10-násobné ředění z EGFR standardu obsahujícího 10^7 kopií EGFR/ μl až k 10^1 kopií EGFR/ μl a 10-násobné ředění z hTERT standardu obsahujícího 10^7 kopií hTERT/ μl až k 10^1 kopií hTERT/ μl .
2. Připravíme si PCR zkumavky do vhodné vychlazené destičky.
3. PCR provádíme ze 100ng cDNA, resp. celkové RNA v reakčním objemu 25 μl .
4. Připravíme si MasterMix pro kvantifikaci CEA. Do 2ml zkumavky napipetujeme 0,5 μl dNTP 10mM mix, 0,5 μl CEA sense 0,015mM, 1 μl CEA antisense 0,015mM, 4 μl CEA probe 1,25 μM , dále reakční pufř, hořčičnaté ionty a DNA polymerázu dle pokynů výrobce a Water do celkového objemu 25 μl H₂O na reakci (viz. tabulka 1). Uvedené množství je pro jeden vzorek. Krátce zvortexujeme a stočíme.
5. Do připravených PCR zkumavek rozaliquetujeme 24 μl MasterMixu, rozpipetujeme 1 μl cDNA vzorků, 1 μl vody jako negativní kontrolu, 1 μl CEA positive control a 1 μl specifických naředěných standardů (10^1 - 10^7 kopií CEA/ μl).
6. PCR zkumavky vložíme do real-time termocykléru a spustíme příslušný program.
 1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96° C / 15 minut
 2. krok: amplifikace - dvoukroková
95° C / 15 vteřin - 65° C / 15 vteřin
snímání v kanálu JOE při 65° C
7. Připravíme si MasterMix pro kvantifikaci EGFR. Do 2ml zkumavky napipetujeme 0,5 μl dNTP 10mM mix, 2 μl EGFR sense 0,005mM, 2 μl EGFR antisense 0,005mM,



- 4 μ l EGFR probe 1,25 μ M ,dále reakční pufr, hořčnaté ionty a DNA polymerázu dle pokynů výrobce a Water do celkového objemu 25 μ l H₂O na reakci (viz. tabulka 2). Uvedené množství je pro jeden vzorek. Krátce zvortexujeme a stočíme.
8. Do připravených PCR zkumavek rozaliquetujeme 24 μ l MasterMixu, rozpipetujeme 1 μ l cDNA vzorků, 1 μ l vody jako negativní kontrolu, 1 μ l EGFR positive control a 1 μ l specifických naředěných standardů (10¹-10⁷ kopií EGFR/ μ l).
9. PCR zkumavky vložíme do real-time termocykléru a spustíme příslušný program.
- 1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96° C / 15 minut
 - 2. krok: amplifikace - dvoukroková
95° C / 15 vteřin - 62° C / 15 vteřin
snímání v kanálu JOE při 62° C
10. Připravíme si MasterMix pro kvantifikaci hTERT. Do 2ml zkumavky napipetujeme 0,5 μ l dNTP 10mM mix, 2 μ l hTERT sense 0,005mM, 2 μ l hTERT antisense 0,005mM, 4 μ l hTERT probe 1,25 μ M ,dále reakční pufr, hořčnaté ionty a DNA polymerázu dle pokynů výrobce a Water do celkového objemu 25 μ l H₂O na reakci (viz. tabulka 3). Uvedené množství je pro jeden vzorek. Krátce zvortexujeme a stočíme.
11. Do připravených PCR zkumavek rozaliquetujeme 24 μ l MasterMixu, rozpipetujeme 1 μ l cDNA vzorků, 1 μ l vody jako negativní kontrolu, 1 μ l hTERT positive control a 1 μ l specifických naředěných standardů (10¹-10⁷ kopií hTERT/ μ l).
12. PCR zkumavky vložíme do real-time termocykléru a spustíme příslušný program.
- 1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA
96° C / 15 minut
 - 2. krok: amplifikace - dvoukroková
95° C / 15 vteřin - 60° C / 15 vteřin
snímání v kanálu JOE při 60° C
13. Po proběhnutí provedeme sestavení standardizačních křivek a analýzu PCR reakcí.



Tabulka 1.

Reakční objem: 25µl	Objem	Koncentrace	Konc. na reakci	Finální koncentrace
CEA sense 0,015mM	0,5 µl	0,015 mM	7,5 pmol	300 nM
CEA antisense 0,015mM	1 µl	0,015 mM	15 pmol	600 nM
CEA probe 1,25µM	4 µl	1,25 µM	5 pmol	200 nM
dNTP 10mM mix	0,5 µl	10 mM	5 nmol	200 µM
DNA polymeráza	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Mg²⁺	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Pufrr	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
cDNA	1 µl	0,1µg cDNA/µl	100 ng	4 ng/µl
H₂O	Do 25µl	/	/	/

Tabulka 2.

Reakční objem: 25µl	Objem	Koncentrace	Konc. na reakci	Finální koncentrace
EGFR sense 0,005mM	2 µl	0,005 mM	10 pmol	400 nM
EGFR antisense 0,005mM	2 µl	0,005 mM	10 pmol	400 nM
EGFR probe 1,25µM	4 µl	1,25 µM	5 pmol	200 nM
dNTP 10mM mix	0,5 µl	10 mM	5 nmol	200 µM
DNA polymeráza	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Mg²⁺	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Pufrr	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
cDNA	1 µl	0,1µg cDNA/µl	100 ng	4 ng/µl
H₂O	Do 25µl	/	/	/

Tabulka 3.

Reakční objem: 25µl	Objem	Koncentrace	Konc. na reakci	Finální koncentrace
hTERT sense 0,005mM	2 µl	0,005 mM	10 pmol	400 nM
hTERT antisense 0,005mM	2 µl	0,005 mM	10 pmol	400 nM
hTERT probe 1,25µM	4 µl	1,25 µM	5 pmol	200 nM
dNTP 10mM mix	0,5 µl	10 mM	5 nmol	200 µM
DNA polymeráza	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Mg²⁺	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Pufrr	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
cDNA	1 µl	0,1µg cDNA/µl	100 ng	4 ng/µl
H₂O	Do 25µl	/	/	/



Možné problémy a jejich řešení:

Problém	Pravděpodobně způsobeno	Možné řešení
Všechny fluorescenční křivky vodorovné	Špatně připravený MasterMix	Připravíme nový MasterMix
Fluorescenční křivka vzorku není exponenciální	Inhibice PCR reakce	Připravíme nový MasterMix Provedeme znovu rev. transkripci Vyžádáme si nový vzorek RNA
	Degradace primerů	Naředění nových primerů Objednání nové syntézy primerů
Fluorescenční křivka v negativní kontrole	Kontaminace PCR	Výměna všech komponent, vyčištění pipet, dekontaminace pracovního místa a opakování celého postupu PCR

Hodnocení výsledků:

Automatický výstup z přístroje. Při hodnocení se řídíme těmito pravidly:

- Sestavení standardizační křivky s hodnotou efektivity nad 0,85 a korelačním koeficientem nad 0,9.
- Automatické vynesení a záznam vzorků do standardizační křivky.
- Normalizace dat na vstupní množství RNA.
- Přítomnost minimální reziduální choroby je prokázána při expresi CEA nad 200 kopií CEA/ μ g RNA v systémové krvi, při expresi CEA nad 350 kopií CEA/ μ g RNA v kostní dřeni, při expresi EGFR nad 250 kopií EGFR/ μ g RNA v systémové krvi, při expresi EGFR nad 30 000 kopií EGFR/ μ g RNA v kostní dřeni, při expresi hTERT nad 2500 kopií hTERT/ μ g RNA v systémové krvi a při expresi hTERT nad 20 000 kopií hTERT/ μ g RNA v kostní dřeni.

