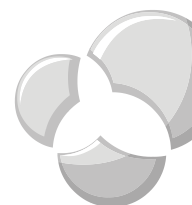


# DIAGNOSTICKÝ KIT PRO DETEKCI MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ CHOROBY U KARCINOMU PRSU

## 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 1,25 $\mu$ M - TaqMan sonda
- CEA standard (10<sup>7</sup> kopií CEA v 1 $\mu$ l)
- CEA positive control – vzorek cDNA s pozitivní expresí CEA
- MGB1 sense 0,01mM a MGB1 antisense 0,01mM – specifické primery
- MGB1 probe 1,25 $\mu$ M - TaqMan sonda
- MGB1 standard (10<sup>7</sup> kopií MGB1 v 1 $\mu$ l)
- MGB1 positive control – vzorek cDNA s pozitivní expresí MGB1
- dNTP 10mM mix (směs dTTP, dATP, dCTP, dGTP v poměru 1:1:1:1)
- Water DEPC-treated H<sub>2</sub>O

## 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  $-18^{\circ}\text{C}$  až  $-30^{\circ}\text{C}$ . Před začátkem práce rozmrazíme na ledové tříšti CEA sense 0,015mM, CEA antisense 0,015mM, CEA probe 1,25 $\mu\text{M}$ , MGB1 sense 0,01mM, MGB1 antisense 0,01mM, MGB1 probe 1,25 $\mu\text{M}$ , dNTP 10mM mix, Water. Připravíme vhodnou HotStart Taq polymerázu s patřičným pufrem a  $\text{MgCl}_2$ . 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/ $\mu\text{l}$ . Provedeme 10-násobné ředění až k  $10^1$  kopií CEA/ $\mu\text{l}$ . Obdobně připravíme standardy MGB1. Provedeme 10-násobné ředění z MGB1 standardu obsahujícího  $10^7$  kopií MGB1/ $\mu\text{l}$  až k  $10^1$  kopií MGB1/ $\mu\text{l}$ .
2. Připravíme si PCR zkumavky do vhodné vychlazené destičky.
3. PCR provádíme ze 100ng cDNA, resp. celkové RNA v reakčním objemu 25 $\mu\text{l}$ .
4. Připravíme si MasterMix pro kvantifikaci CEA. Do 2ml zkumavky napipetujeme 0,5 $\mu\text{l}$  dNTP 10mM mix, 0,5 $\mu\text{l}$  CEA sense 0,015mM, 1 $\mu\text{l}$  CEA antisense 0,015mM, 4 $\mu\text{l}$  CEA probe 1,25 $\mu\text{M}$  ,dále reakční pufr, hořčičnaté ionty a DNA polymerázu dle pokynů výrobce a Water do celkového objemu 25 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  na reakci (viz. tabulka 1). Uvedené množství je pro jeden vzorek. Krátce zvortexujeme a stočíme.
5. Do připravených PCR zkumavek rozalíkvotujeme 24 $\mu\text{l}$  MasterMixu, rozpipetujeme 1 $\mu\text{l}$  cDNA vzorků, 1 $\mu\text{l}$  vody jako negativní kontrolu, 1 $\mu\text{l}$  CEA positive control a 1 $\mu\text{l}$  specifických naředěných standardů ( $10^1$ - $10^7$  kopií CEA/ $\mu\text{l}$ ).
6. PCR zkumavky vložíme do real-time termocykléru a spustíme příslušný program.
  1. krok: aktivace polymerázy a denaturace cDNA  
 $96^{\circ}\text{C}$  / 15 minut
  2. krok: amplifikace - dvoukroková  
 $95^{\circ}\text{C}$  / 15 vteřin -  $65^{\circ}\text{C}$  / 15 vteřin  
snímání v kanálu JOE při  $65^{\circ}\text{C}$
7. Připravíme si MasterMix pro kvantifikaci MGB1. Do 2ml zkumavky napipetujeme 0,5 $\mu\text{l}$  dNTP 10mM mix, 2 $\mu\text{l}$  MGB1 sense 0,01mM, 1 $\mu\text{l}$  MGB1 antisense 0,01mM, 4 $\mu\text{l}$  MGB1 probe 1,25 $\mu\text{M}$  ,dále reakční pufr, hořčičnaté ionty a DNA polymerázu dle



pokynů výrobce a Water do celkového objemu 25 $\mu$ l H<sub>2</sub>O na reakci (viz. tabulka 2).  
 Uvedené množství je pro jeden vzorek. Krátce zvortexujeme a stočíme.

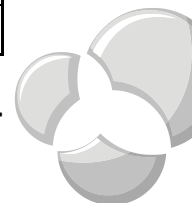
8. Do připravených PCR zkumavek rozalíkvotujeme 24 $\mu$ l MasterMixu, rozpipetujeme 1 $\mu$ l cDNA vzorků, 1 $\mu$ l vody jako negativní kontrolu, 1 $\mu$ l MGB1 positive control a 1 $\mu$ l specifických naředěných standardů (10<sup>1</sup>-10<sup>7</sup> kopií MGB1/ $\mu$ l).
9. PCR zkumavky vložíme 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 - 63° C / 20 vteřin  
snímání v kanálu JOE při 63° C
10. Po proběhnutí provedeme sestavení standardizačních křivek a analýzu PCR reakcí.

Tabulka 1.

Reakční objem: 25 $\mu$ l	Objem	Koncentrace	Konc. na reakci	Finální koncentrace
CEA sense 0,015mM	0,5 $\mu$ l	0,015 mM	7,5 pmol	300 nM
CEA antisense 0,015mM	1 $\mu$ l	0,015 mM	15 pmol	600 nM
CEA probe 1,25 $\mu$ M	4 $\mu$ l	1,25 $\mu$ M	5 pmol	200 nM
dNTP 10mM mix	0,5 $\mu$ l	10 mM	5 nmol	200 $\mu$ M
DNA polymeráza	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Mg <sup>2+</sup>	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Pufr	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
cDNA	1 $\mu$ l	0,1 $\mu$ g cDNA/ $\mu$ l	100 ng	4 ng/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Do 25 $\mu$ l	/	/	/

Tabulka 2.

Reakční objem: 25 $\mu$ l	Objem	Koncentrace	Konc. na reakci	Finální koncentrace
MGB1 sense 0,01mM	2 $\mu$ l	0,01 mM	20 pmol	800 nM
MGB1 antisense 0,01mM	1 $\mu$ l	0,01 mM	10 pmol	400 nM
MGB1 probe 1,25 $\mu$ M	4 $\mu$ l	1,25 $\mu$ M	5 pmol	200 nM
dNTP 10mM mix	0,5 $\mu$ l	10 mM	5 nmol	200 $\mu$ M
DNA polymeráza	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Mg <sup>2+</sup>	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
Pufr	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce	Dle výrobce
cDNA	1 $\mu$ l	0,1 $\mu$ g cDNA/ $\mu$ l	100 ng	4 ng/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Do 25 $\mu$ l	/	/	/



## Možné problémy a jejich řešení:

<b>Problém</b>	<b>Pravděpodobně způsobeno</b>	<b>Možné řešení</b>
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/ $\mu$ g RNA v systémové krvi, při expresi CEA nad 350 kopií CEA/ $\mu$ g RNA v kostní dřeni a při expresi CEA nad 250 kopií CEA/ $\mu$ g RNA v lymfatické uzlině. Při MRD je dále prokázána při expresi MGB1 nad 200 kopií MGB1/ $\mu$ g RNA v systémové krvi, při expresi MGB1 nad 250 kopií MGB1/ $\mu$ g RNA v kostní dřeni a při expresi MGB1 nad 10 kopií MGB1/ $\mu$ g RNA v lymfatické uzlině.

