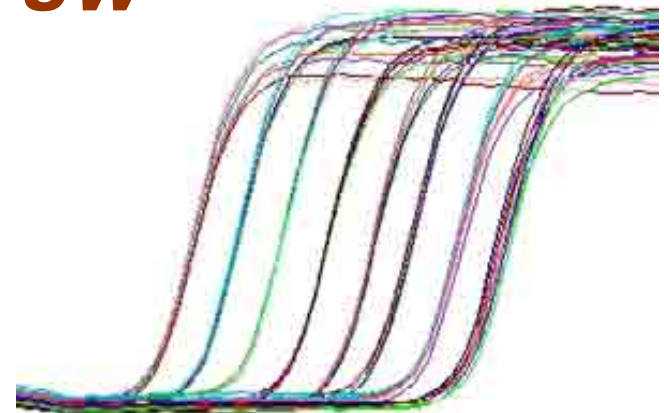


PCR w czasie rzeczywistym *(Real Time PCR)*

czyli

qPCR (PCR ilościowy) *(Quantitative PCR)*

Michał Koper, IGiB UW



Pionierskie prace o qPCR (zwanym także kinetycznym PCR)

- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992). **Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.** *Biotechnology* 10:413–7.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993). **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology* 11:1026 –30.



Zastosowania qPCR:

- **Badanie ekspresji genów (RT-qPCR)**
- **Wykrywanie kwasów nukleinowych patogenów:** wykrywanie obecności i określanie stężenia wirusów i bakterii w surowicy
- **Genotypowanie: analizy SNP lub HRM**
- **Wykrywanie GMO w paszach i żywności**



qPCR oparty jest o detekcję przyrostu ilości produktu PCR w czasie

- Metoda wyznacza stężenie DNA dla każdego cyklu reakcji, wykorzystująca **fluorescencję**
- **Barwniki fluorescencyjne** wiążące dsDNA lub sprzęgnięte z sondami hybrydującymi z wybraną nicią badanego amplikonu
- Wymaga **układu wzbudzającego**: lampa halogenowa, układ LED lub laser
- Wymaga **układu detekcji**: oddzielne elementy CCD, matryca CCD lub układy fotonowielacza



Przykłady cyklorów qPCR



Roche LightCycler 480



QIAGEN Rotor-Gene Q



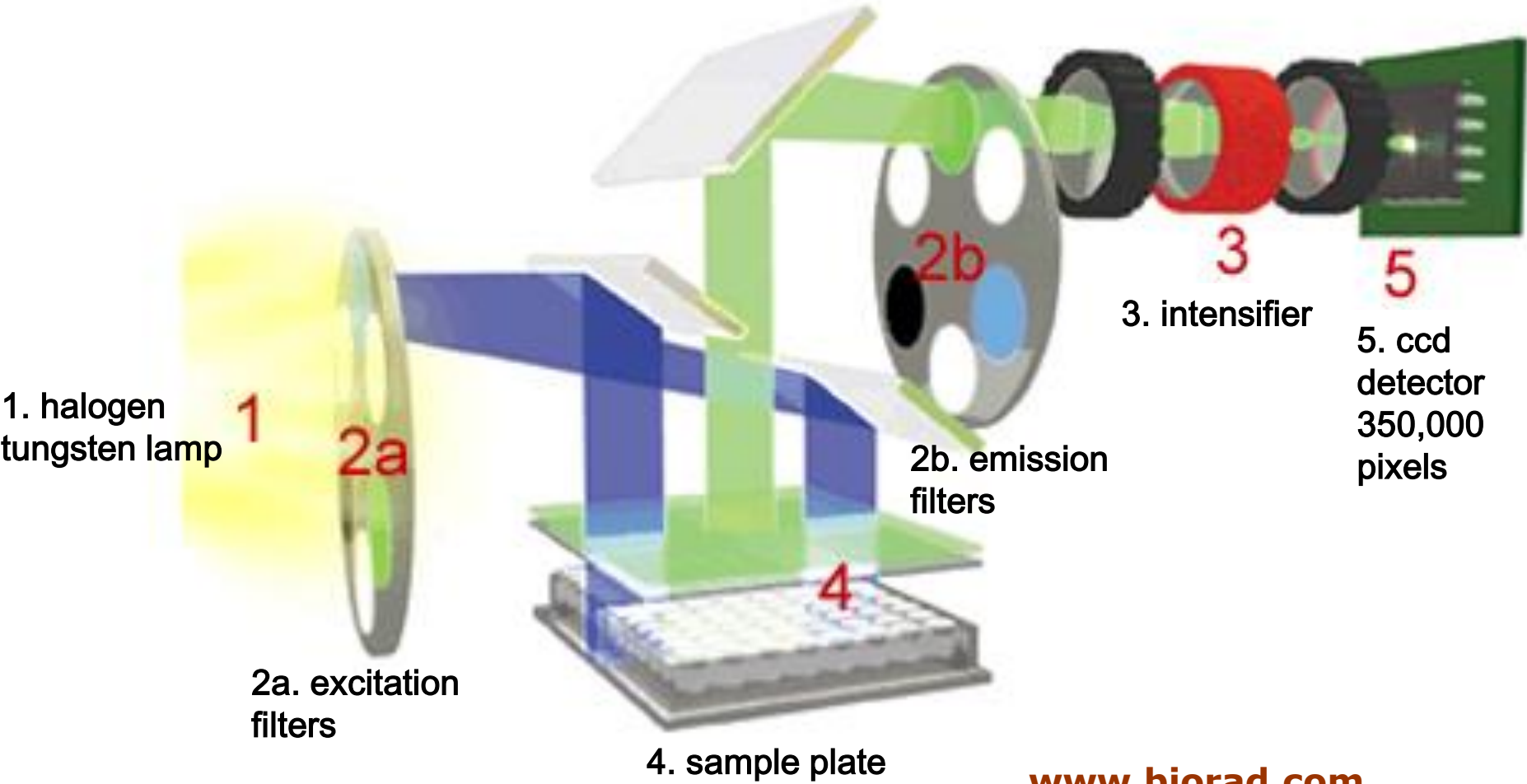
**BioRad
CFX96/
CFX384**



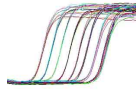
Appliedbiosystems 7900HT



Schemat aparatu qPCR



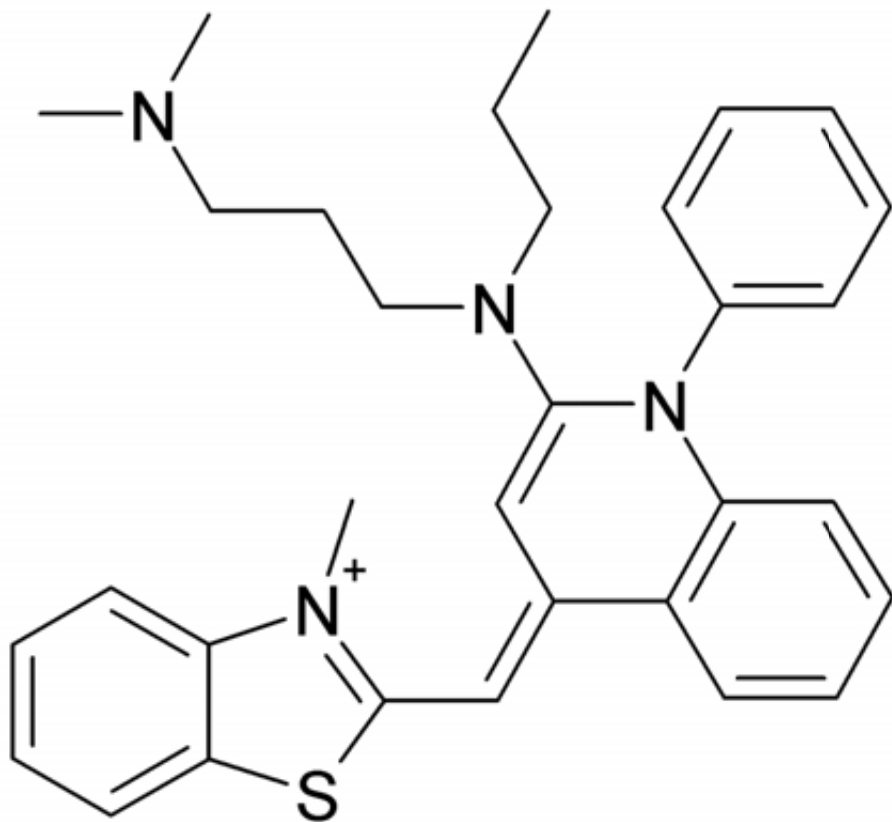
www.biorad.com



Sposoby detekcji produktów w qPCR



Barwniki wiążące DNA: SYBR Green

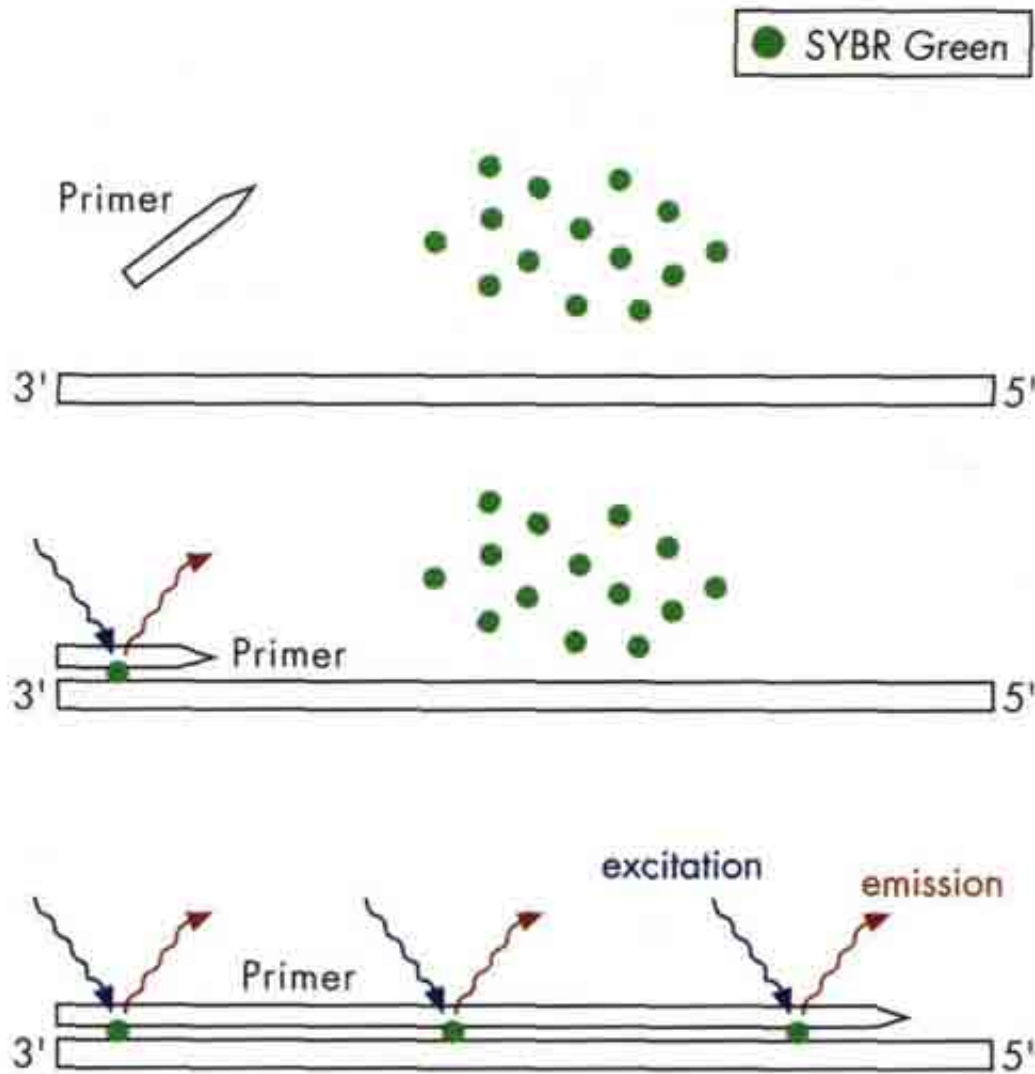


SYBR Green I, za: Wikipedia

- Należy do barwników **cyjaninowych** (zawierających pierścienie heterocykliczne z wiązaniami $-C=$)
- Wiąże **dsDNA**, słabo ssDNA
- Wzbudzany światłem niebieskim ($\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$)
- Emituje światło zielone ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$)



SYBR Green



- Wykrywa wszelkie dsDNA
- Wykrywanie na etapie **ELONGACJI**
- Startery nie mogą tworzyć **DIMERÓW**
- Wielkość produktu najlepiej w przedziale **100-200bp**
- Wielkość wykrywanych produktów dla różnych genów musi być **BARDZO ZBLIŻONA**
- Umożliwia analizę **KRZYWYCH TOPNIENIA**
- Metoda **NAJTAŃSZA**



Projektowanie starterów do qPCR

- Długość ampkikonu najlepiej mniej niż **150 bp**
- Unikać **komplementarności sekwencji** w obrębie startera lub pomiędzy starterami = „**primer dimer**”
- Unikać niesparowanych zasad
- Najlepiej **G lub C na 3' końcu**, nigdy T
- Długość starterów **18-30 nt**
- Zawartość GC **40-60%**
- **$T_m = (A+T) \times 2^\circ C + (G+C) \times 4^\circ C$**
- Stosować przynajmniej 2 programy i porównywać wyniki!!!

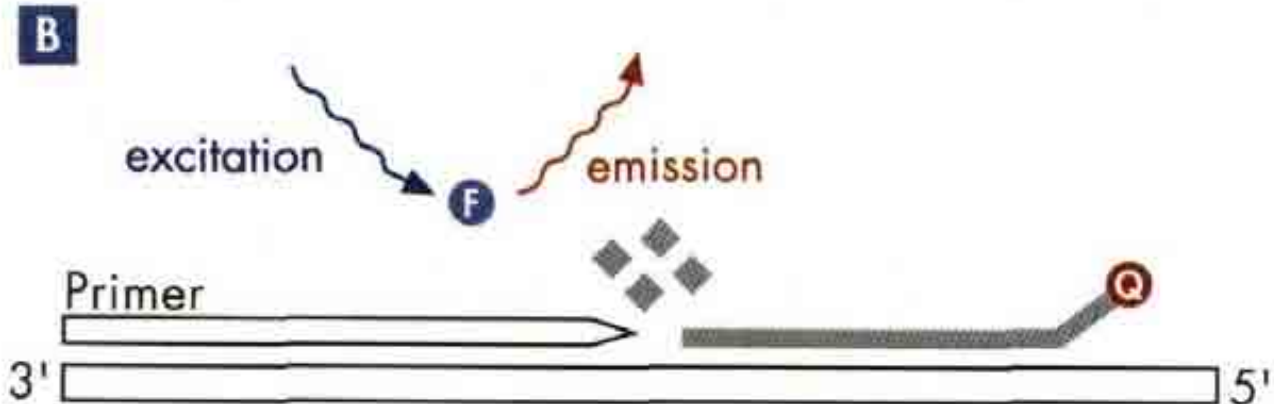
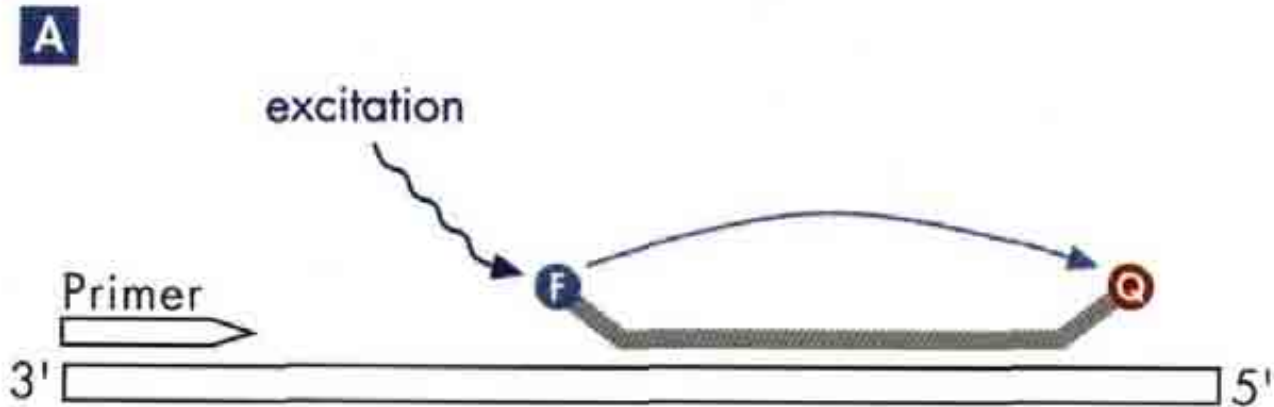
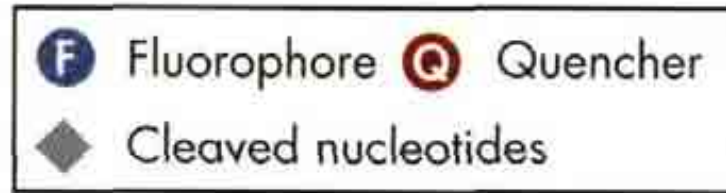


Sondy hybrydyzacyjne



Sondy TaqMan - hydrolizowane

DNA Pol Exo⁺!!!



ABI, Roche (UPL)

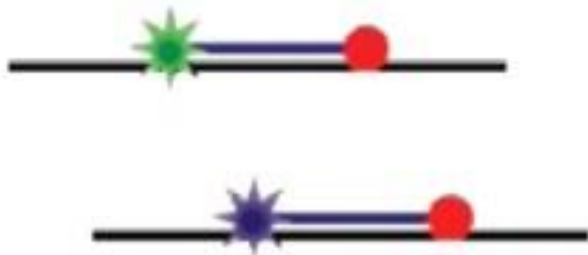
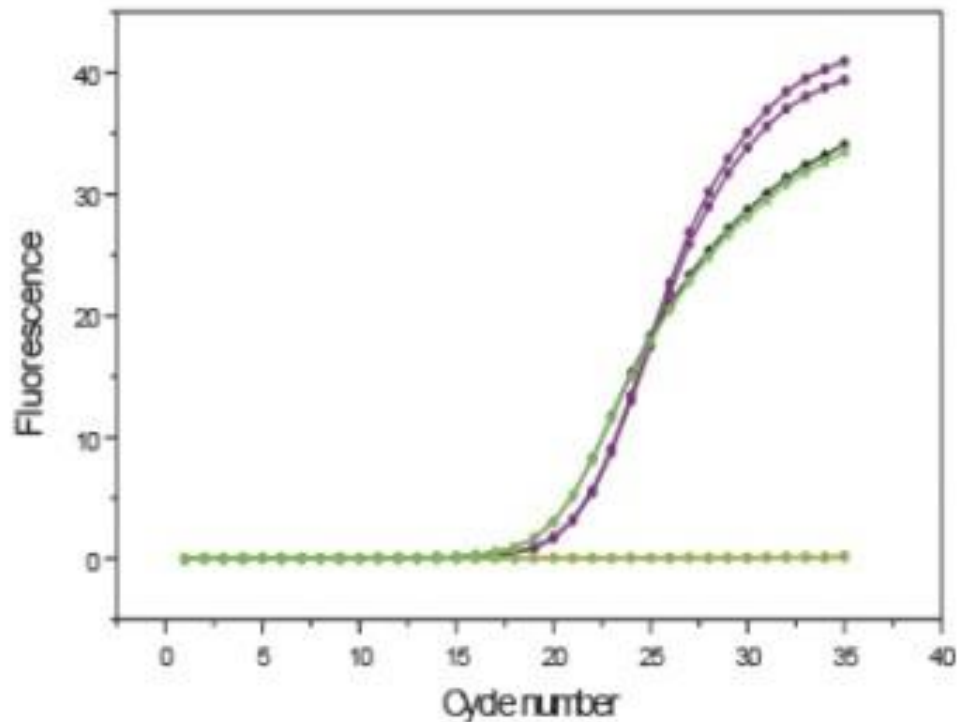
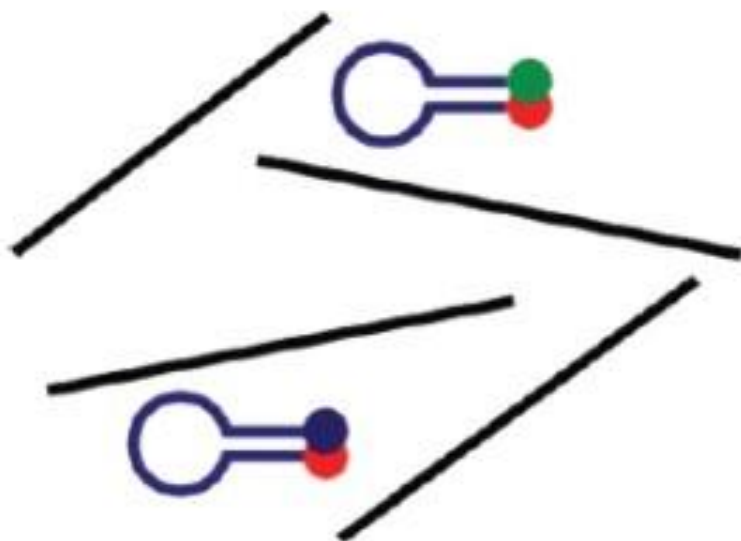


Zasady projektowania sond TaqMan

- Krótkie ampkikony: **70-150 bp**
- **T_m sondy = 68-70°C**
- Zawartość GC **30-60%**
- Nigdy **G na 5' końcu**, (naturalny wygaszacz)
- Długość sond **maks. 30 nt**
- Unikać ciągów identycznych zasad
- Unikać struktur II-rzędowych
- Unikać komplementarności ze starterami
- Wybierać nic z większą zawartością C



Złożony qPCR (ang. „multiplex”)



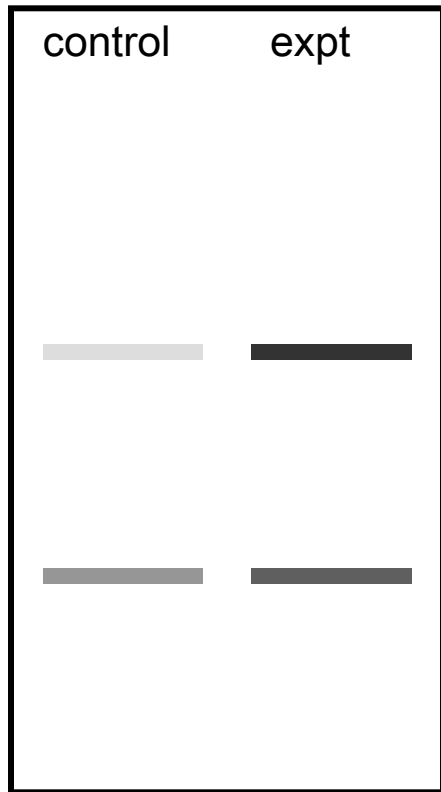
Różne formaty detekcji i różne barwniki pozwalają na **wykrywanie więcej jak 1 produktu w pojedynczej reakcji** (po za SYBR Green!!!)



Określanie ilości RNA



Klasyczna technika northern-blot



target gene

10X

internal control gene
actin, GAPDH, RPLP0 etc

2X

Corrected fold increase = $10/2 = 5$

Ratio target gene in experimental/control = $\frac{\text{fold change in target gene}}{\text{fold change in reference gene}}$

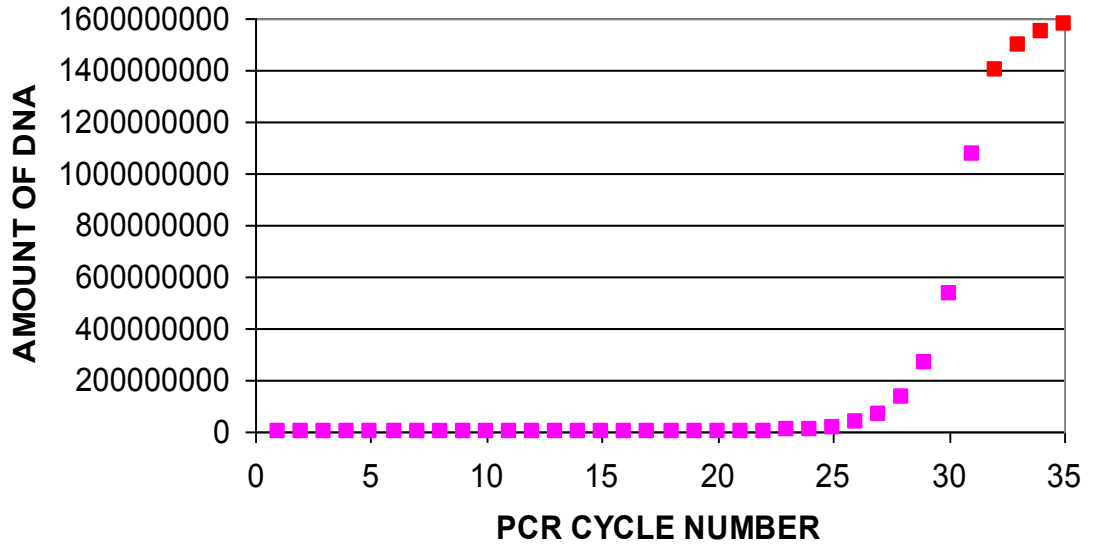


Teoretyczne podstawy qPCR

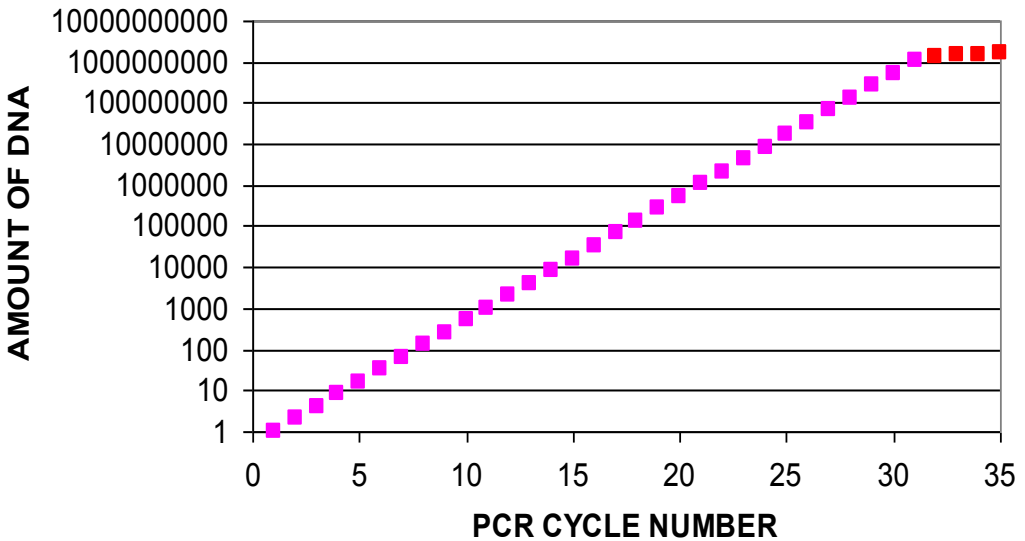


CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000

Krzywa teoretyczna



Przekształcona w skali logarytmicznej

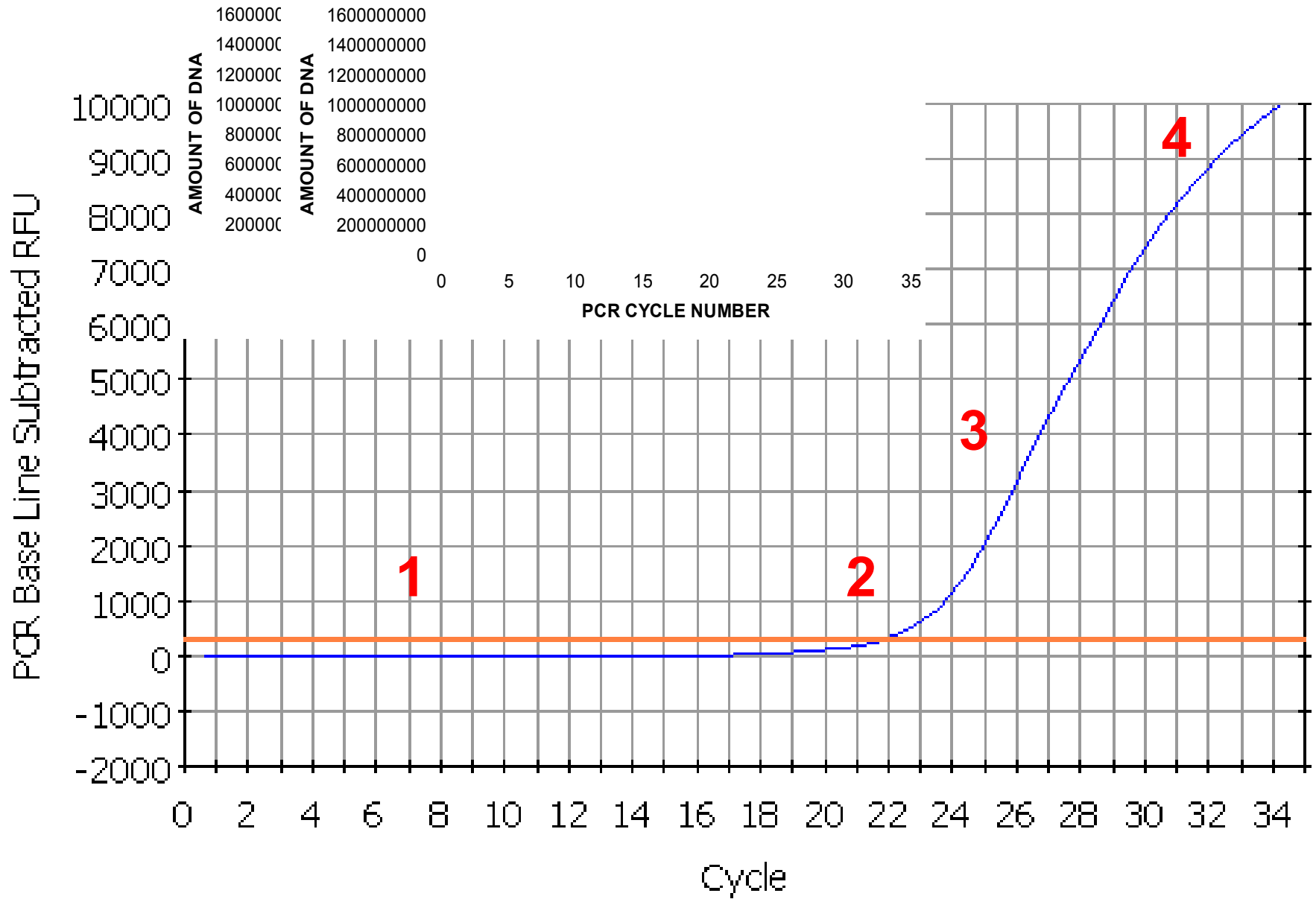


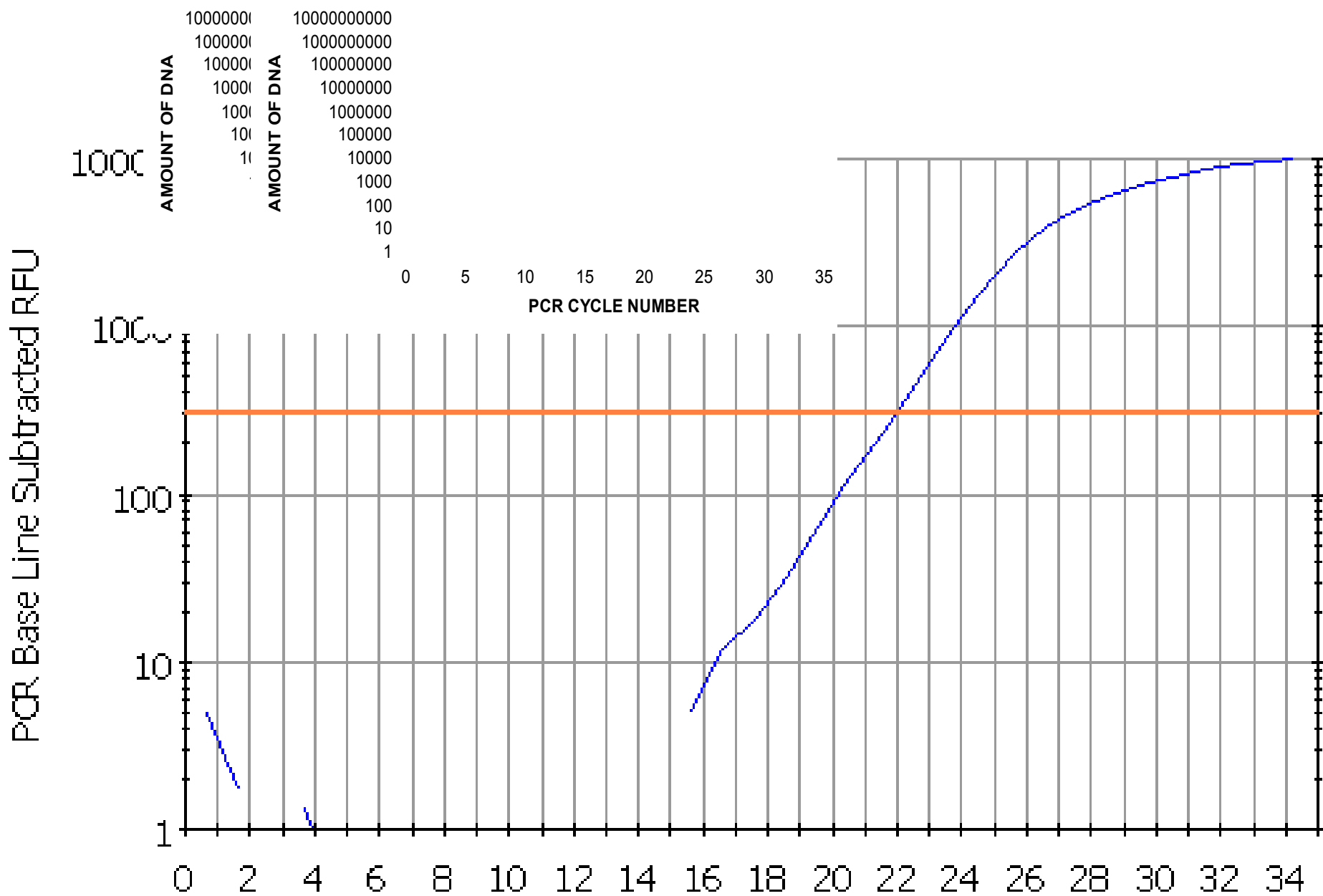
4 fazy reakcji qPCR

- **1 faza:** fluorescencja na poziomie tła, reakcja zachodzi wykładniczo ale nie możliwa detekcja
- **2 faza:** przyrost wykładniczy możliwy do wykrycia, fluorescencja powyżej tła
- **3 faza:** „stromy” przyrost fluorescencji pozwala wykryć, że reakcja zachodzi liniowo
- **4 faza plateau:** załamania i wysycenia reakcji

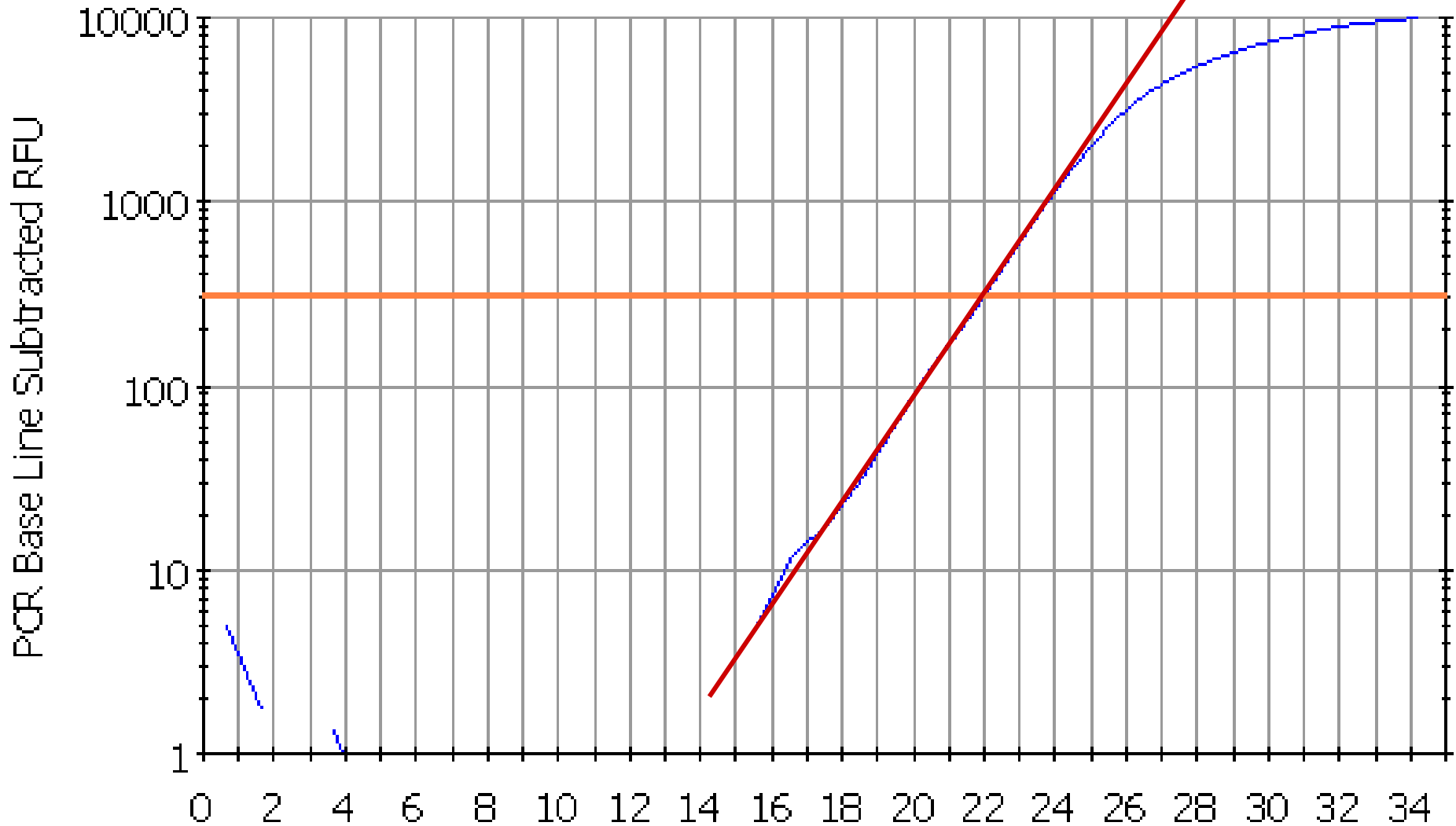
M. W. Pfaffl: *Quantification strategies in real-time PCR w A-Z of quantitative PCR* (Edytor: S.A. Bustin)



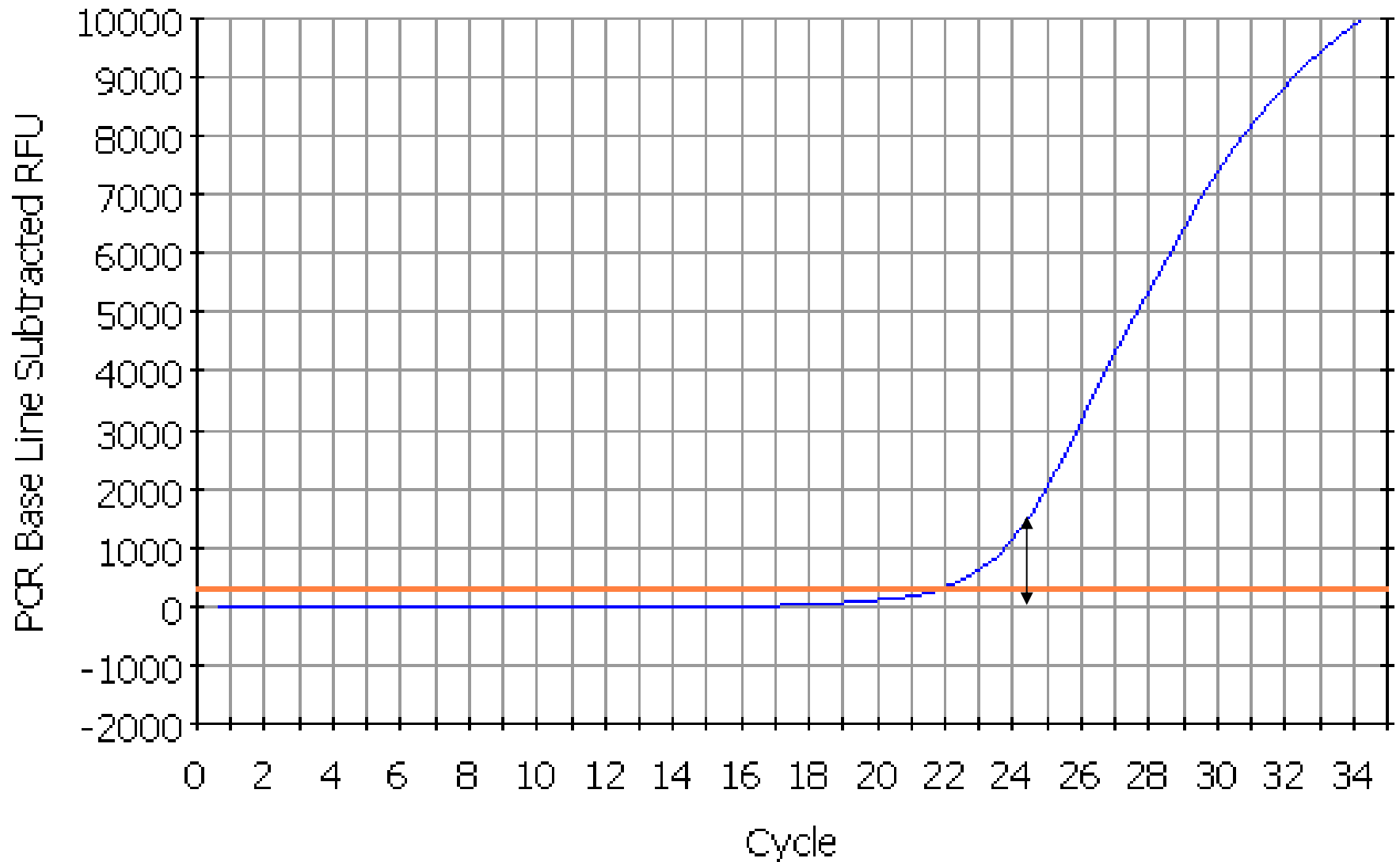


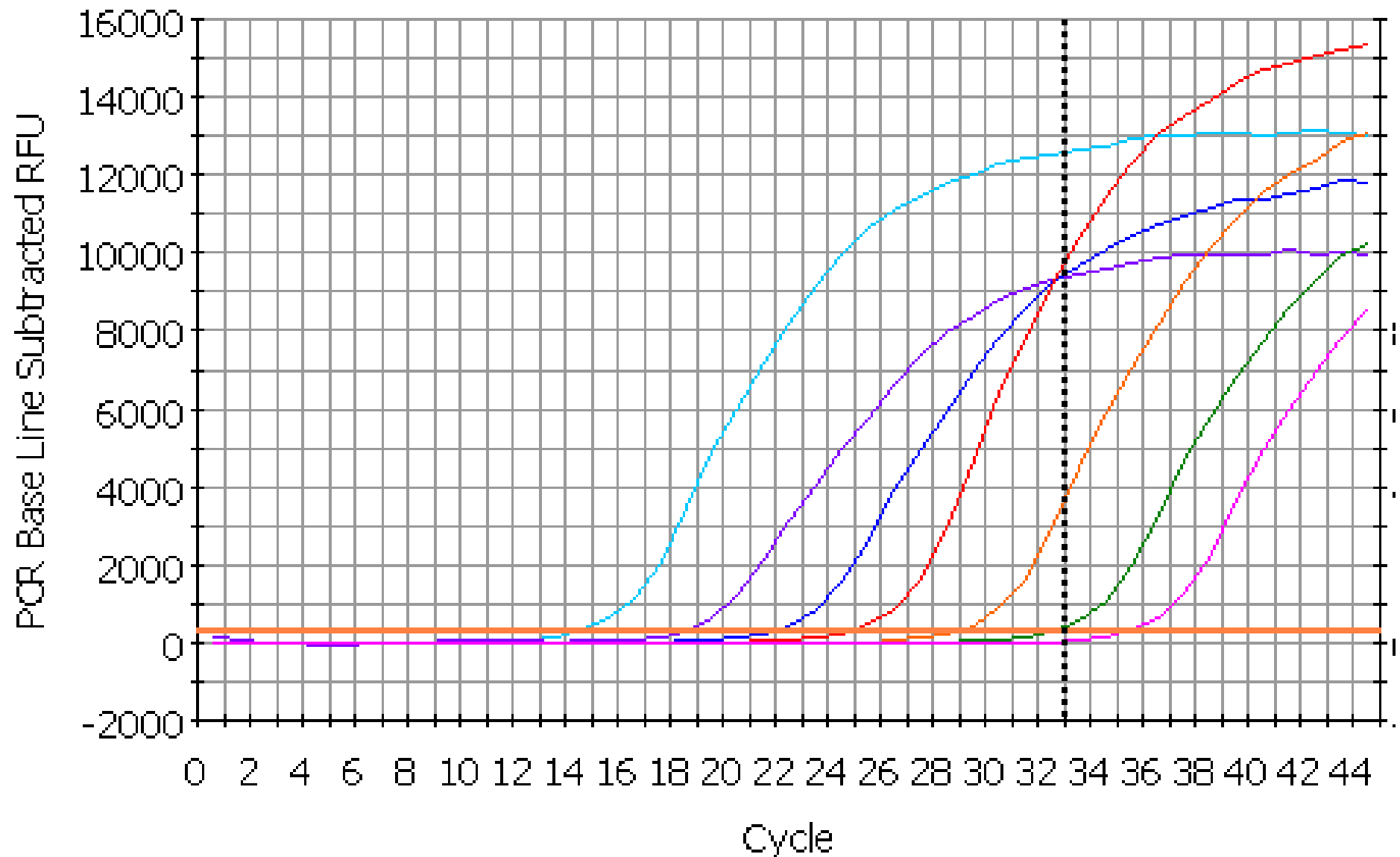


Reakcja liniowa w przedziale ~20 do ~1500

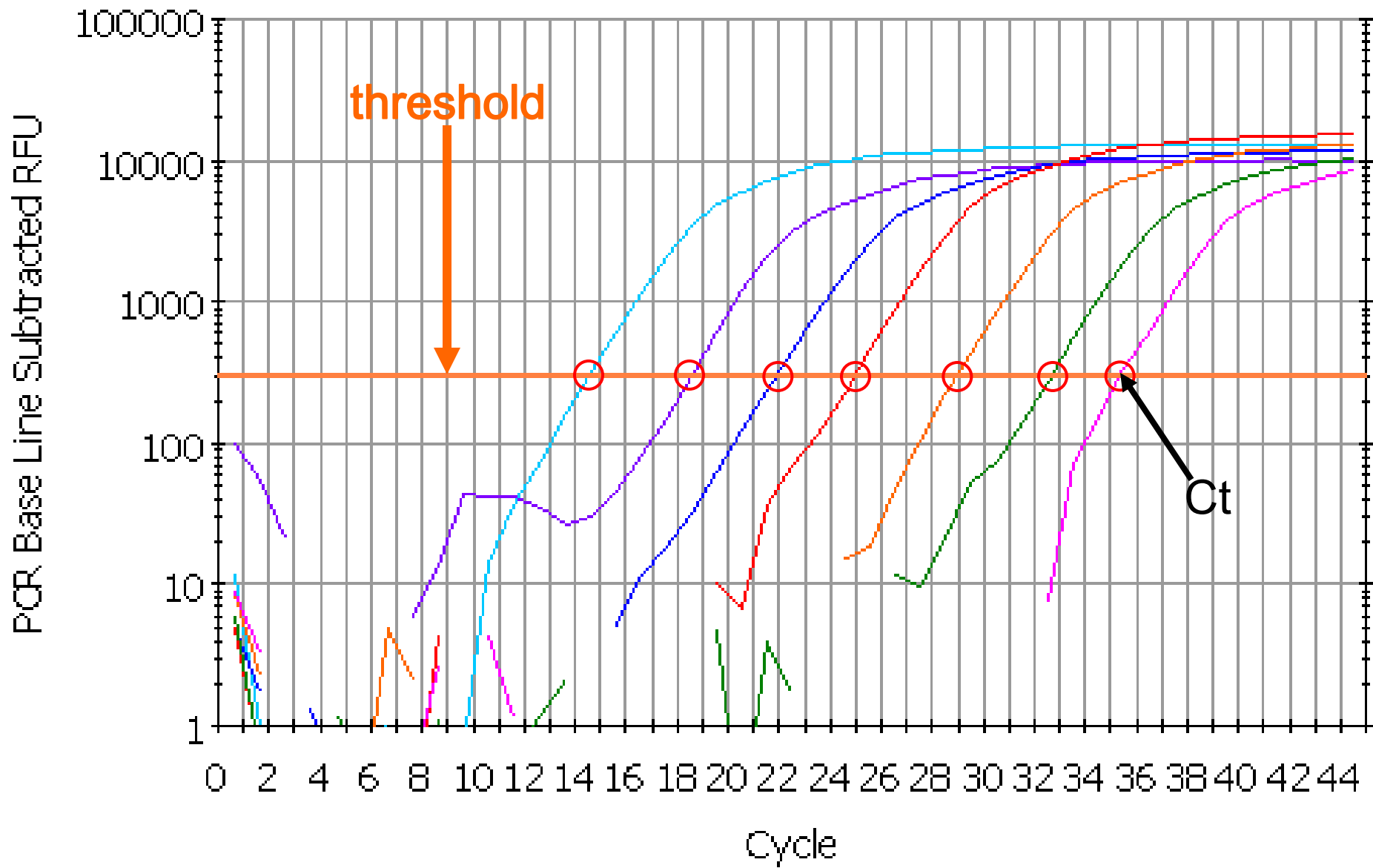


Reakcja liniowa w przedziale ~20 do ~1500

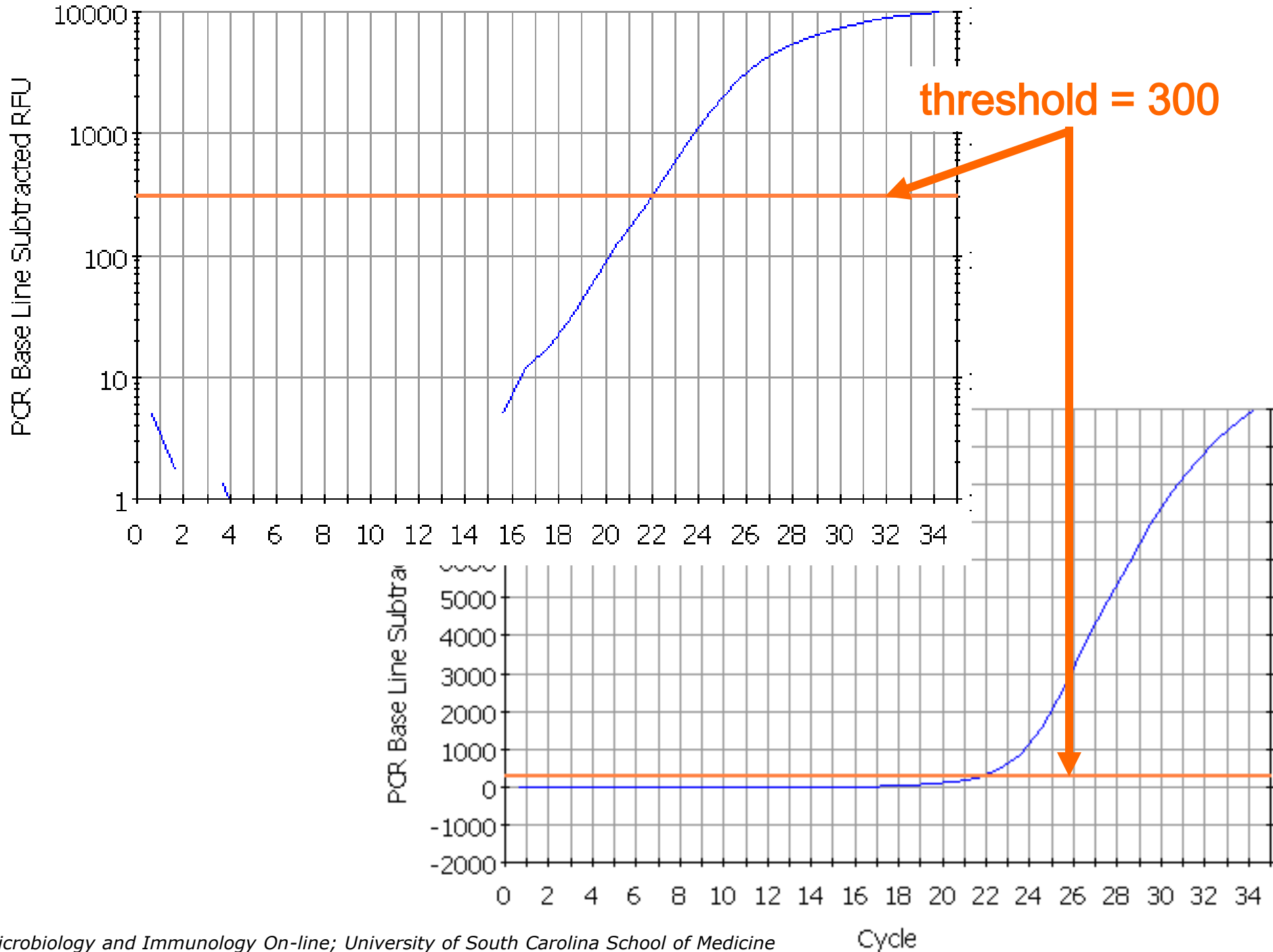


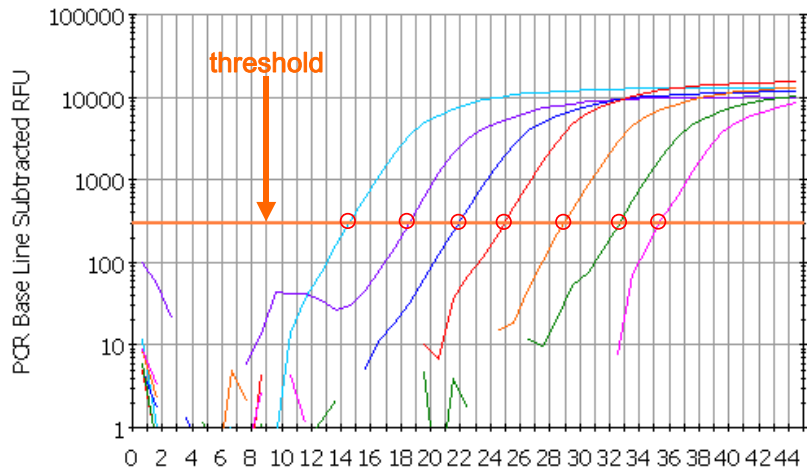


SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS



SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS





Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$

- Unknowns
- Standards



PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

Czułość i powtarzalność reakcji qPCR vs semi-qPCR

- Zakres dynamiczny: do **9** rzędów wielkości (10^9) w qPCR a w półilościowym-PCR najwyżej **2** (10^2)
- Wariancje **wewnątrz** eksperymentu qPCR- do kilku % a w semi-qPCR do 30-40%
- Wariancje **pomiędzy** eksperymentami qPCR- do kilkunastu % a w semi-qPCR do 50-70%
- Poziom detekcji w qPCR: ok. **10** cząsteczek przy powtarzalności **50%** i ok. **100** przy powtarzalności **100%**.



Różne algorytmy dla określenia **wartość** cyklu „przebiecia” (odcięcia; oznaczenia)

$$C_t = C_p = C_q$$

Threshold cycle –
odcięcia; progowy

Maksimum 2-giej
pochodnej (Roche)

Quantification cycle –
oznaczenia ilościowego



Dwie metody kwantyfikacji

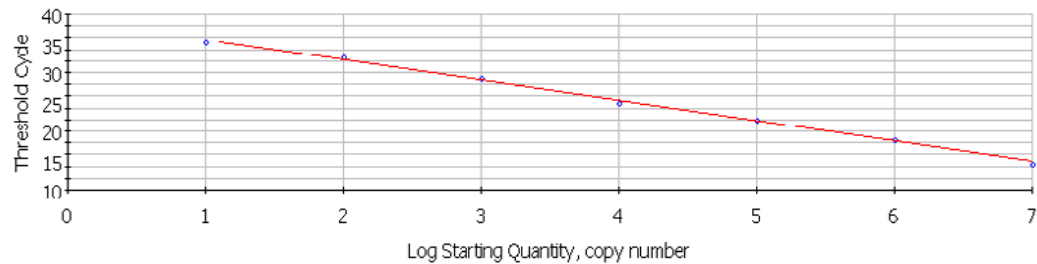
- **„ABSOLUT QUANTIFICATION”** czyli metoda krzywych standardowych
- **„RELATIVE QUANTIFICATION”**
- **Obie metody są w istocie proporcjonalne!**



Metoda krzywych standardowych

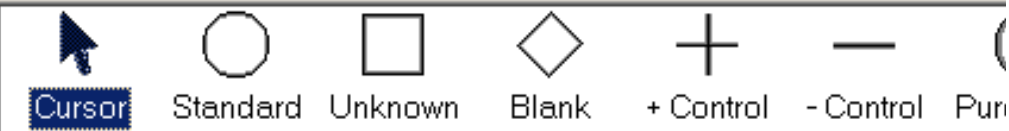
Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns
● Standards



PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd





	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A									
B		1	2	3	4	5	6	7	—
C		C	C	C		E	E	E	
D									
E		8	9	10	11	12	13	14	—
F		C	C	C		E	E	E	
G									

← dilutions target DNA

← triplicates cDNA

← dilutions reference DNA

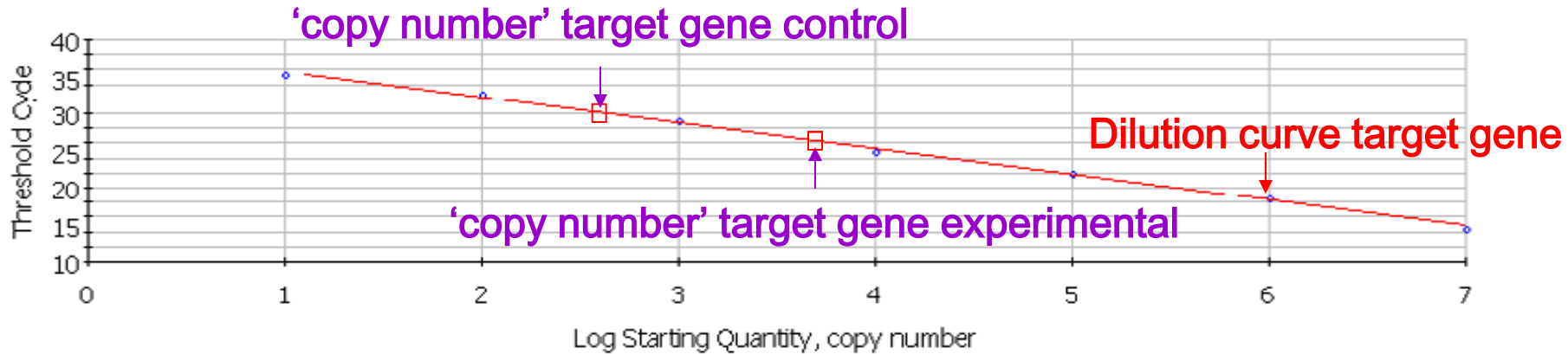
← triplicates cDNA

} target primers

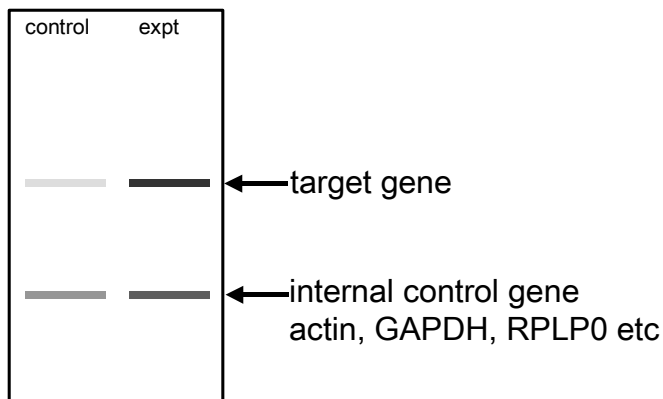
} reference primers

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$

□ Unknowns
 ○ Standards



NORTHERN

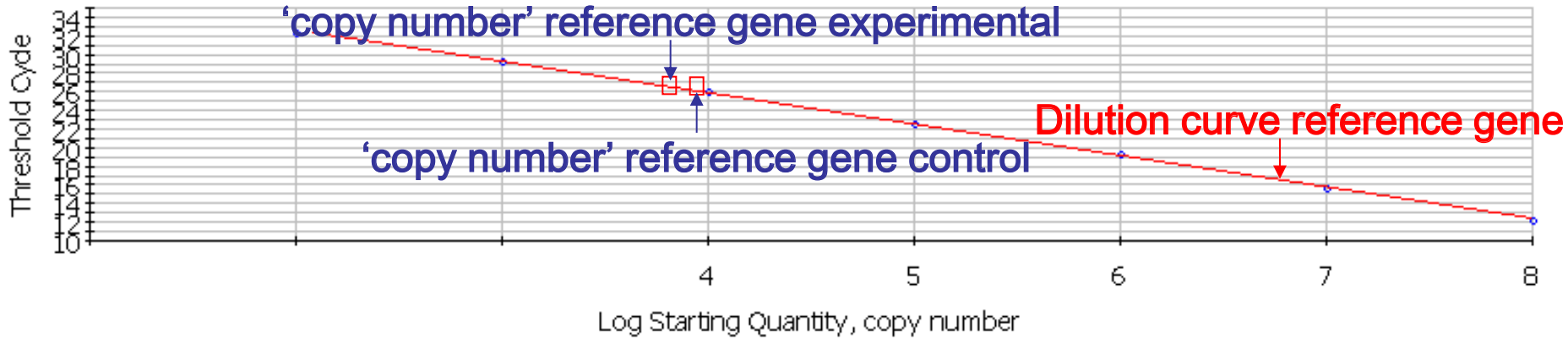


fold change in target gene =
 $\frac{\text{copy number experimental}}{\text{copy number control}}$

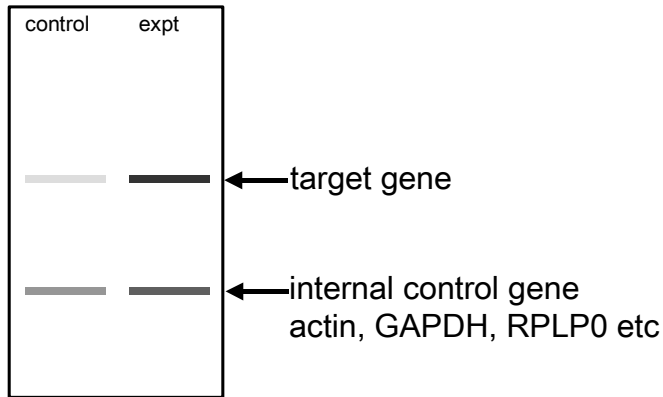
Ratio experimental/control = $\frac{\text{fold change in target gene}}{\text{fold change in reference gene}}$

Correlation Coefficient: 1.000 Slope: -3.360 Intercept: 39.319 $Y = -3.360 X + 39.319$

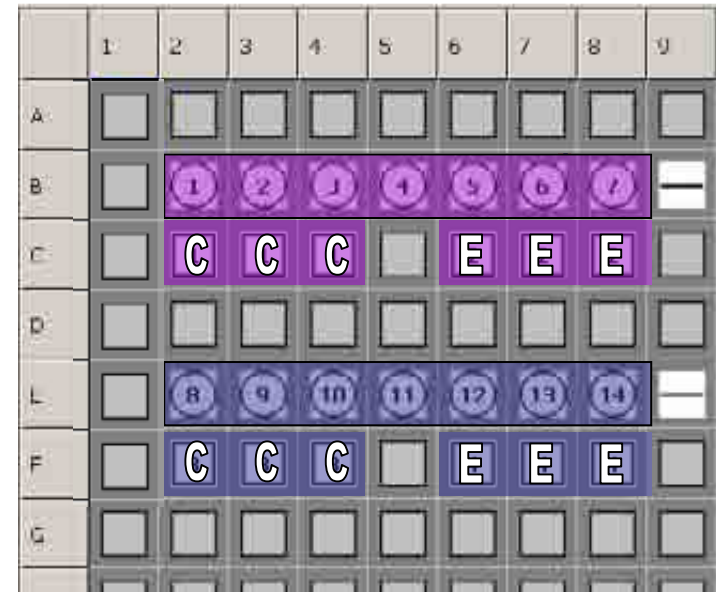
□ Unknowns
● Standards



NORTHERN



$$\text{Ratio experimental/control} = \frac{\text{fold change in target gene}}{\text{fold change in reference gene}}$$



Znajomość wydajności reakcji PCR jest kluczowa



CYCLE	AMOUNT OF DNA 100% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 90% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 80% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 70% EFFICIENCY
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	3	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1,024	613	357	202
11	2,048	1,165	643	343
12	4,096	2,213	1,157	583
13	8,192	4,205	2,082	990
14	16,384	7,990	3,748	1,684
15	32,768	15,181	6,747	2,862
16	65,536	28,844	12,144	4,866
17	131,072	54,804	21,859	8,272
18	262,144	104,127	39,346	14,063
19	524,288	197,842	70,824	23,907
20	1,048,576	375,900	127,482	40,642
21	2,097,152	714,209	229,468	69,092
22	4,194,304	1,356,998	413,043	117,456
23	8,388,608	2,578,296	743,477	199,676
24	16,777,216	4,898,763	1,338,259	339,449
25	33,554,432	9,307,650	2,408,866	577,063
26	67,108,864	17,684,534	4,335,959	981,007
27	134,217,728	33,600,615	7,804,726	1,667,711
28	268,435,456	63,841,168	14,048,506	2,835,109
29	536,870,912	121,298,220	25,287,311	4,819,686
30	1,073,741,824	230,466,618	45,517,160	8,193,466

AFTER 1 CYCLE

100% = 2.00x

90% = 1.90x

80% = 1.80x

70% = 1.70x

CYCLE	AMOUNT OF DNA 100% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 90% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 80% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 70% EFFICIENCY
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	3	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1,024	613	357	202
11	2,048	1,165	643	343
12	4,096	2,213	1,157	583
13	8,192	4,205	2,082	990
14	16,384	7,990	3,748	1,684
15	32,768	15,181	6,747	2,862
16	65,536	28,844	12,144	4,866
17	131,072	54,804	21,859	8,272
18	262,144	104,127	39,346	14,063
19	524,288	197,842	70,824	23,907
20	1,048,576	375,900	127,482	40,642
21	2,097,152	714,209	229,468	69,092
22	4,194,304	1,356,998	413,043	117,456
23	8,388,608	2,578,296	743,477	199,676
24	16,777,216	4,898,763	1,338,259	339,449
25	33,554,432	9,307,650	2,408,866	577,063
26	67,108,864	17,684,534	4,335,959	981,007
27	134,217,728	33,600,615	7,804,726	1,667,711
28	268,435,456	63,841,168	14,048,506	2,835,109
29	536,870,912	121,298,220	25,287,311	4,819,686
30	1,073,741,824	230,466,618	45,517,160	8,193,466

AFTER 1 CYCLE

100% = 2.00x

90% = 1.90x

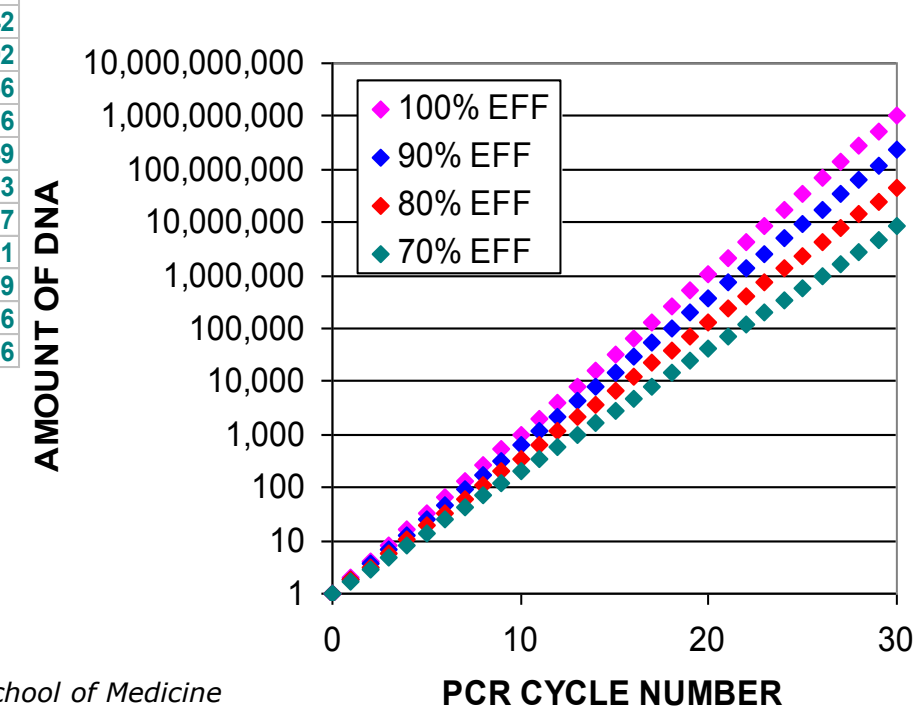
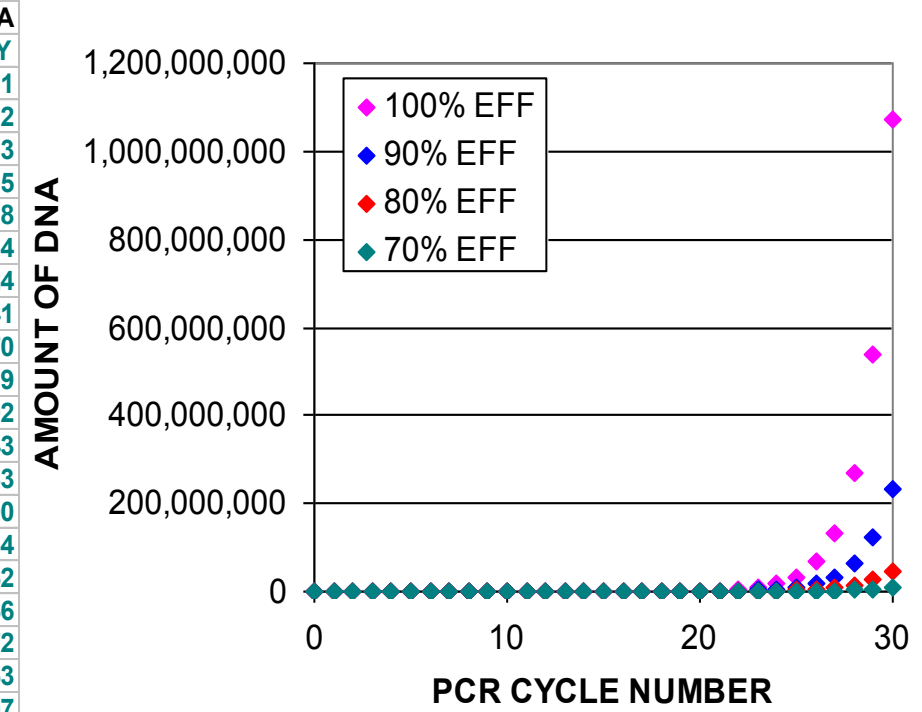
80% = 1.80x

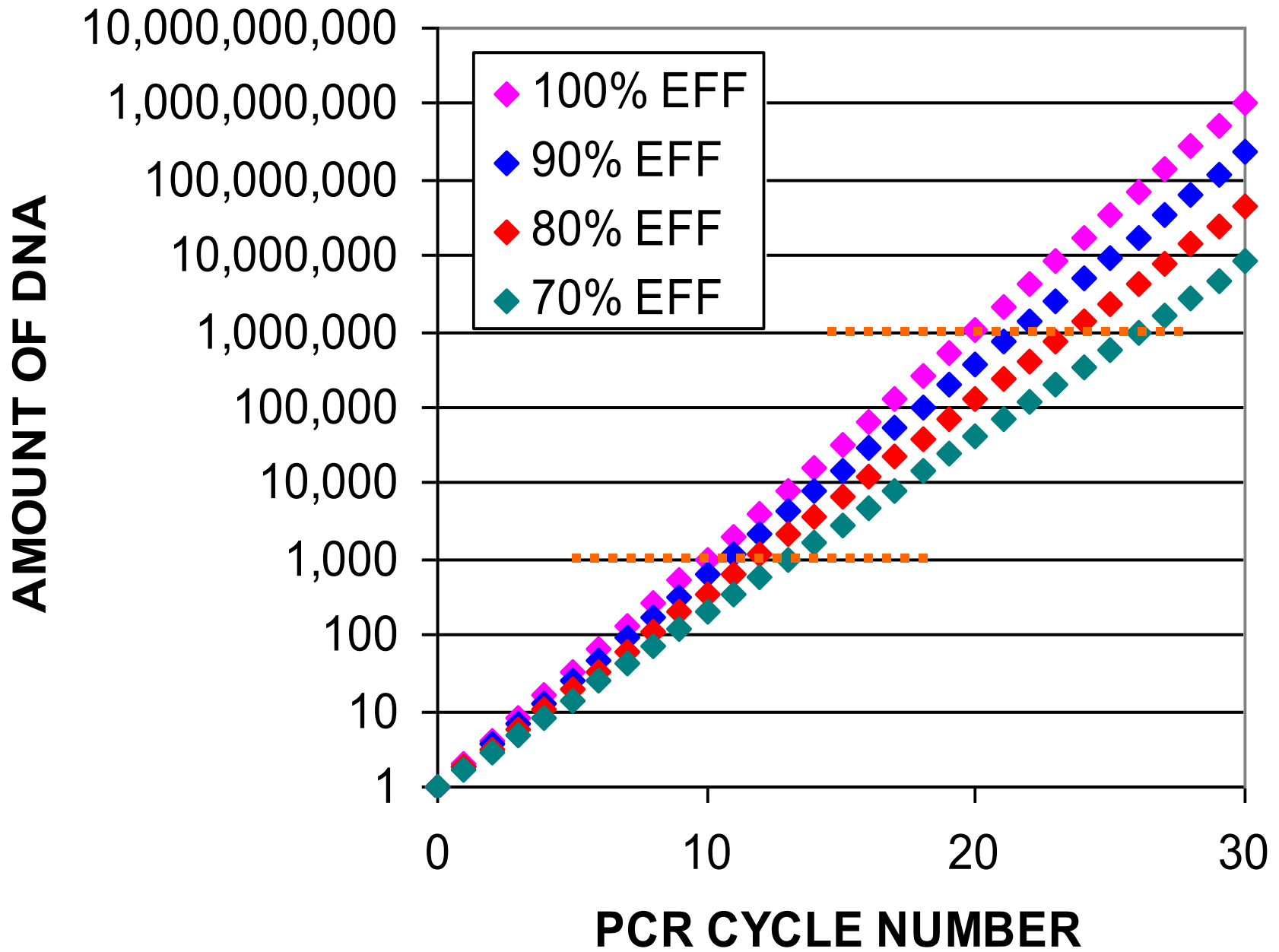
70% = 1.70x

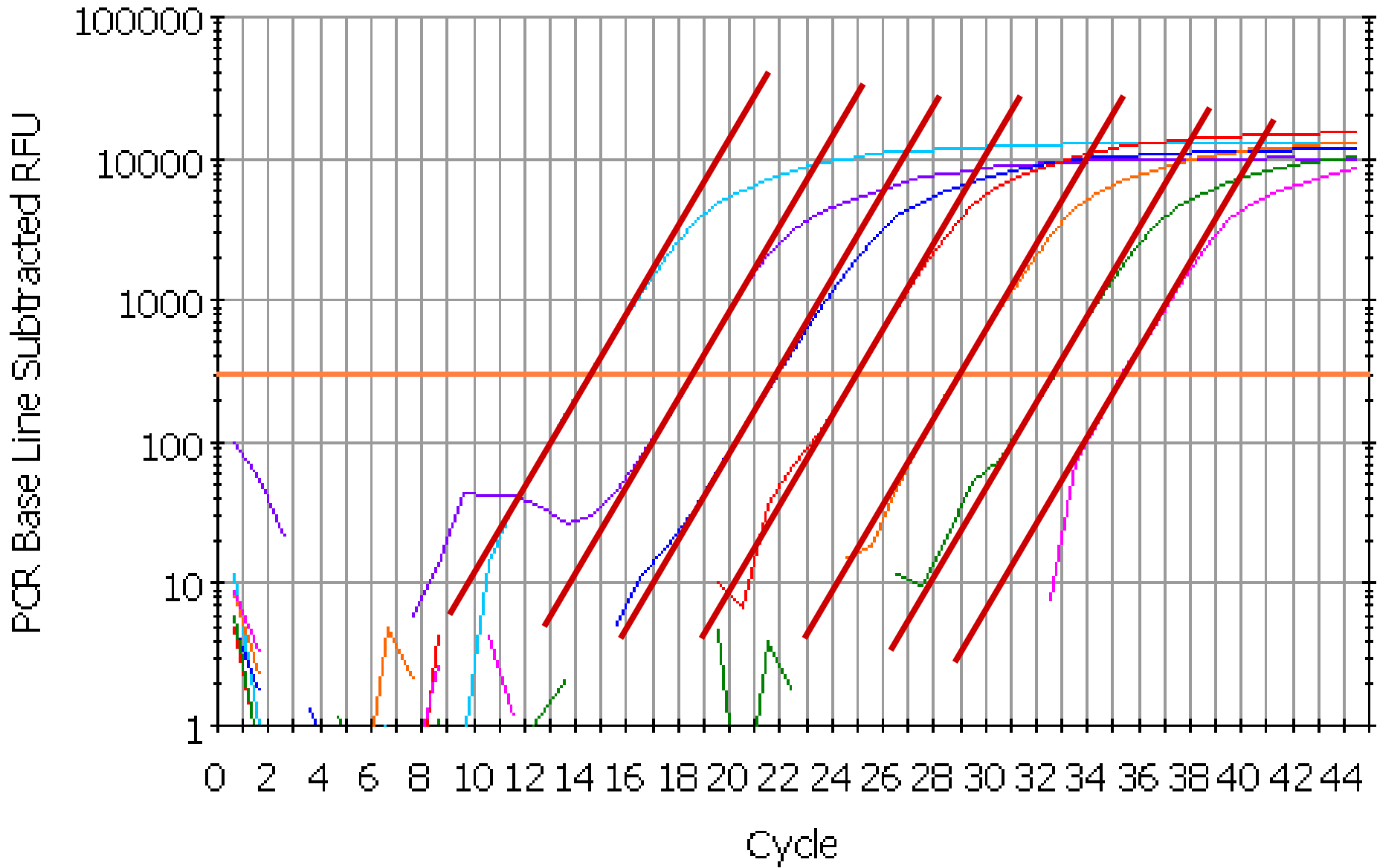
AFTER N CYCLES:

**fold increase =
(efficiency)ⁿ**

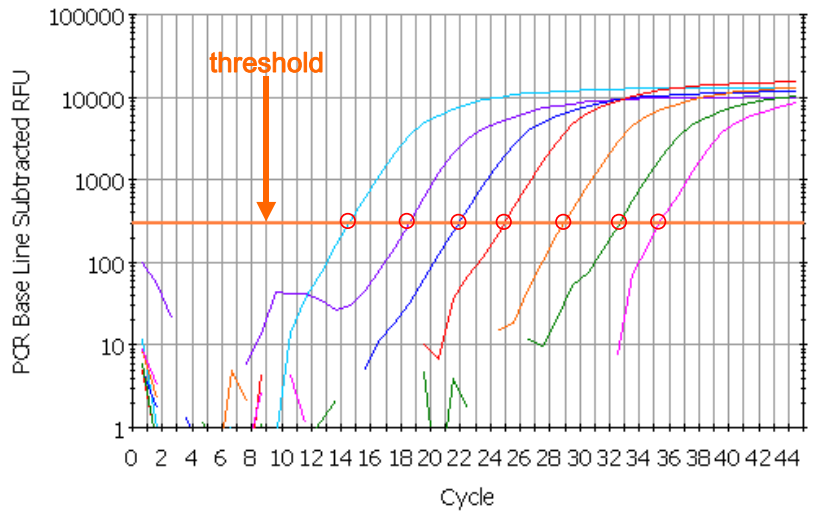
CYCLE	AMOUNT OF DNA	AMOUNT OF DNA	AMOUNT OF DNA	AMOUNT OF DNA
	100% EFFICIENCY	90% EFFICIENCY	80% EFFICIENCY	70% EFFICIENCY
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	3	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1,024	613	357	202
11	2,048	1,165	643	343
12	4,096	2,213	1,157	583
13	8,192	4,205	2,082	990
14	16,384	7,990	3,748	1,684
15	32,768	15,181	6,747	2,862
16	65,536	28,844	12,144	4,866
17	131,072	54,804	21,859	8,272
18	262,144	104,127	39,346	14,063
19	524,288	197,842	70,824	23,907
20	1,048,576	375,900	127,482	40,642
21	2,097,152	714,209	229,468	69,092
22	4,194,304	1,356,998	413,043	117,456
23	8,388,608	2,578,296	743,477	199,676
24	16,777,216	4,898,763	1,338,259	339,449
25	33,554,432	9,307,650	2,408,866	577,063
26	67,108,864	17,684,534	4,335,959	981,007
27	134,217,728	33,600,615	7,804,726	1,667,711
28	268,435,456	63,841,168	14,048,506	2,835,109
29	536,870,912	121,298,220	25,287,311	4,819,686
30	1,073,741,824	230,466,618	45,517,160	8,193,466







SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS



SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS

$$39.204 \quad Y = -3.488 X + 39.204$$

15

- Unknowns
- Standards



PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

Wyznaczanie wydajności reakcji qPCR

4 metody wyznaczania **E** qPCR:

1. Wyliczana z nachylenia krzywej wzorcowej (kalibracyjnej), często **E** zawyżone

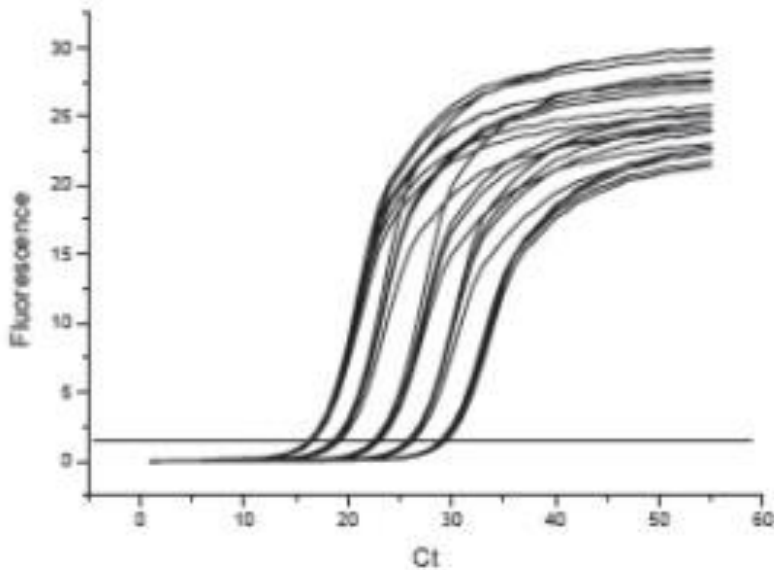
Możliwe dla każdej reakcji z osobna:

2. Wyliczana na podstawie historii przyrostu fluorescencji przy pomocy regresji liniowej – metoda „ręczna”, często **E** zaniżone
3. Dopasowanie krzywej wg założonego modelu do wartości fluorescencji od 1 do ostatniego cyklu – często **E** zaniżone
4. Wyliczana na podstawie wielomianowego dopasowania krzywej do danych fluorescencji tylko z 2 fazy qPCR – wartości pośrednie

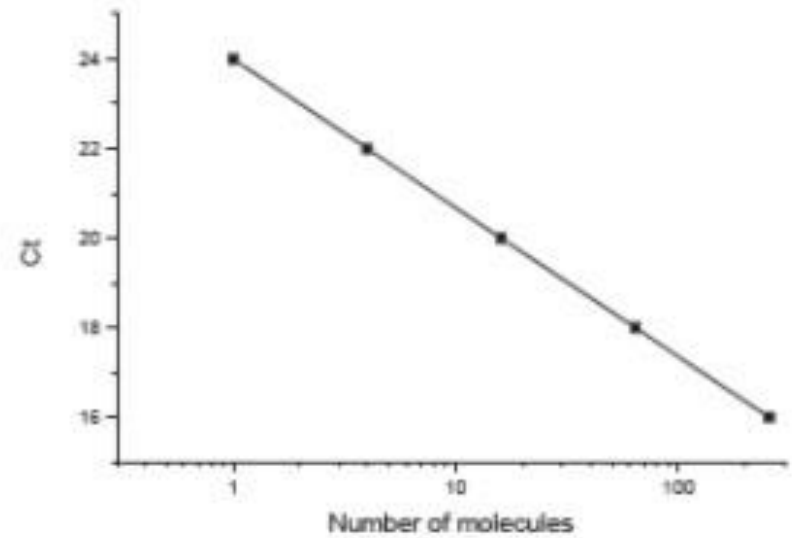
M. W. Pfaffl: *Quantification strategies in real-time PCR w A-Z of quantitative PCR* (Edytor: S.A. Bustin)



Wyznaczanie wydajności reakcji qPCR na podstawie krzywych wzorcowych



**Seryjne rozcieńczenia,
min. 5, lepiej 6 do 8**



$$E = 10^{-1/\text{slope}-1}$$

Za TATA Biocenter



Równanie reakcji qPCR

$$N_{Ct} = N_0(1 + E)^{Ct}$$

N_{Ct} : ilość cząsteczek po Ct cyklach amplifikacji

N_0 : początkowa ilość cząsteczek

E : wydajność reakcji PCR

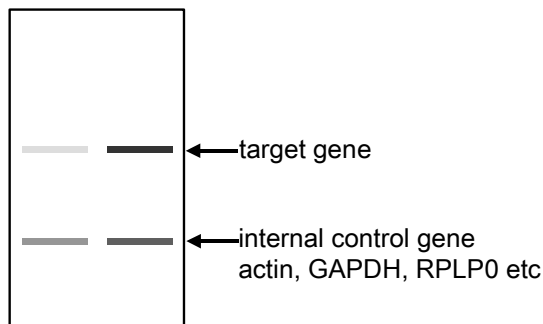
Ct : wartość „cyklu przegięcia”



Metoda PFAFFLa czyli „Realtive Quantification”

**M.W. Pfaffl, Nucleic Acids Research,
2001, 29:2002-2007**

NORTHERN



$$\text{ratio} = \frac{\text{fold increase in target gene}}{\text{fold increase in reference gene}}$$

Microbiology and Immunology On-line; University of South Carolina School of Medicine





Cursor



Standard



Unknown



Blank



+ Control



- Control

Pu

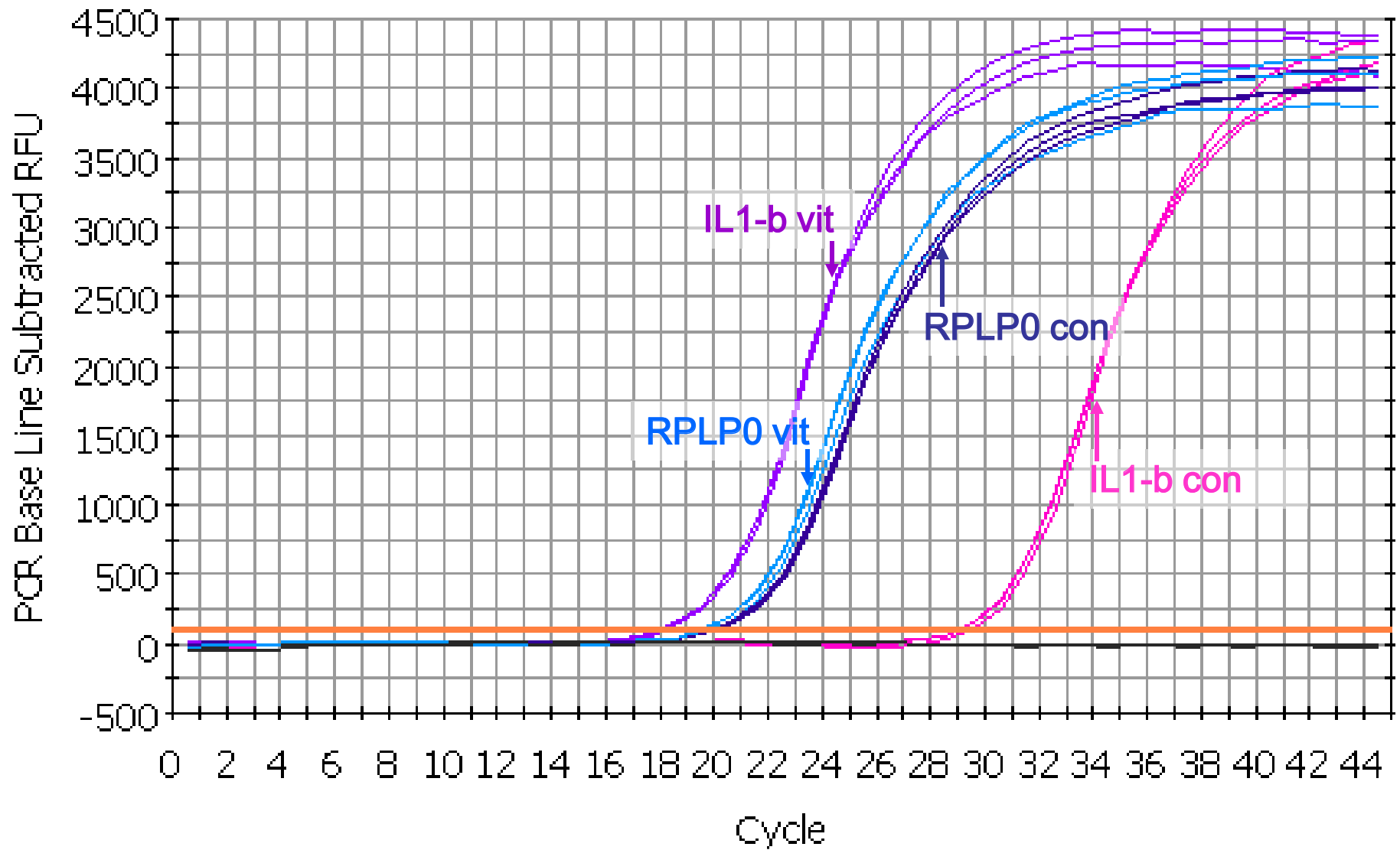
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A									
B									
C		C	C	C		E	E	E	
D									
E									
F		C	C	C		E	E	E	
G									

←triplicates cDNA

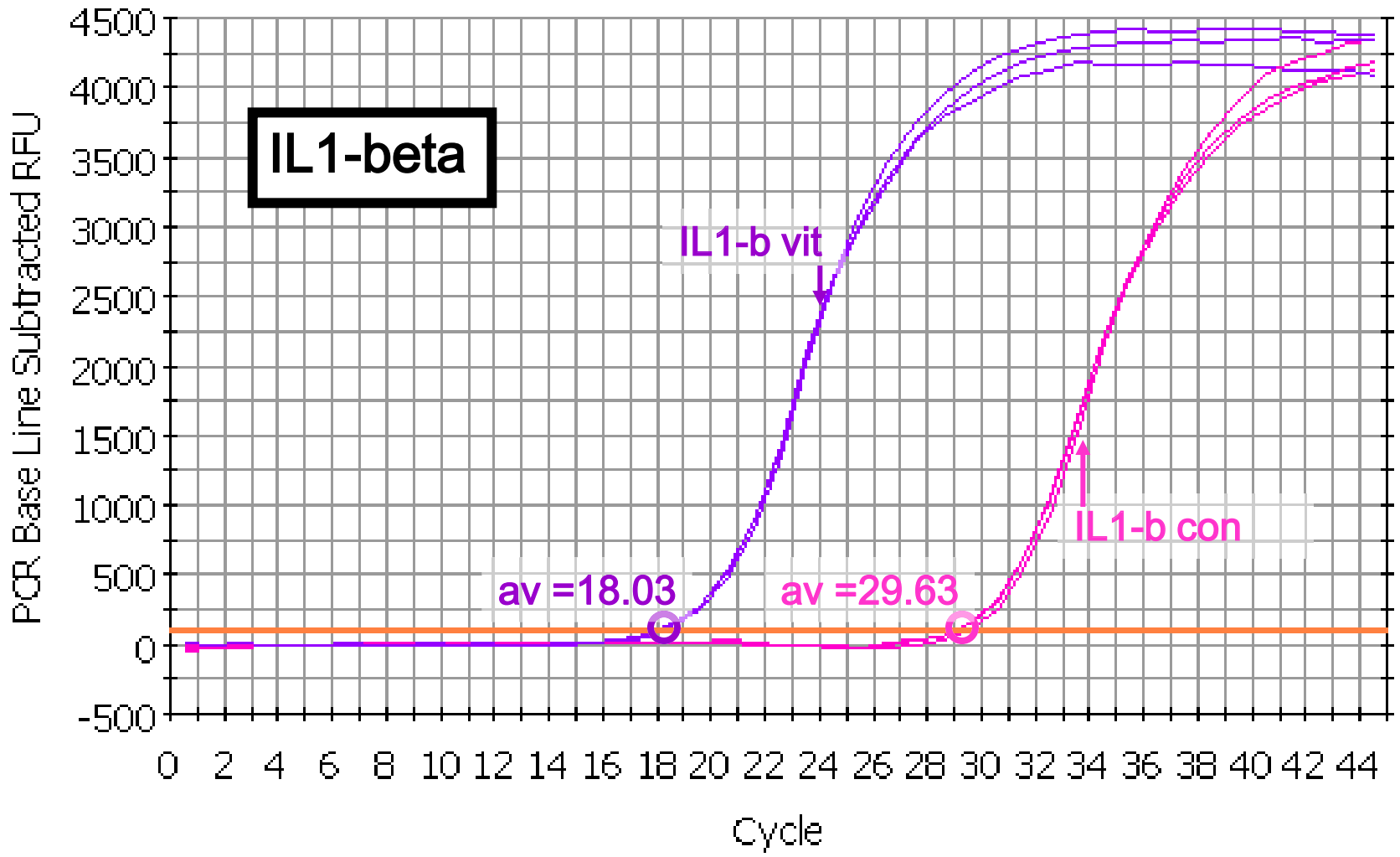
}target primers

←triplicates cDNA

}reference primers

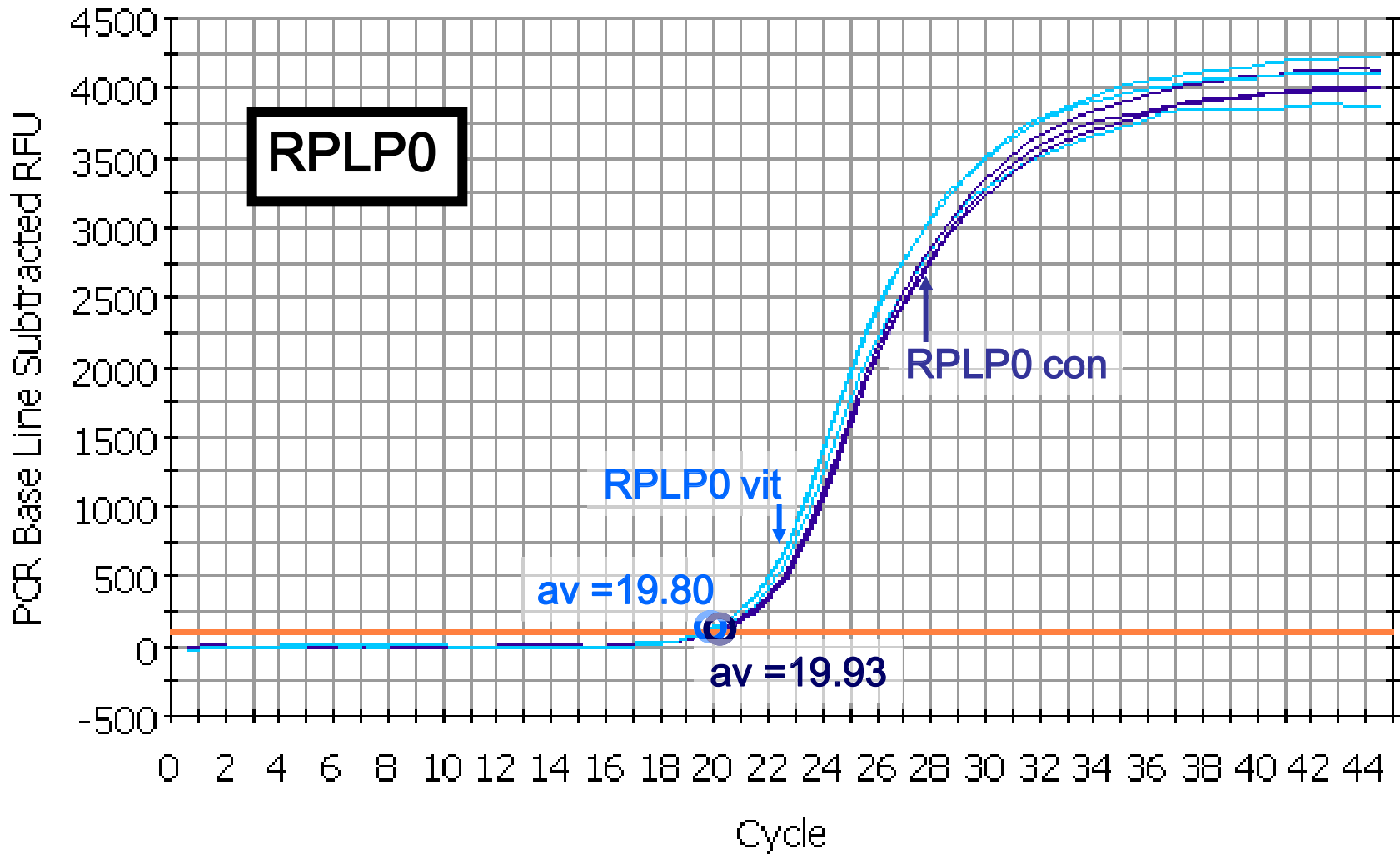


PCR Amplification vs Cycle: Data 26-Feb-03 1147.opd



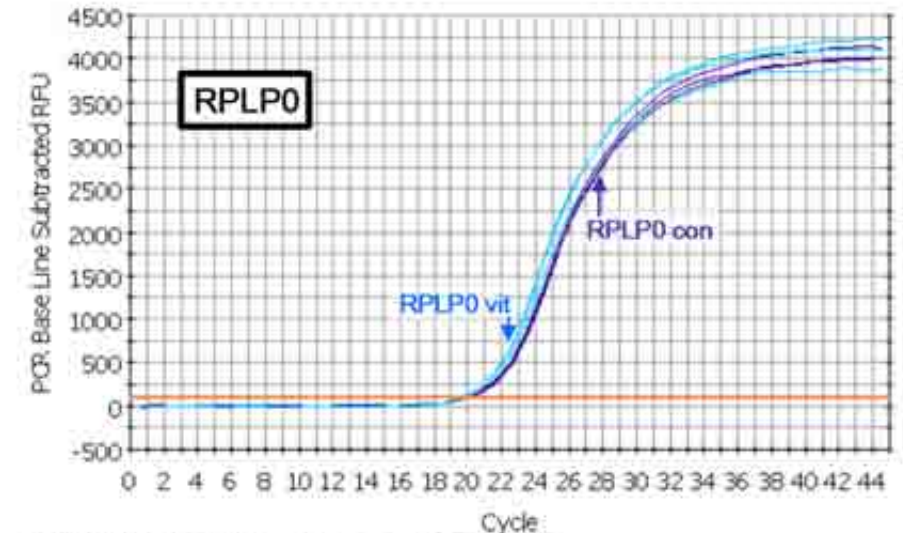
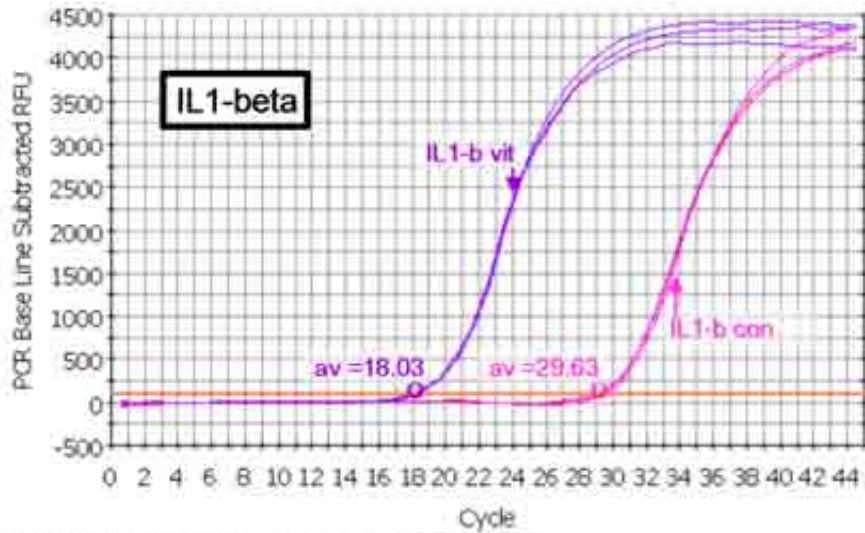
AFTER N CYCLES: change = (efficiency)ⁿ

AFTER N CYCLES: ratio vit/con = (1.93)^{29.63-18.03} = 1.93^{11.60} = 2053



AFTER N CYCLES: change = (efficiency)ⁿ

AFTER N CYCLES: ratio vit/con = (1.87)^{19.93-19.80} = 1.87^{0.13} = 1.08



AFTER N CYCLES: increase = (efficiency)ⁿ

$$\text{Ratio vit/con} = (1.93)^{29.63-18.03} = 1.93^{11.60} = 2053$$

AFTER N CYCLES: increase = (efficiency)ⁿ

$$\text{Ratio vit/con} = (1.87)^{19.93-19.80} = 1.87^{0.13} = 1.08$$

$$\text{ratio} = \frac{\text{change in IL1-B}}{\text{change in RPLP0}} = 2053/1.08 = 1901$$

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (control-treated)}}$$

Znajomość wydajności reakcji jest konieczna!

Given: slope: -3.9 from a standard curve

Ct(sample A) = 23.5

Ct(sample B) = 26.5

Calculate: (A) PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1 = 80 \%$$

(B) Relative expression between sample A and B:

$$(1+E)^{\Delta C_t} = 1.80^{(26.5-23.5)} = 5.8$$

(C) Interpretation:

Sample A contains 5.8 times more target than sample B



Znajomość wydajności reakcji jest konieczna!

Given: slope: -3.5 from a standard curve

$$Ct(\text{sample A}) = 23.5$$

$$Ct(\text{sample B}) = 26.5$$

Calculate the relative expression:

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1 = 93\%$$

$$(1+E)^{\Delta Ct} = 1.93^{(26.5-23.5)} = 7.2$$

Interpretation:

The relative expression increased from 5.8 to 7.2 when the PCR efficiency was 13% higher.

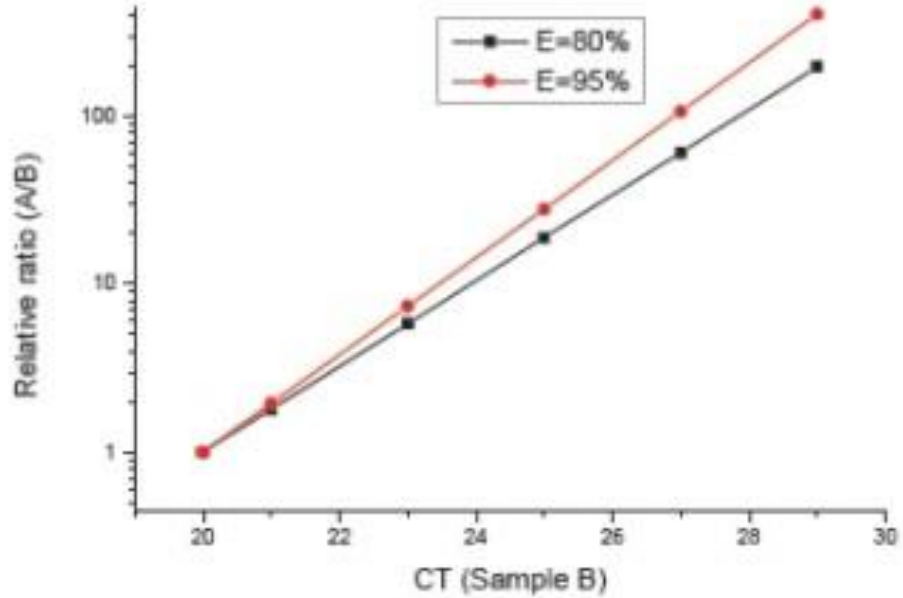
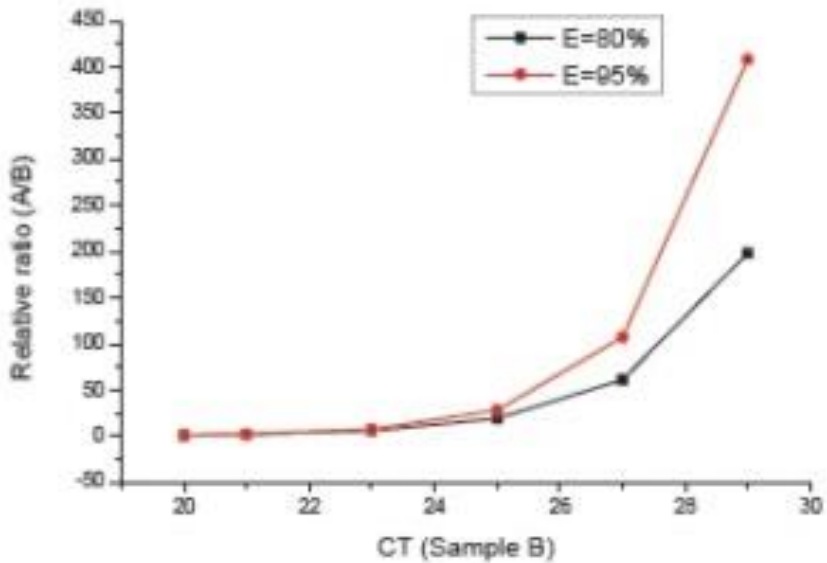


Znajomość wydajności reakcji jest konieczna!

<u>E = 80 %</u>	<u>Ct_A = 20</u>	<u>E = 95%</u>
1.8	Ct _B = 21	1.95
5.8	Ct _B = 23	7.4
19	Ct _B = 25	28
61	Ct _B = 27	107
198	Ct _B = 29	408



Błąd w reakcji qPCR akumuluje się wykładniczo!



Równanie mRNA

$$\frac{N_A}{N_B} = K_{RS} \frac{\eta_B (1 + E_B)^{CT_B - 1}}{\eta_A (1 + E_A)^{CT_A - 1}}$$

η – wydajność RT

CT – wartość (cykl) Ct

E – wydajność PCR

K_{RS} – względna czułość qPCR



Kwantyfikacja: 2 próby, 2 geny

$$\frac{\text{Sample A}}{\text{Sample B}} = \frac{\left[\frac{N_{0_{tar}}}{N_{0_{ref}}} \right]_{\text{Sample A}}}{\left[\frac{N_{0_{tar}}}{N_{0_{ref}}} \right]_{\text{Sample B}}} = \frac{\left[\frac{(1 + E_{ref})^{Ct_{ref}}}{(1 + E_{tar})^{Ct_{tar}}} \right]_{\text{Sample A}}}{\left[\frac{(1 + E_{ref})^{Ct_{ref}}}{(1 + E_{tar})^{Ct_{tar}}} \right]_{\text{Sample B}}}$$

$$\frac{\text{Sample A}}{\text{Sample B}} = \frac{(1 + E_{ref})^{CtA_{ref} - CtB_{ref}}}{(1 + E_{tar})^{CtA_{tar} - CtB_{tar}}}$$



„garbage in, garbage out“

„Real-time quantitative RT-PCR is a wonderful method for fast, accurate, sensitive and cost-effective gene expression analysis. However, the simplicity of the technology itself makes it vulnerable for **abuse in experiments** in which the operator **does not perform the required quality control throughout the entire procedure.**“

Derveaux S. et al., Methods 50 (2010) 227–230



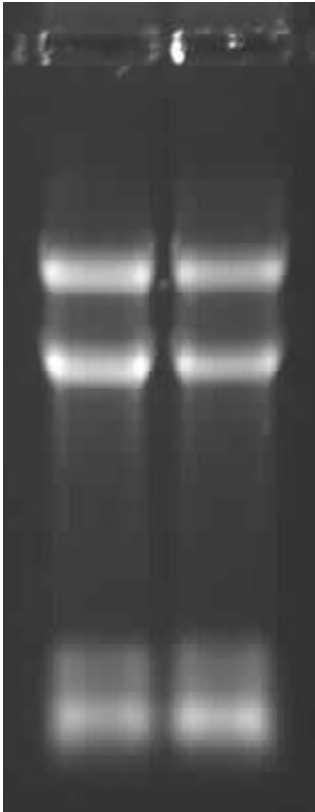
RT-qPCR w praktyce



Jakość RNA to podstawa!!!

Inkubacja z
DNazą, 1h 37°C

- +



Jakość RNA = czystość + integralność

**Czystość – oznaczana
spektrofotometrycznie**

($OD_{260/230} > 2,0$; $OD_{260/280} > 1,8$)

**Konieczna kontrola jakości RNA po
izolacji!**

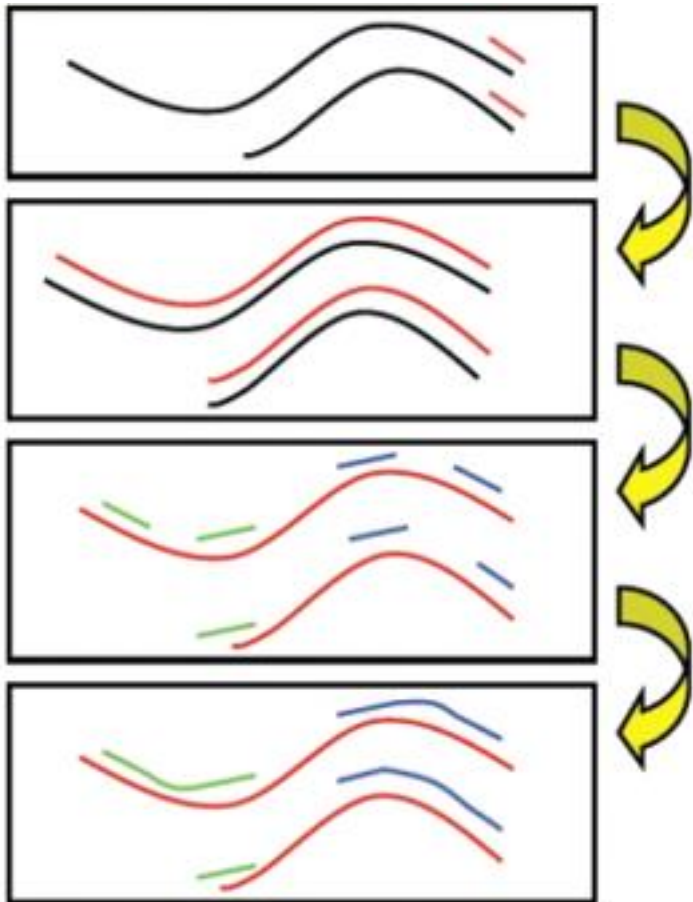
Zawsze konieczne DNazowanie prób!
20% ludzkich genów posiada 1 egzon,
lub występują eksprymowane
retropseudogeny lub kopie pozbawione
intronów!!!

**Zalecane stosowanie inhibitorów RNaz
przy RT!**

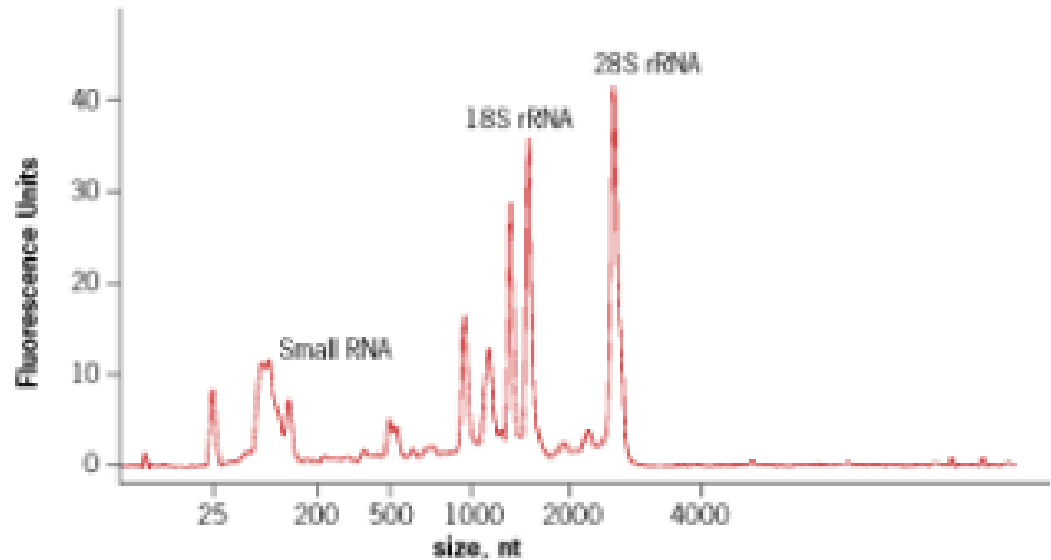


Ocena integralności RNA

Test integralności końców 5'-3' RNA



Analizatory mikrocieczowe

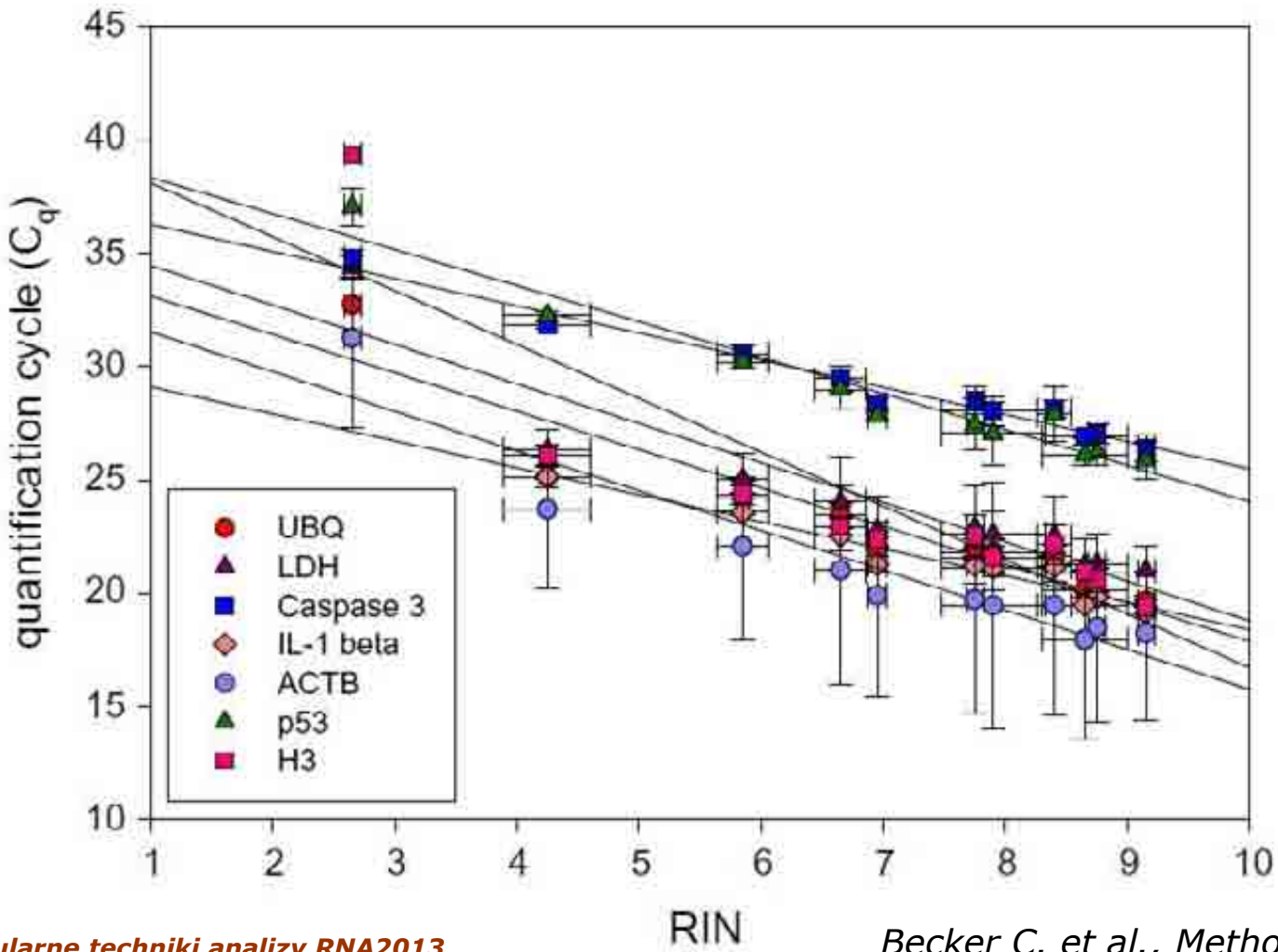


- Biorad: Experion
- Agilent: Bioanalyzer
- Elektroforeza kapilarna



Jakość wpływa na wyniki!!!

RIN: „RNA Integrity Number”, min. 7
(wg Bioanalyzer, Agilent Tech.)



Zawsze **KONTROLE!!!**

Kontrole negatywne:

- **-RT**: kontrola kontaminacji DNA genomowym, konieczna!
- **NTC**: „no template controle”: kontrola czystości odczynników!!!

Kontrola pozytywna:

- **min. 2-3 próbki** np. z krzywej standardowej – kontrola wydajności reakcji! (**IRC** = ang. „inter-run calibrators”)



Dobra praktyka laboratoryjna TO PODSTAWA!!!

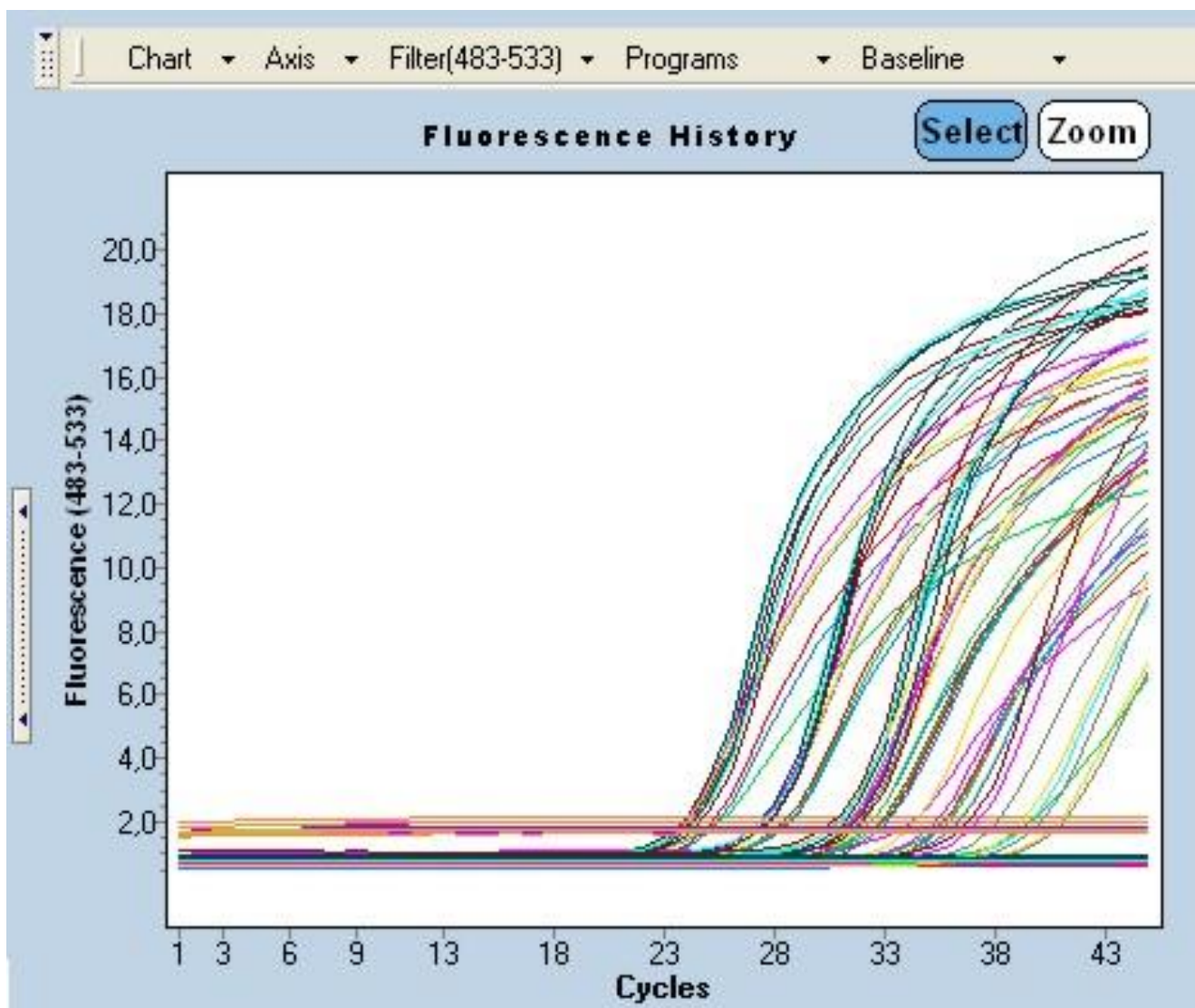
- Nie pipetować ręcznie **mniej jak 2 μ l** na raz!
- Oddzielne miejsce dla przygotowywania reakcji bez matrycy i oddzielne dla dodawania DNA!
- Rękawiczki **bez talku!**
- Składanie reakcji w „**MIXach**” a nie oddzielenie!
- Nie otwierać probówek/płytek po reakcji w pomieszczeniach do ich przygotowywania!
- Komory z przepływem laminarnym!



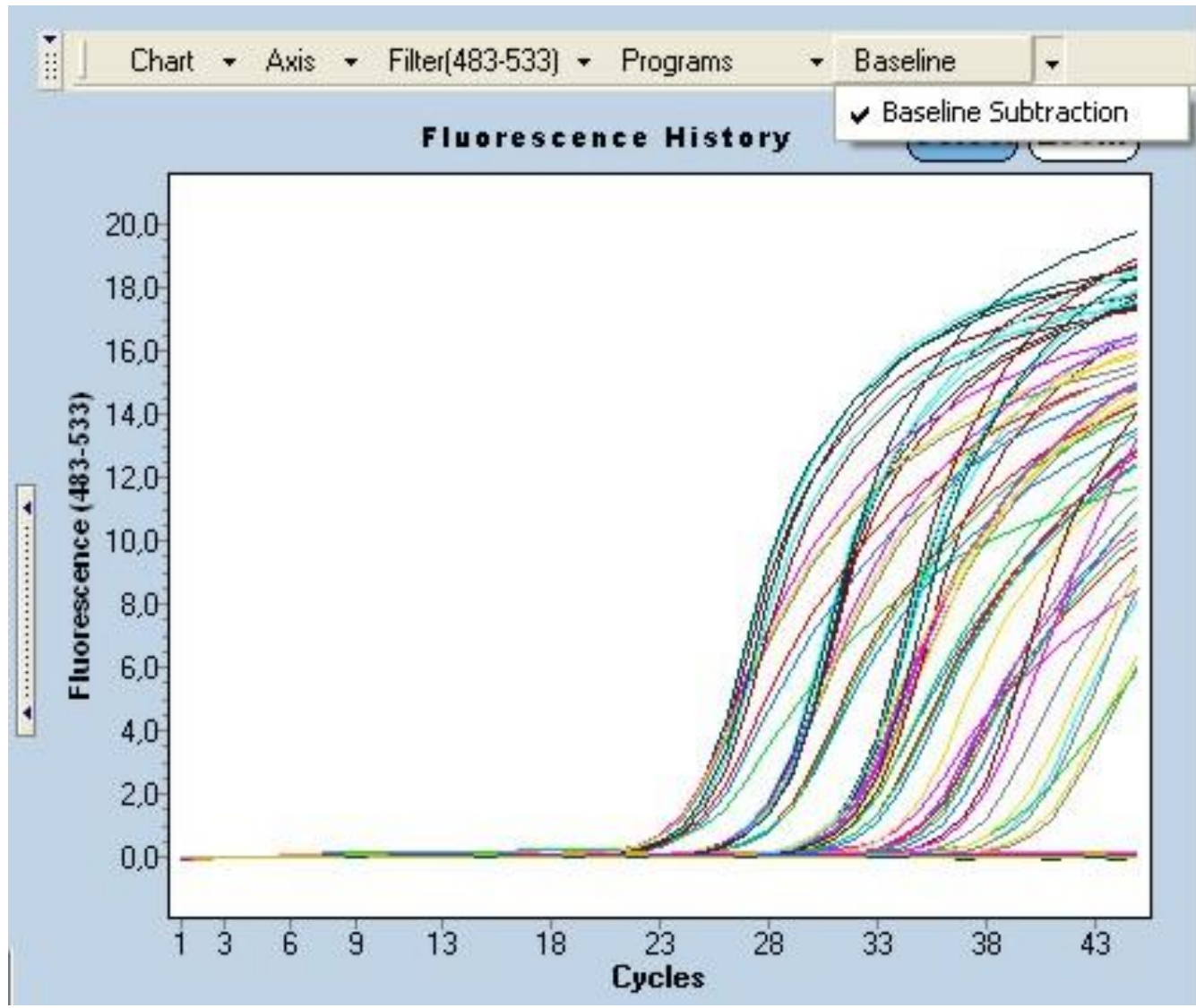
Podstawowa analiza reakcji qPCR



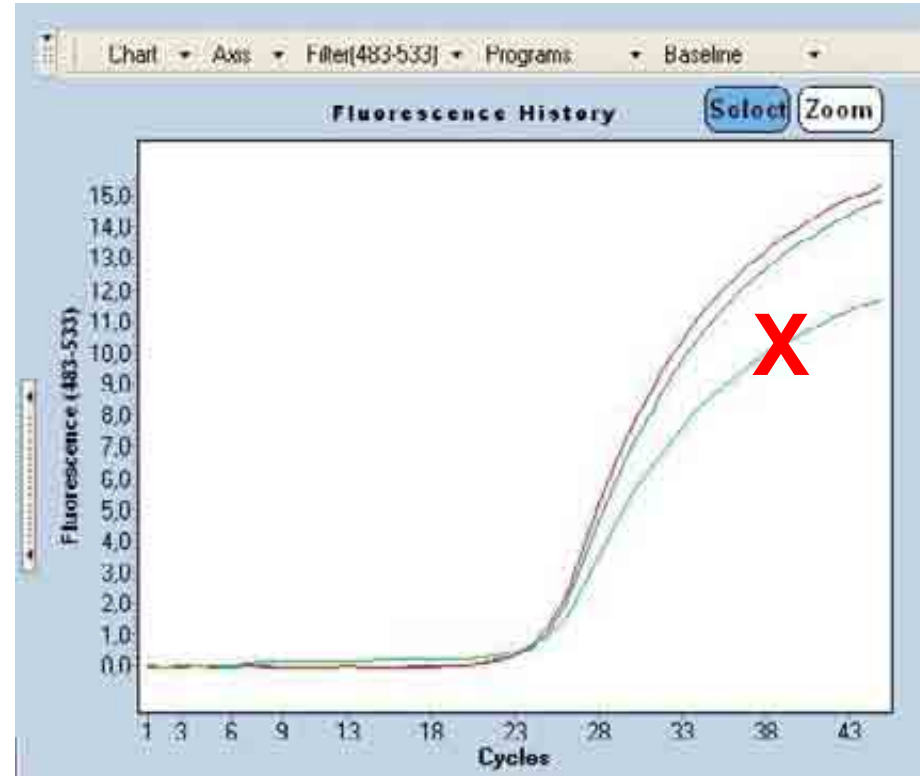
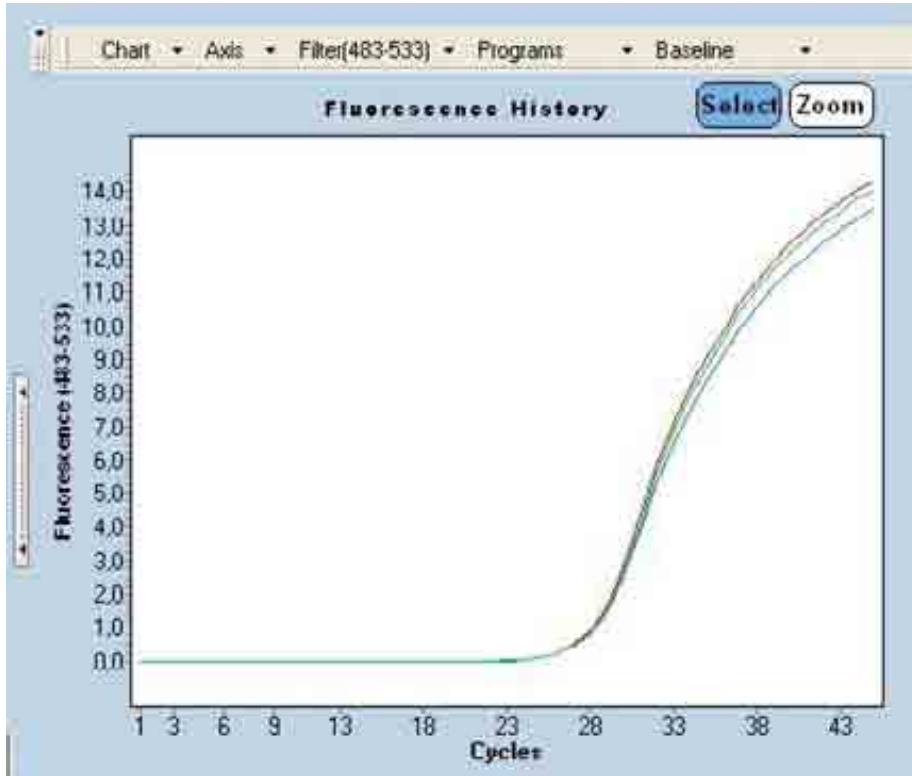
Krzywe amplifikacji – „surowe” dane



Odjęcie linii podstawowej

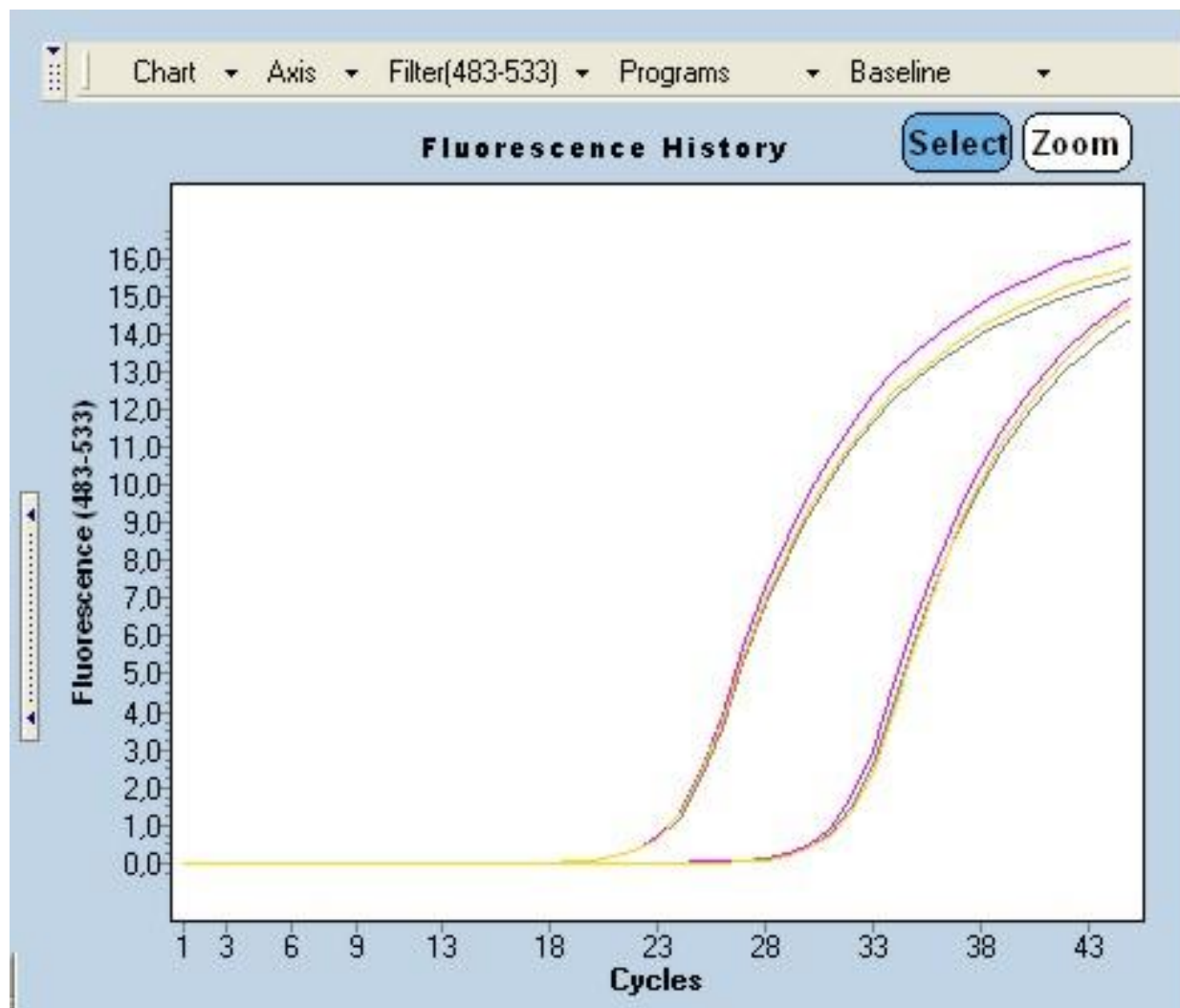


1 qPCR = 3 powtórzenia reakcji!!!



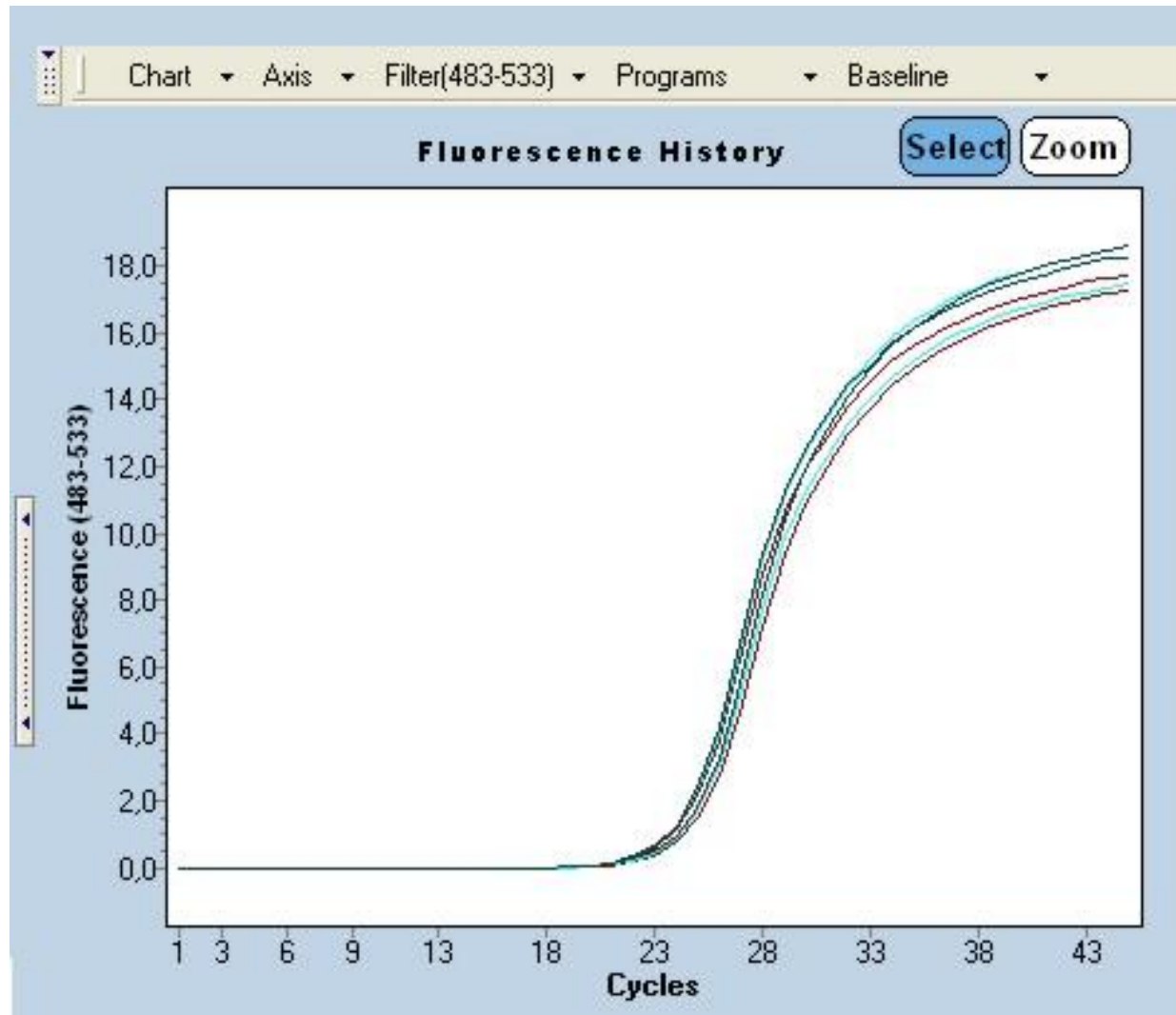
Inspekcja krzywych amplifikacji

Gen badany



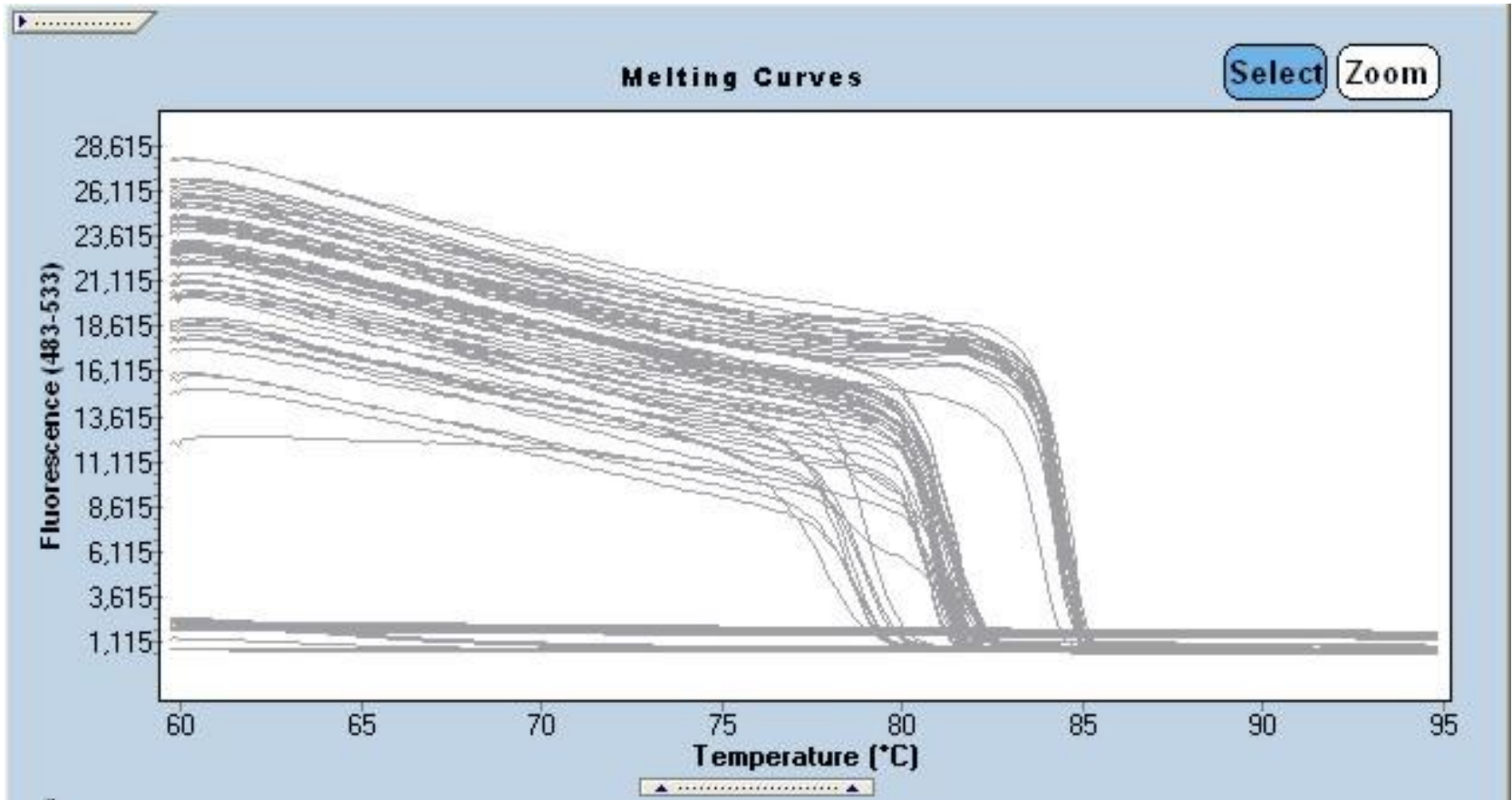
Inspekcja krzywych amplifikacji

Gen referencyjny



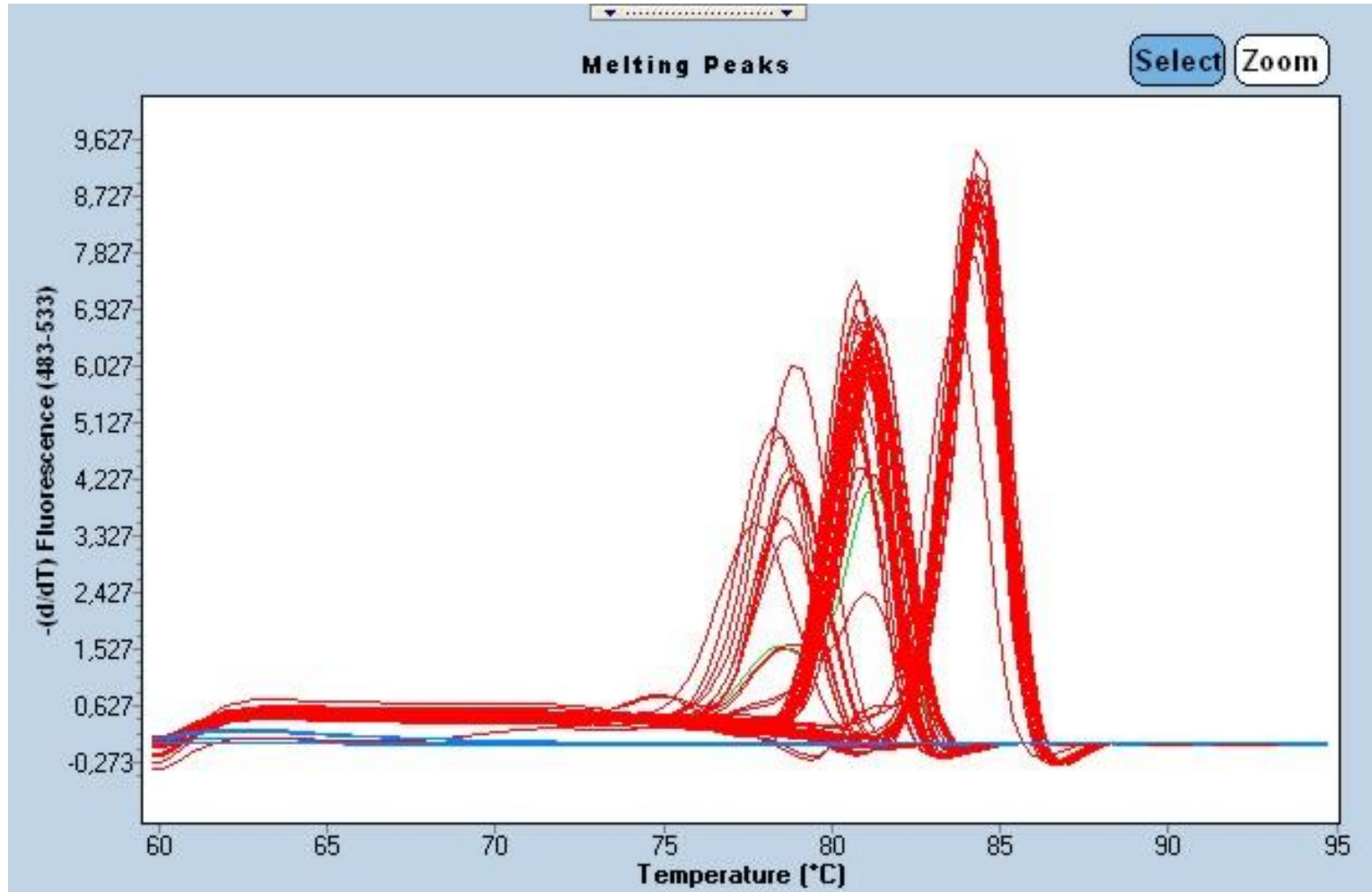
Analiza krzywych topnienia

Możliwa głównie dla SYBR Green



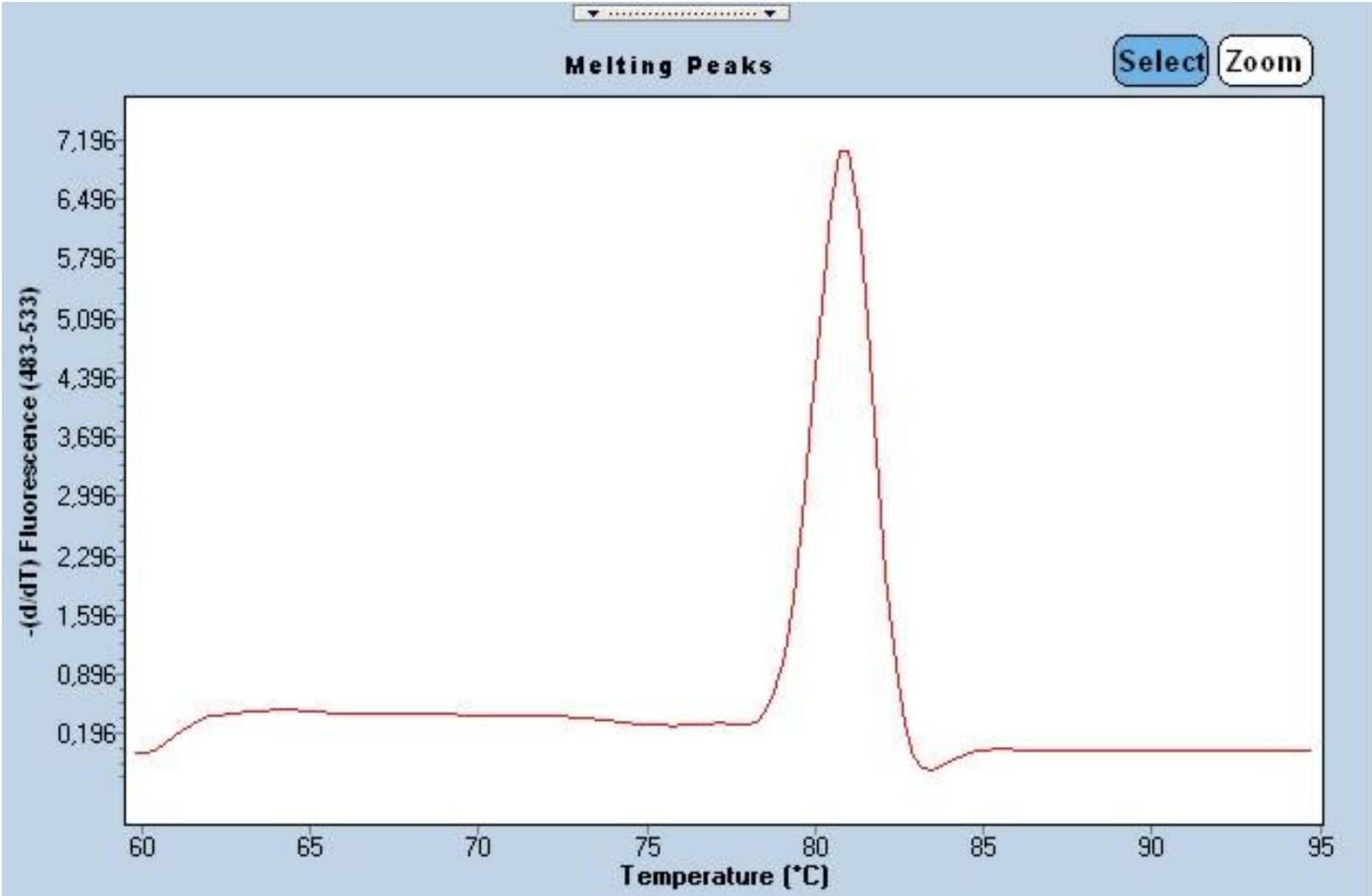
Analiza krzywych topnienia

T_m – wypadkowa długości i zawartości GC/AT



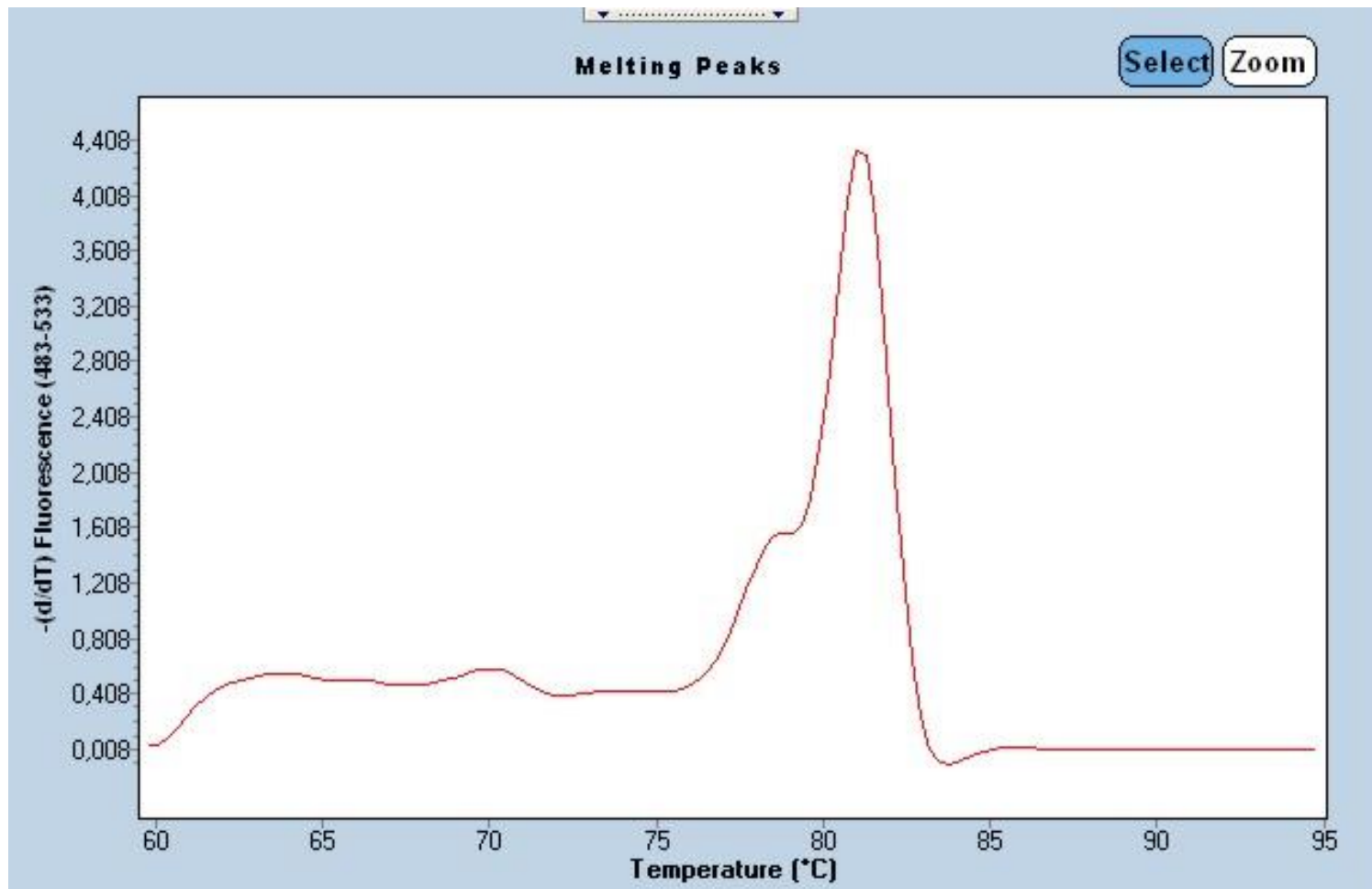
Analiza krzywych topnienia

Czysty produkt qPCR



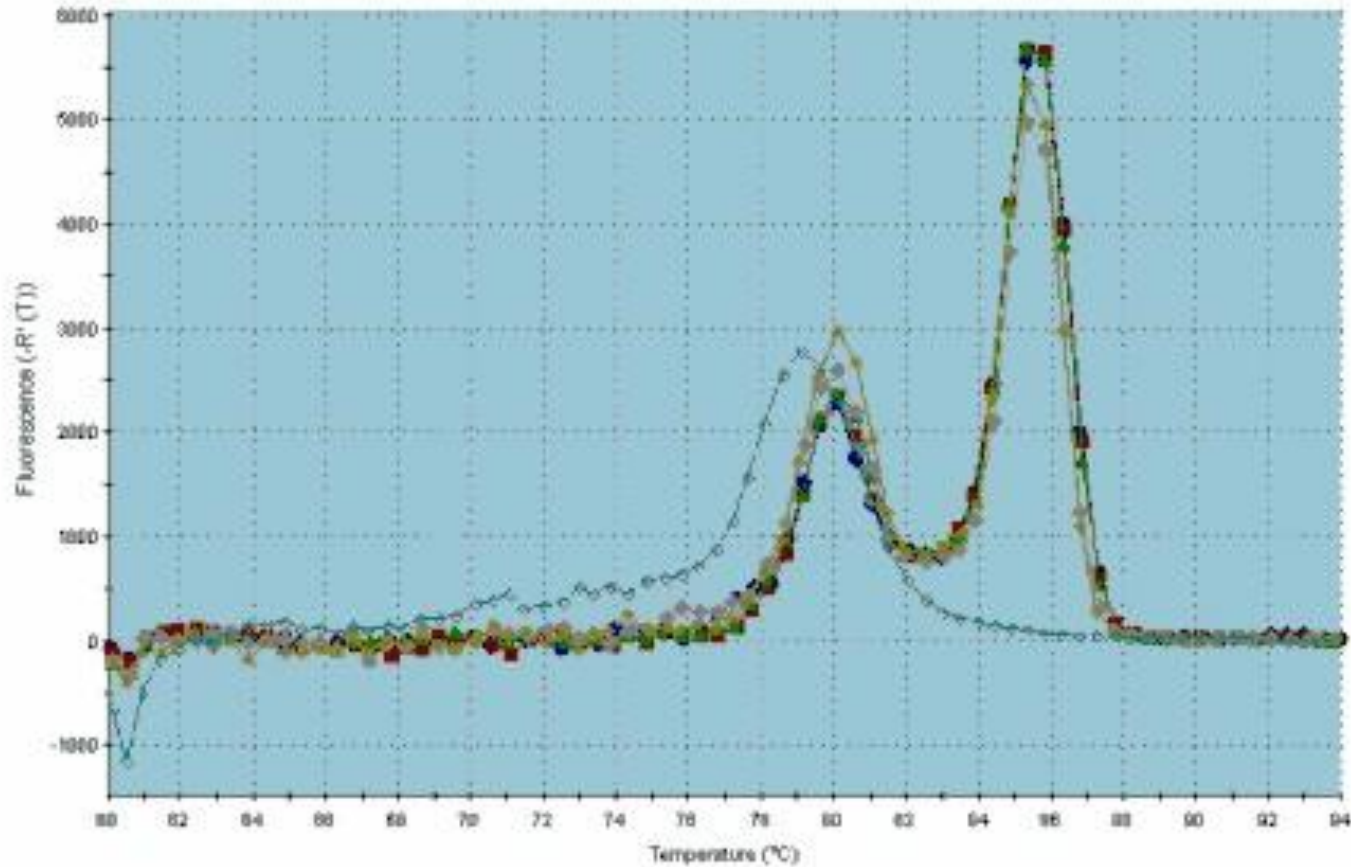
Analiza krzywych topnienia

Problem „primer-dimer”



Analiza krzywych topnienia

Problem niespecyficzných produktów



Analiza krzywych topnienia

Nie wierzyć ślepo krzywym topnienia!!

Dłuższy produkt bogaty w pary AT może mieć tą samą T_m co krótszy bogaty w GC!!

Produkty dla każdej nowej pary starterów zawsze sprawdzić na wysokorozdzielczym żelu! Przynajmniej raz, na etapie „ustawiania reakcji”.



Standaryzacja



Wybór genu referencyjnego

NIE ISTNIEJE „DOSKONAŁY” GEN REFERENCYJNY!!!

- **Równa ilość kopii RNA we wszystkich komórkach**
- **Eksprymowany we wszystkich komórkach**
- **Eksprymowany na średnim poziomie**

- **Należy stosować przynajmniej 2 różne geny referencyjne! Lepiej 3 do nawet 5!!!**
- **Standaryzujemy względem średniej geometrycznej dla referencji.**
- **Geny należy wybrać EKSPERYMENTALNIE z większej grupy!!**

Vandesompele et al., Genome Biology, 2002,



Analiza statystyczna wariacji wartości Ct dla genów referencyjnych

<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>

geNorm						
Change Data	GAPD	ACTB	HPRT1	UBC	YHWAZ	Normalisation
FIB1	0,516257	0,499303	0,482906	0,447207	0,572560	0,5828
FIB2	0,287796	0,238713	0,313899	0,221805	0,351638	0,2787
FIB3	0,160974	0,262108	0,147588	0,177935	0,306647	0,2824
FIB4	0,462392	0,151878	0,284928	0,372176	0,221805	0,2774
FIB5	0,694914	0,678868	0,765572	0,572560	0,851906	0,7866
FIB6	0,001146	0,000160	0,000765	0,008377	0,000690	0,0005
FIB7	0,487767	0,574475	0,512821	0,418316	0,685694	0,5285
FIB8	0,192781	0,183976	0,151584	0,181536	0,169008	0,1753
FIB9	0,393914	0,281148	0,386101	0,411390	0,342369	0,3597
FIB10	0,011902	0,005503	0,009390	0,010310	0,012347	0,0095
FIB11	0,016844	0,008107	0,013740	0,022522	0,023837	0,0158
FIB12	0,011059	0,014301	0,011902	0,017709	0,015443	0,0139
FIB13	0,008438	0,007141	0,009676	0,010589	0,014206	0,0097
FIB14	0,593982	0,697238	0,624490	0,550071	0,708977	0,6328
FIB15	0,283978	0,196683	0,218133	0,445716	0,234760	0,2637
FIB16	0,572560	0,423941	0,544589	0,414147	0,528466	0,4923
FIB17	0,720913	0,990033	0,877896	0,880833	0,903443	0,8858
FIB18	0,514536	0,584330	0,533786	0,590028	0,467047	0,5284
FIB19	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,0000
FIB20	0,399211	0,316002	0,283978	0,441273	0,349298	0,3535
M < 1.5	0.513	0.664	0.432	0.523	0.475	

Vandesompele et al., *Genome Biology*, 2002,



Wybór genu referencyjnego

Ewentualnie...

- Zaufać opublikowanym danym, np. dla komórek ludzkich: GAPDH, albumina, aktyny, tubuliny, cyklofilina, mikroglobuliny, 18S lub 28S rRNA... choć ryzykowne
- np. <http://www.rtprimerdb.org/>
- lub wykorzystać komercyjne panele starterów (możliwe tylko dla niektórych organizmów modelowych)



Projektowanie układu doświadczenia



Akumulacja błędu

$$SD_{mRNA}^2 = SD_{RT}^2 + SD_{QPCR}^2$$



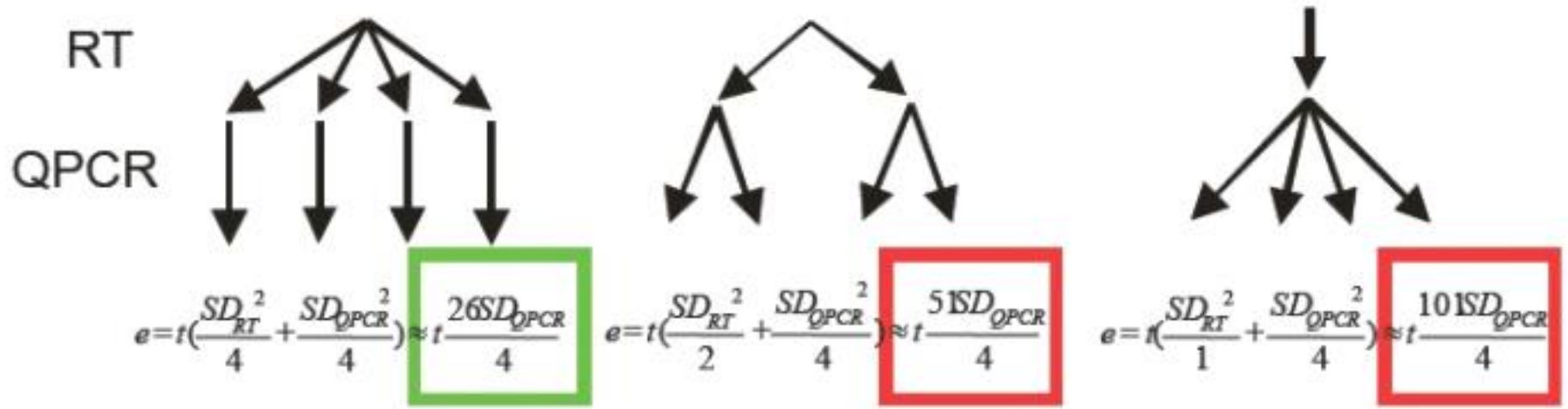
2 schematy układu doświadczeń

- Metoda „maksymalizacji prób”: jak najwięcej różnych prób analizowanych w tej samej reakcji. Czyli różne geny analizowane w różnych reakcjach. (preferowana w rutynowej pracy badawczej)
- Metoda „maksymalizacji genów”: jak najwięcej różnych par starterów w jednej reakcji. (preferowana w komercyjnych zestawach diagnostycznych)
- Bez względu na wybór metody należy stosować IRC

Hellemans et al., Genome Biology, 2007,



Ile powtórzeń biologicznych, RT, qPCR?



Ref: Ståhlberg *et al.* Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification Clin Chem 2004;50:3

TATAA Biocenter



**Najbardziej
kluczowym elementem**

**qPCR
jest reakcja**

**odwrotnej
transkrypcji!!!**

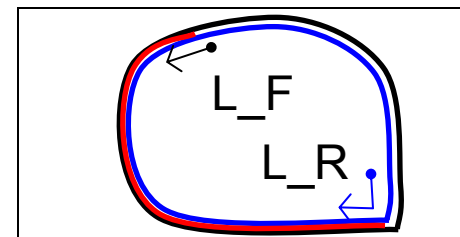
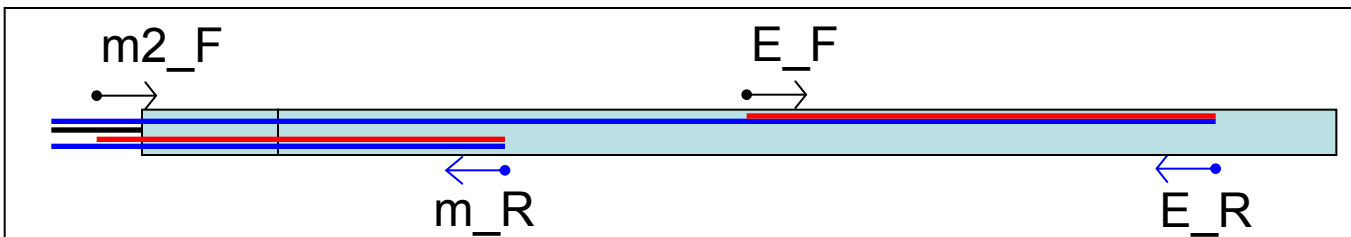
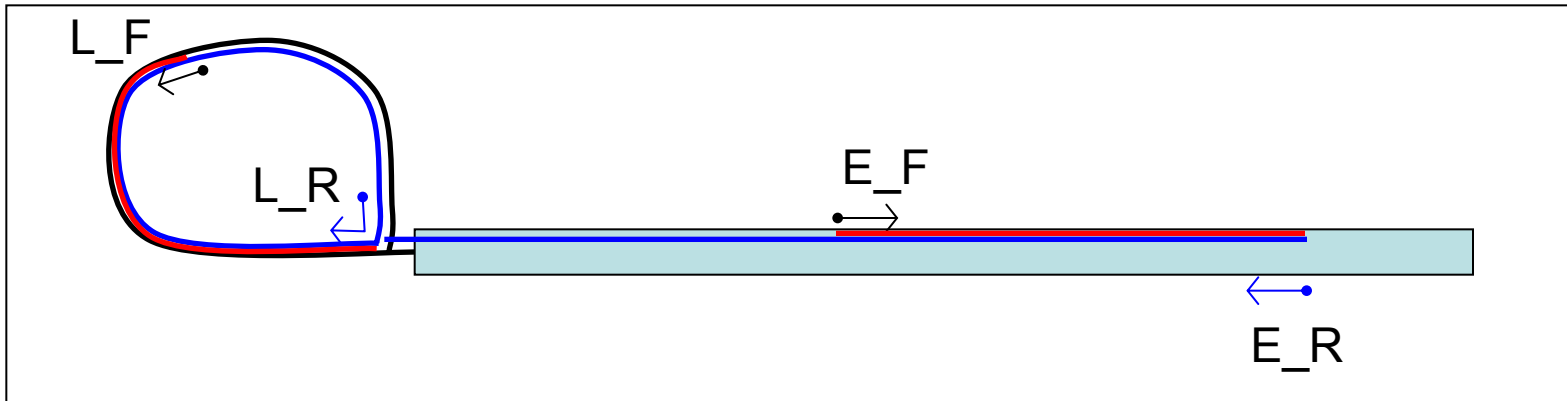
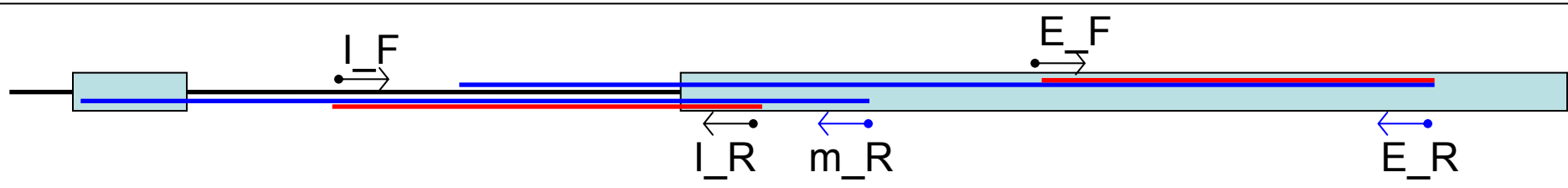
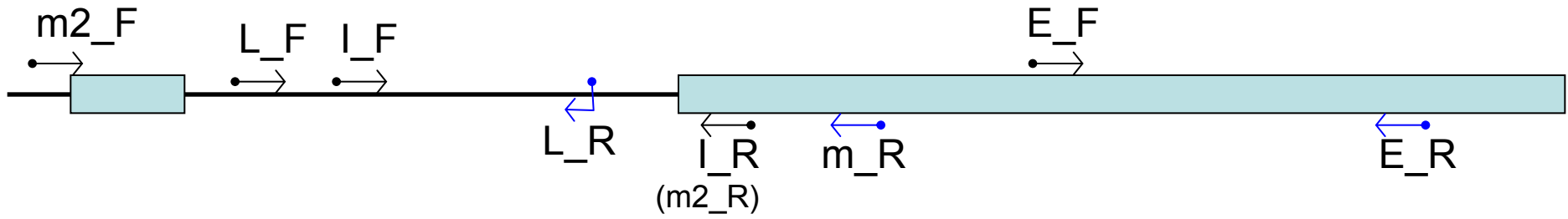


Przykłady zastosowania w badaniu ekspresji genów



Actin QPCR

Za: David Barras



Należy trzymać się standardów!!!

Clinical Chemistry 55:4
611–622 (2009)

Special Report

The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemans,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

<http://www.gene-quantification.de/miqe.html>

Methods 50 (2010) 51–55

Contents lists available at ScienceDirect

 **Methods** 

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth

Mini-review

A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines ^{☆,☆☆}

Sean Taylor, Michael Wakem, Greg Dijkman, Marwan Alsarraj, Marie Nguyen *

☆-☆☆ Submissions, Inc., Amsterdam, NL 10547, USA



Optymalizacja reakcji qPCR

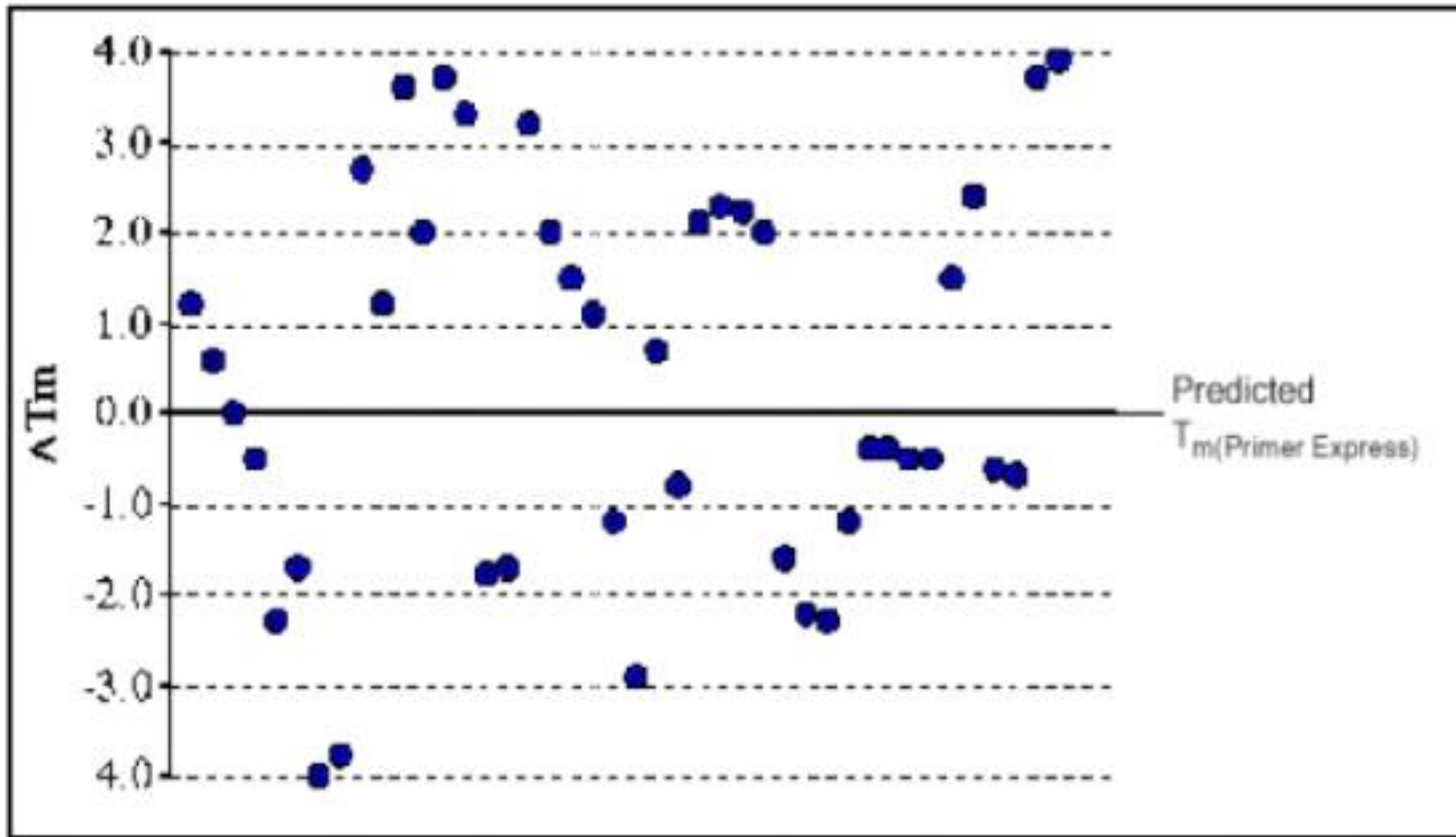


Optymalizacja reakcji qPCR

- Optymalizacja warunków reakcji: stężenie dNTP, Mg^{2+} , starterów, SYBR Green – obecnie trudna bo większość „mix’ów” jest „gotowa do użycia” i 2X stężona.
- Optymalizacja programu: **temperatury** i czasu przyłączania starterów i syntezy.
- PCR **4-stopniowy** (pomiar fluorescencji SYBR Green pow. T_m dla produktu) lub **2-stopniowy** (tylko 95 i 72°C – wspólna temp. przyłączania starterów i syntezy)
- PCR „**touch-down**”, Taq Pol typu „**hot-start**”
- Najszybciej optymalizować przez **przeprojektowanie oligonukleotodów**



RÓŻNICA T_m STARTERÓW: PRZEWIDZIANA A WYZNACZONA DOŚWIADCZALNIE



Source: ABI User Bulletin 6 ABI PRISM® Sequence Detection System

TATAA Biocenter

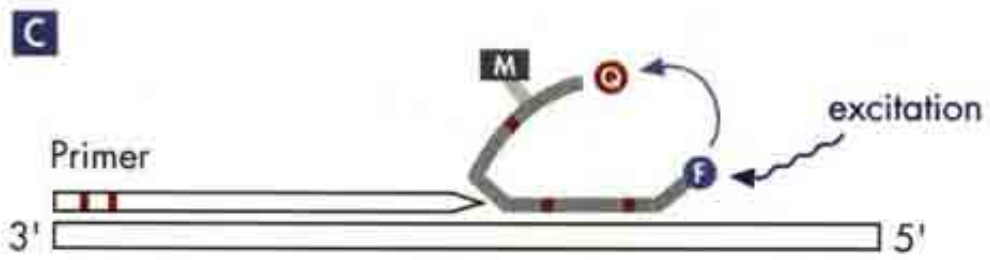
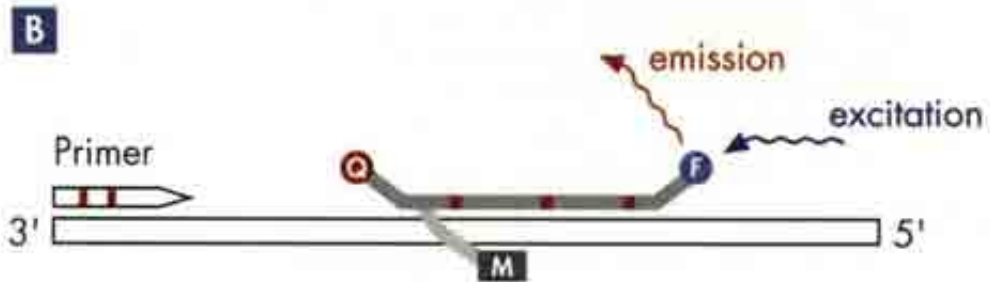
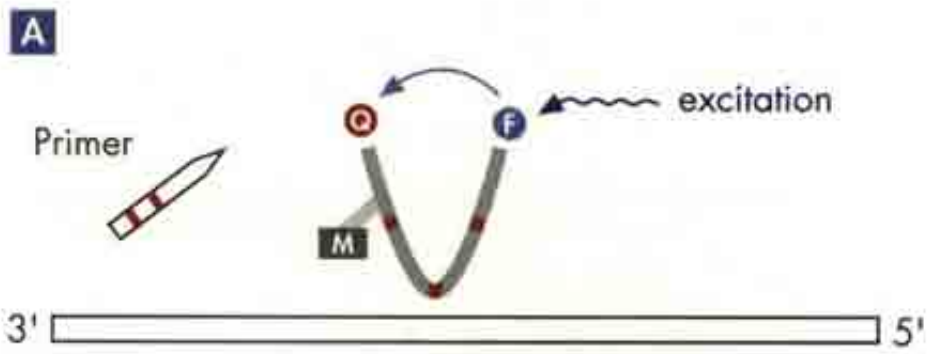
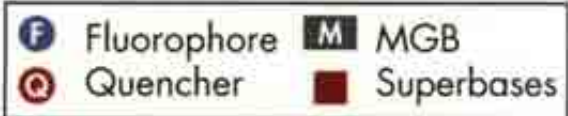


Ciekawostki qPCR



Sondy QuantiProbe™

MGB (Minor Groove Binder) – tripeptyd zwiększający siłę wiązania, stabilność i zapobiegający hydrolizie sondy



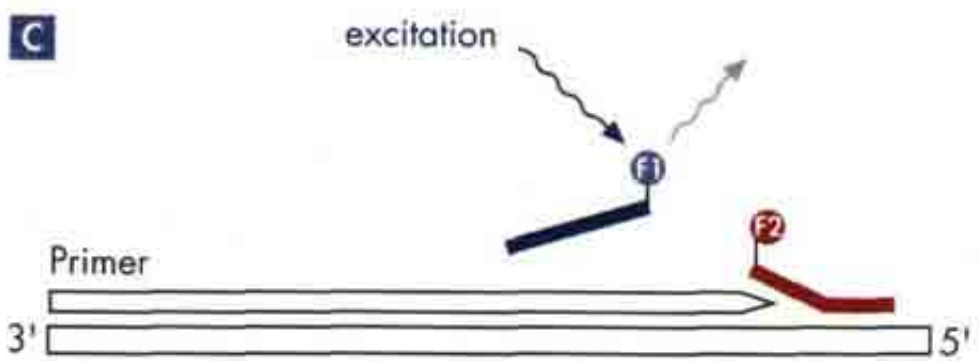
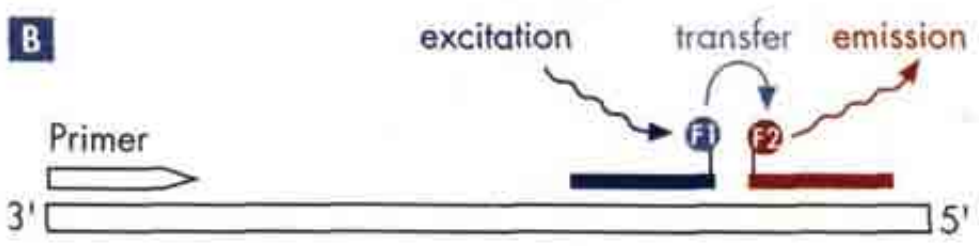
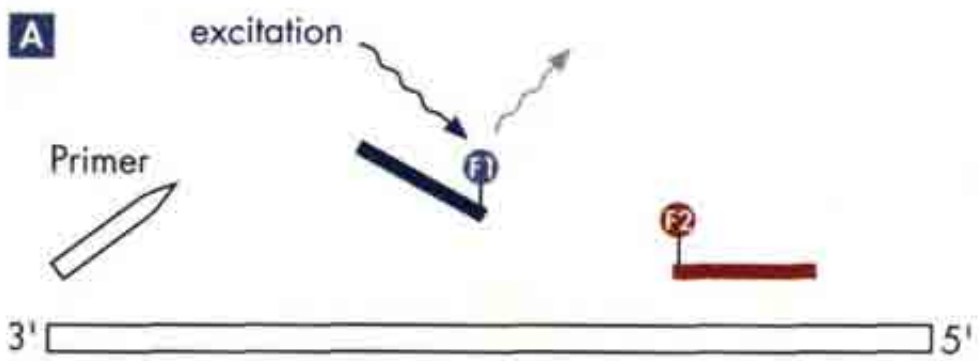
QIAGEN



Sondy FRET

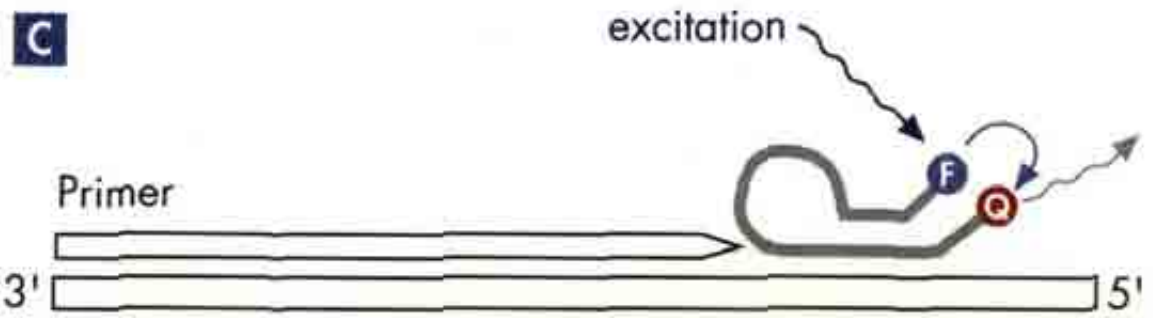
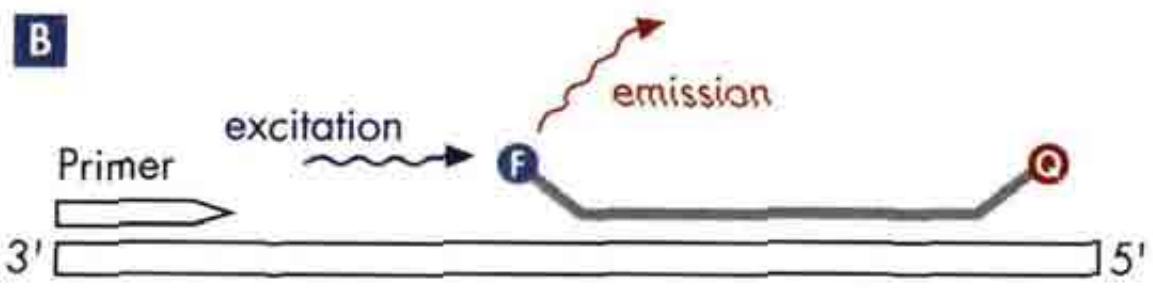
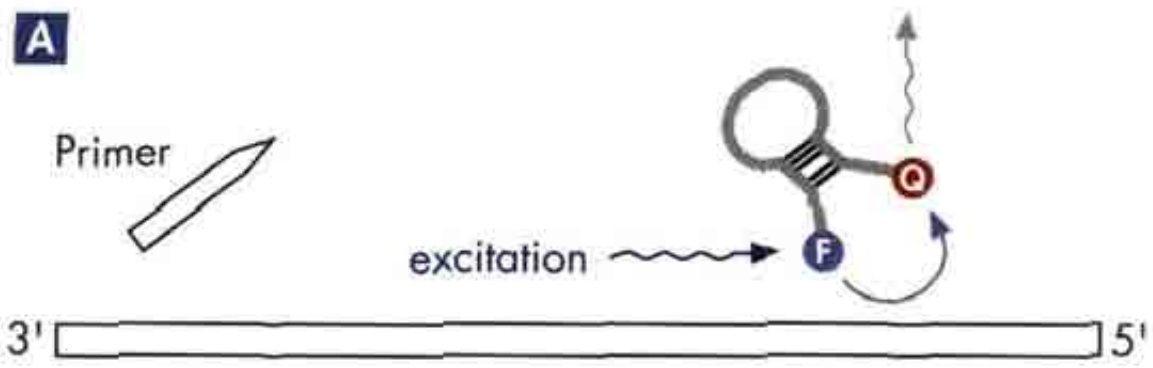
FRET:
ang. „fluorescence
resonance energy
transfer“

F1 Fluorophore (donor) F2 Fluorophore (acceptor)

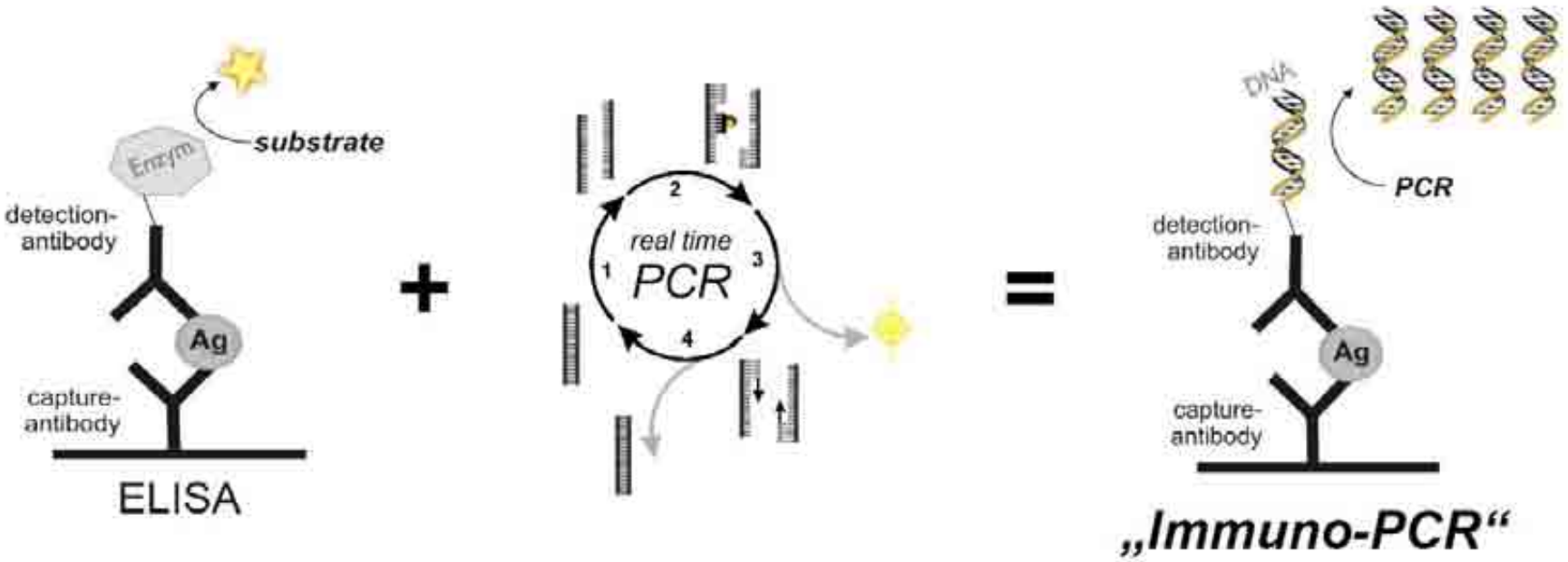


Sondy Molecular Beacon

F Fluorophore **Q** Quencher



Immuno-qPCR



T. Sano, C.L. Smith, C.R. Cantor, *Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates*, Science 258 (1992), 120-122

Za: M. Niemeyer; qPCR 2007



qPCR z zawartości pojedynczej komórki

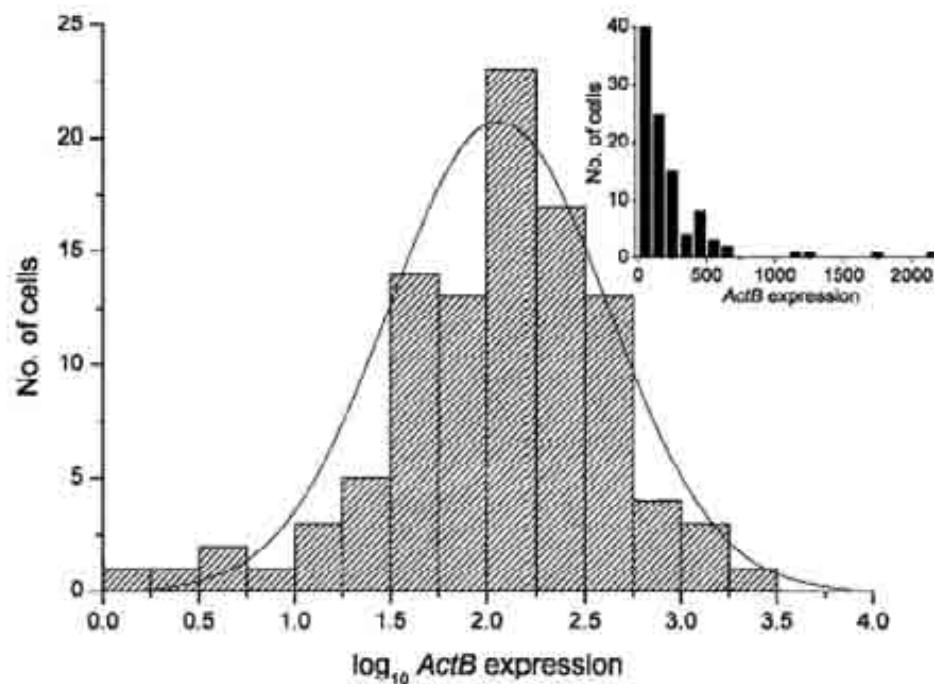
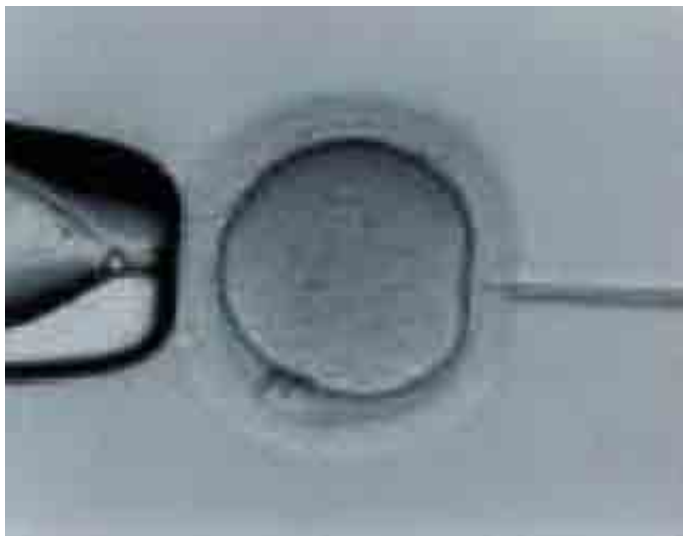
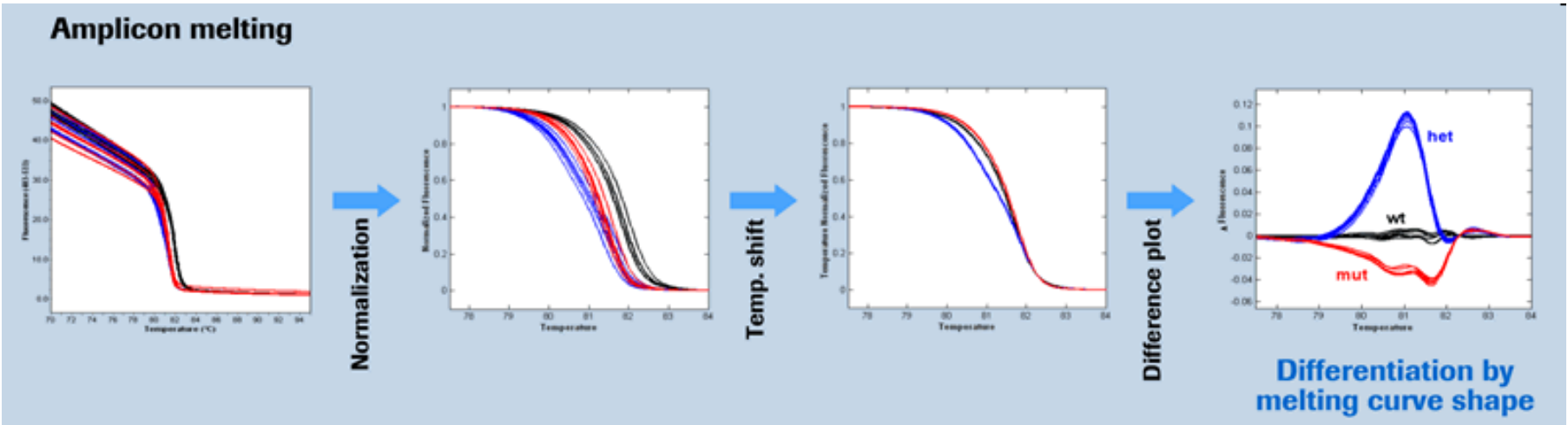


Figure 1. Histograms showing the expression levels of 96 cells expressing *ActB* in logarithmic and linear scale (*inset*). Logarithms of transcript levels are mean-centered for the two glucose concentrations. Solid line describes lognormal distribution centered on the geometric mean (2.06) of the *ActB* expression levels. *Inset* shows histogram of the expression levels in linear scale.

Bengtsson M, Stahlberg A, Rorsman P, Kubista M. *Genome Res.* 2005 Oct;15(10):1388-92.



Analiza wysokorozdzielczych krzywych topnienia



Za Roche

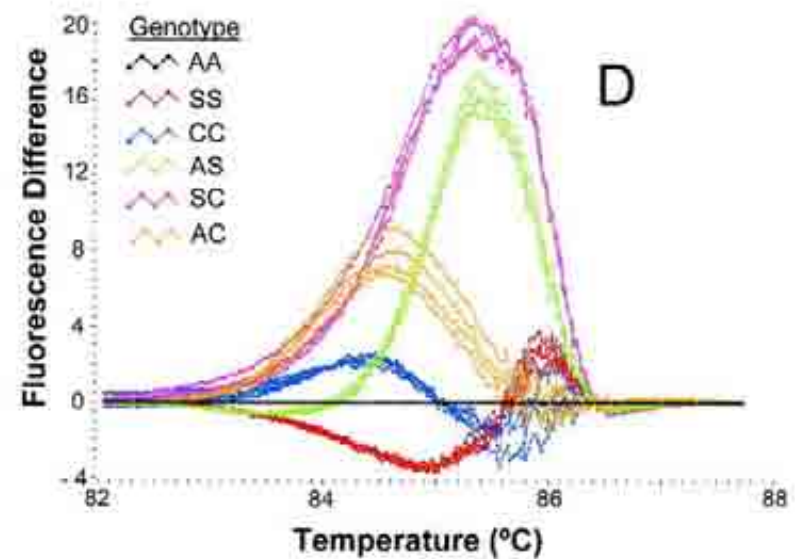
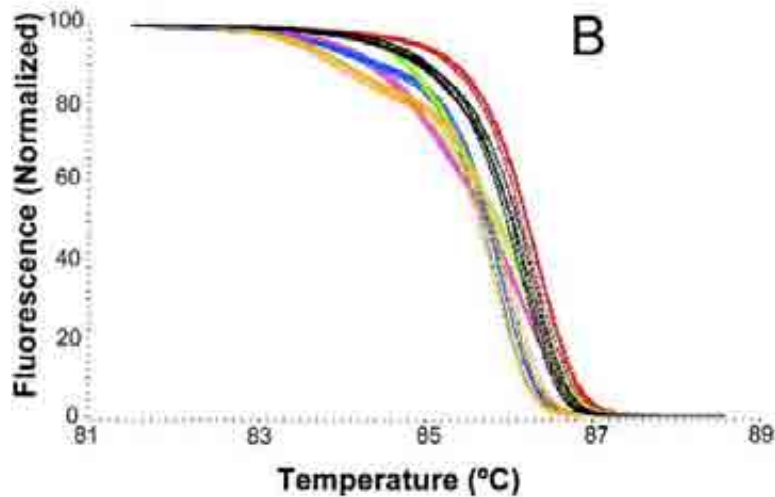
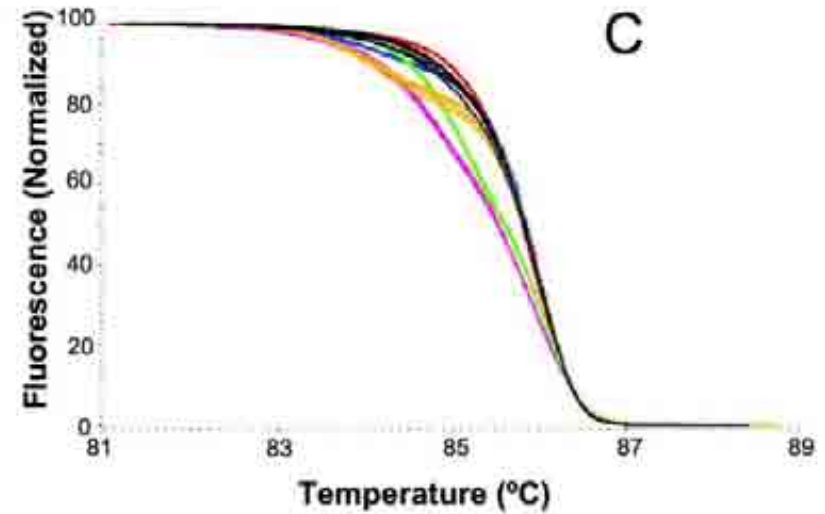
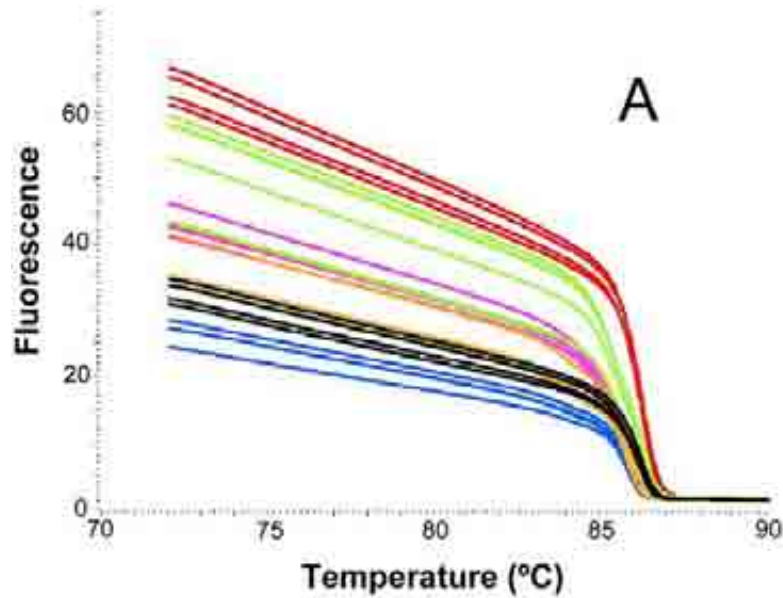


Analiza HRM = High Resolution Melting

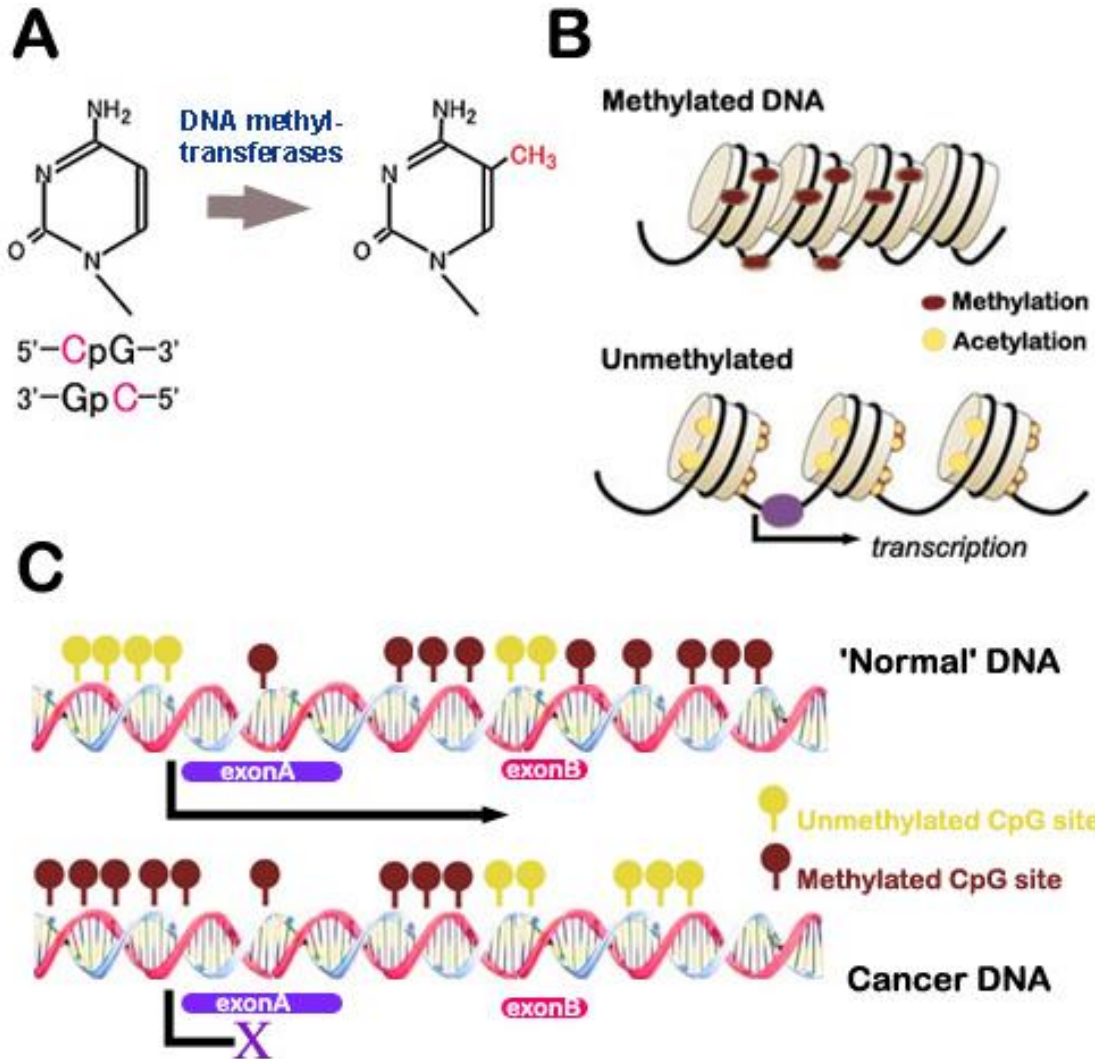
- Zamiast SYBR Green barwniki **SATURUJĄCE DNA!!!**
- Rozdzielczość do 50 pomiarów / 1°C
- Amplikony różnej długości
- Wydajność nie ma znaczenia: **analiza end-point!**
- Standaryzacja stężeń matrycy mniej istotna



Analiza HRM = High Resolution Melting



Metylacja DNA wycisza transkrypcję

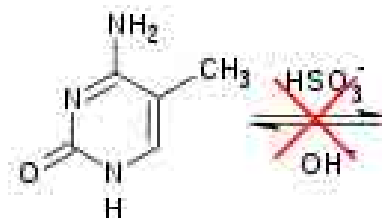
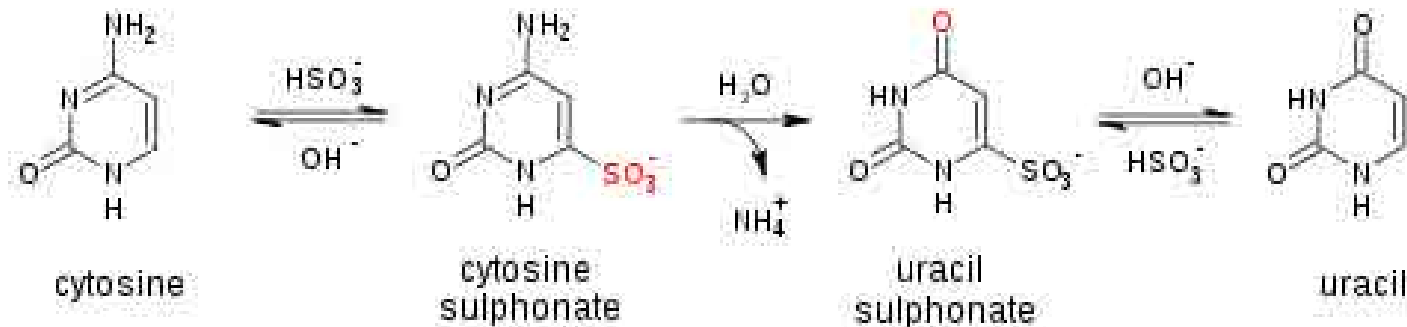


<http://philos.biol.mun.ca>



Traktowanie DNA dwusiarczkiem sodu

- Dwusiarczek sodu zmienia CYTOZYNE w URACYL
- Nie modyfikuje **metylowanej CYTOZYNY**



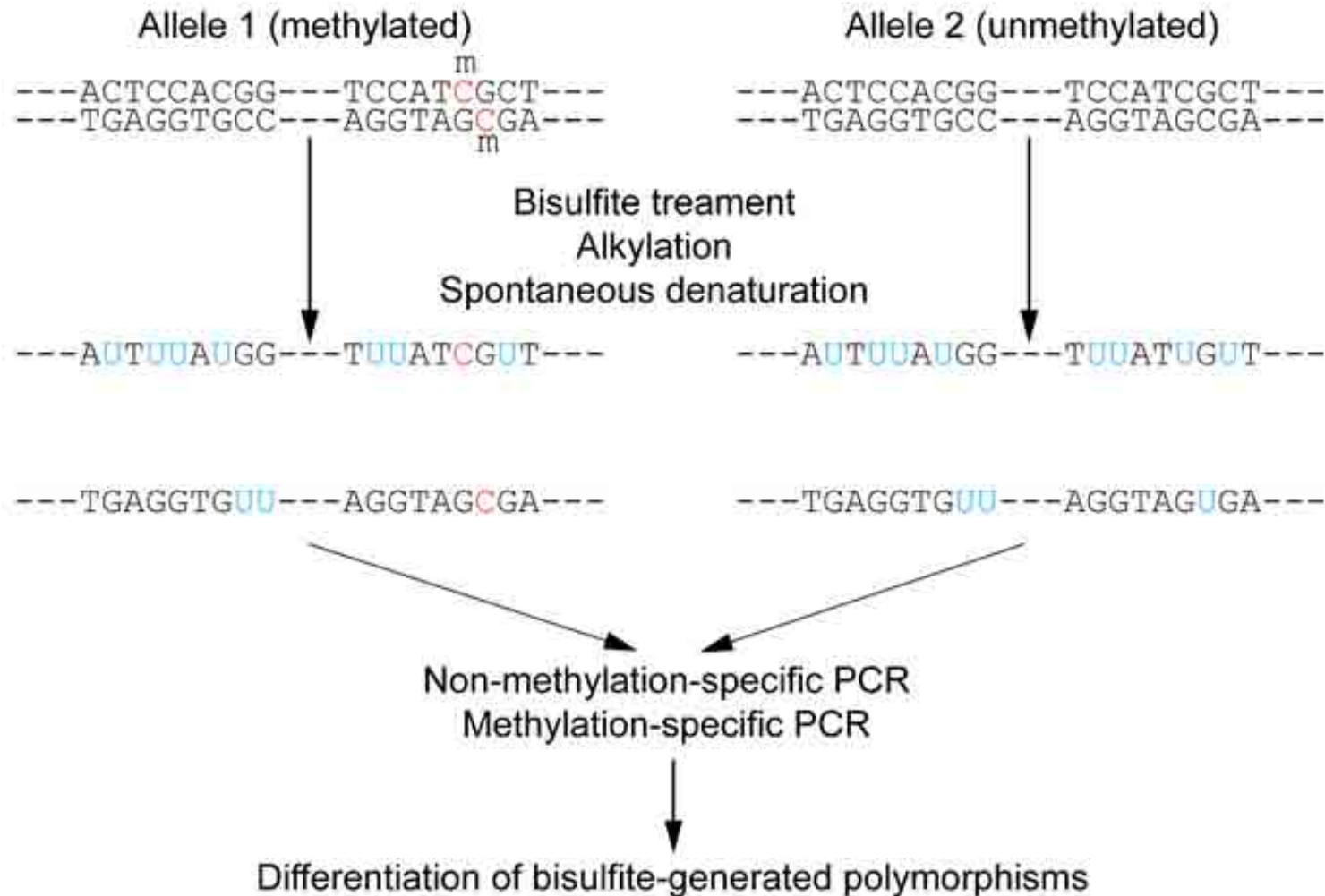
5-methylcytosine

Wady:

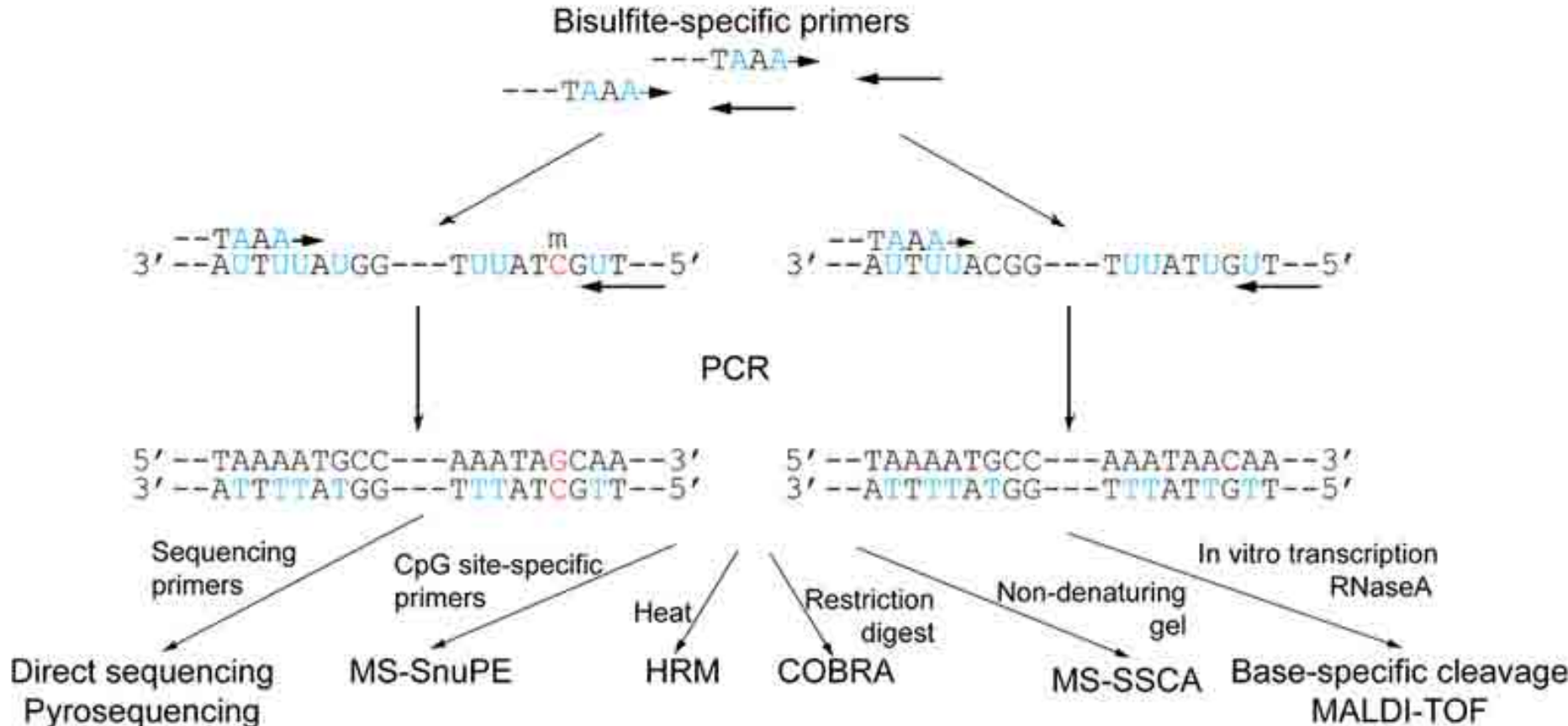
- niewydajna konwersja
- degradacja DNA



Traktowanie DNA dwusiarczkiem sodu



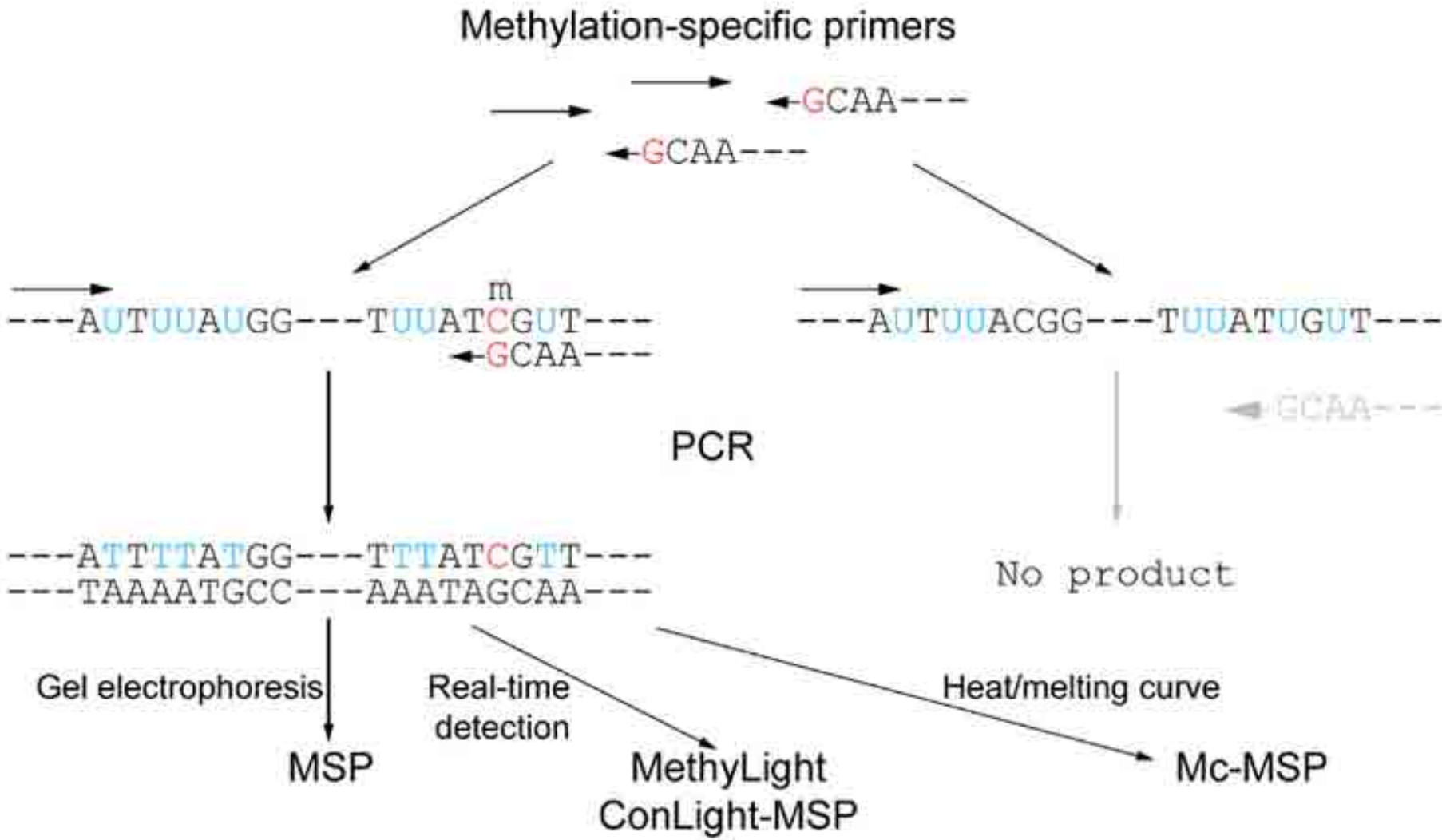
Analizy Met-DNA



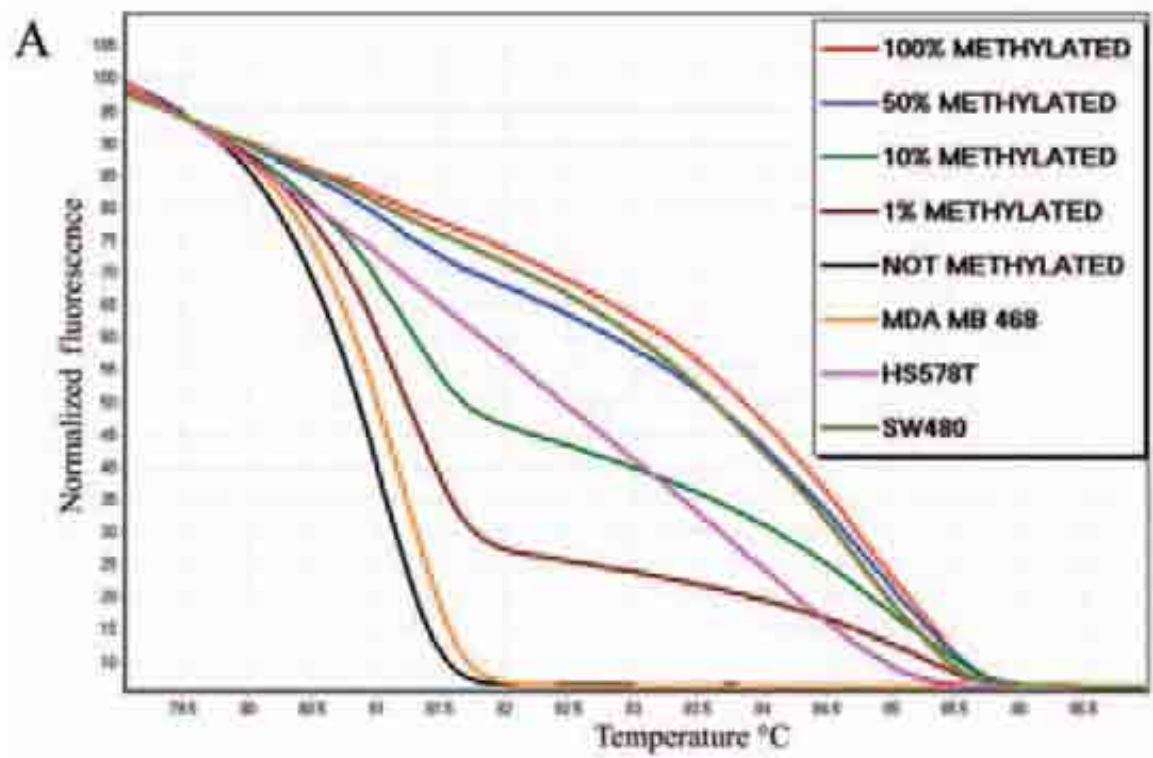
Za: Wikipedia, Bisulfite sequencing



Analizy Met-DNA



Analiza statusu metylacji za pomocą wysokorozdzielczych krzywych topnienia czyli MS-HRM



Published online 3 February 2007

Nature Article Research, 2007, Vol. 5, No. 8 1411
doi:10.1038/nprot0111

PROTOCOL

Methylation-sensitive high-resolution melting

Tomasz K. Wojdacz^{1,2}, Alexander Dobrovic² & Liset Lotte Hansen¹

Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation

Tomasz K. Wojdacz^{1,2} and Alexander Dobrovic^{1,2,*}

*Institute of Human Genetics, University of Aarhus, The Bartholin Building, Artillerivej 5, DK-8000, Aarhus, Denmark; Department of Pathology, Peter MacCallum Cancer Centre, Level 4, 374 Collyer Quay, Victoria 3006, Australia. Correspondence should be addressed to T.K.W. (t.wojdacz@hug.au.dk).





www.Gene-Quantification.info

The Reference in qPCR - Academic & Industrial Information Platform

The Gene Quantification page describes and summarises all technical aspects involved in quantitative gene expression analysis using real-time qPCR & qRT-PCR. It presents a lot of [new and innovative qPCR applications](#), chemistries, methods, algorithms, [MIQE and QC strategies](#), cyclers, kits, dyes, analysis methods, events, and services involved. Commercial and academic institutions can present their qPCR tools right here on our [qPCR platform](#). Please browse our [page directory](#)



Google Search

www Gene-Quantification.info Page

NEWS & MIQE & APPs

[InfoPortal](#)

[qPCR & Webinars](#)

[Quantification strategy](#)

[Normalisation](#)

[Optimisation](#)

[Bioinformatics & Downloads](#)

[NEW download!](#)

[RNA interference](#)

[Events & eSeminars](#)

[qPCR Array & digital PCR](#)

[Cyclers & Robots](#)

[RNA & RT & RNA QC](#)

[Dyes & NRM dyes](#)

[Molecular Physiology](#)

[qPCR Efficiency](#)

[Chips & Lab-on-Chip](#)

[qPCR applications](#)

[qRT-PCR applications](#)

[Evolution / Online translation / \$\Delta\$ RTA portal / MIQE - press review ... \[UPDATE\]\(#\) / \[statistics\]\(#\)](#)

[Protocols / Methods / Databases / Alerts / Books / eBooks / Forums / \[qPCR groups\]\(#\)](#)

[real-time PCR / interesting reviews / TAJKa / Webinars / Podcast / MultiMedia](#)

[Quantification strategies in qRT-PCR: \[absolute Quantification\]\(#\) & \[relative Quantification\]\(#\)](#)

[RT-qPCR normalisation strategies & microRNA - Genom - BestKeeper - RefGenes **NEW**](#)

[Optimisation of reaction setup & qPCR procedure / MIQE / Primer-Resources & Algorithms](#)

[data analysis \[eBase\]\(#\) qPCR algorithms clustering qPCR statistics \[LinRegPCR\]\(#\)](#)

[BEST ... \[main page\]\(#\) \[BEST - 2009\]\(#\) \[RefGenes\]\(#\) \[GenEx 5.3.4\]\(#\) ...**NEW VERSION**](#)

[siRNA \[saRNA\]\(#\) \[miRNA\]\(#\) & \[microRNA normalisation relation **NEW**\]\(#\)](#)

[eConference \[SHARE\]\(#\) \[EBC\]\(#\) qPCR 2010 qPCR 2011 in PRAGUE \[qPCR 2011\]\(#\)](#)

[qPCR array applications, data analysis & normalisation, analysis software digital PCR](#)

[real-time PCR hardware: \[Cyclers\]\(#\) ... \[UPDATE\]\(#\) / \[qPCR robots\]\(#\)](#)

[reverse transcription / \[miRNA transcript analysis\]\(#\) / \[RNA QC & RNA / DNA integrity\]\(#\)](#)

[detection dyes, probes, and chemistries in real-time PCR / \[IRM dyes\]\(#\)](#)

[CMA HSM CMV microRNA siRNA saRNA RNAi digital PCR single-cell qPCR](#)

[determination of real-time qPCR efficiency by various methods ... \[new papers!\]\(#\)](#)

[verification of qRT-PCR via cDNA array and microarray \[Lab-on-Chip PCR\]\(#\) & \[qPCR\]\(#\)](#)

[circulating nucleic acids = \[CNA\]\(#\) single-cell handling single-cell qPCR HSM digital PCR](#)

[microRNA Copy Number Variants RNA interference siRNA small activating RNA \(saRNA\)](#)

Find your genes at GeneGlobe

Take a closer look

Working with you to meet your goals

- Position for quality
- Commitment to innovation
- Exceptional support

eurofins [inwiqiprotein](#)

Get high quality qPCR probes >

Lonza StellARray™

Superior assay performance with custom qPCR probes

BIO-RAD

AB applied biosystems™

qPCR News

powered by: [www.Gene-Quantification.info](#)

Gene Quantification Newsletter is sponsored by

qPCR platform participating companies:

qPCR platform participating companies in alphabetical order

Roche

Eurogentec

[Roche Applied Science.gene.quantification.info](#)

Roche Applied Science - PCR Workflow System
Speed up your workflow to spend less time pipetting and more time advancing your research

[Eurogentec.gene.quantification.info](#)

Eurogentec - Your one-stop-shop Real-Time PCR supplier



PODSUMOWANIE

- **qPCR to bardzo wydajna, szybka i dokładna metoda kwantyfikacji kwasów nukleinowych**
- **Umożliwia nisko i średnioprzepustowe badania ekspresji genów**
- **Oparta o detekcje DNA barwnikami fluorescencyjnymi w czasie rzeczywistym reakcji**
- **$(1+E)^n$, czyli 2^n jeżeli $E=100\%$ ($2^{\Delta\Delta Ct}$)**
- **Bardzo istotna kontrola jakości wykonania i poprawne zaprojektowanie eksperymentu!!!**



Dziękuję za uwagę

