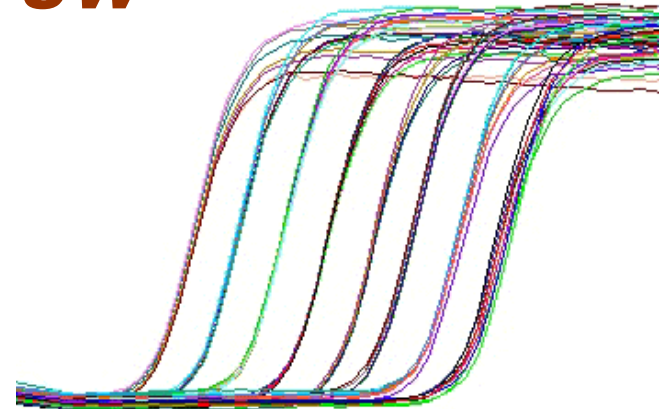


PCR w czasie rzeczywistym *(Real Time PCR)*

czyli

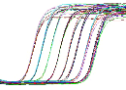
qPCR (PCR ilościowy) *(Quantitative PCR)*

Michał Koper, IGiB UW



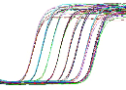
Pionierskie prace o qPCR (zwanym także kinetycznym PCR)

- 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.



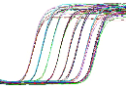
Zastosowania qPCR:

- 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 wzбудzającego**: lampa halogenowa, układ LED lub laser
- Wymaga **układu detekcji**: oddzielne elementy CCD, matryca CCD lub układy fotopowielacza



Przykłady cyklerów qPCR



Roche LightCycler 480



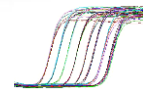
QIAGEN Rotor-Gene Q



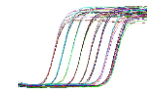
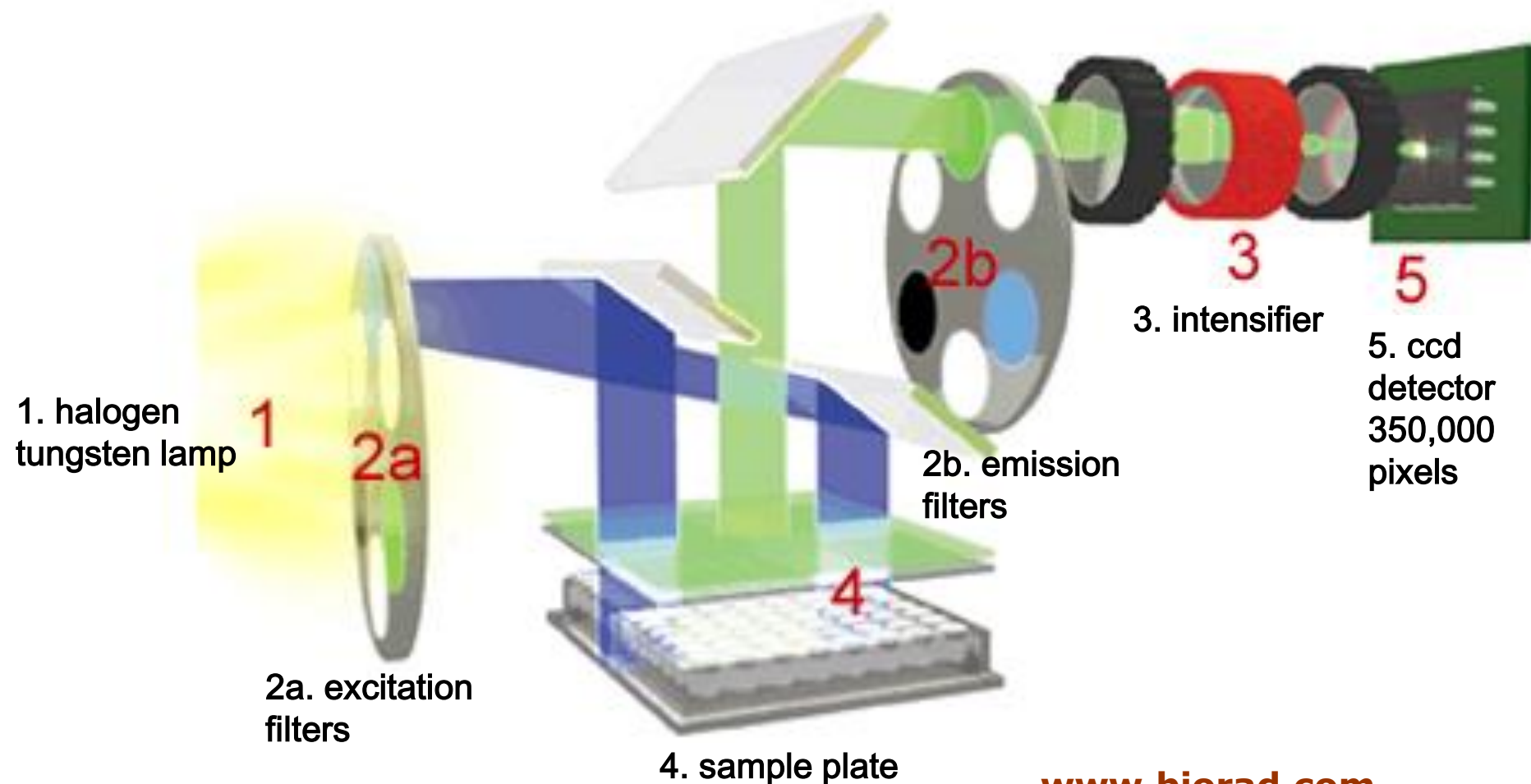
**BioRad
CFX96/
CFX384**



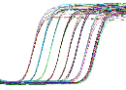
Appliedbiosystems 7900HT



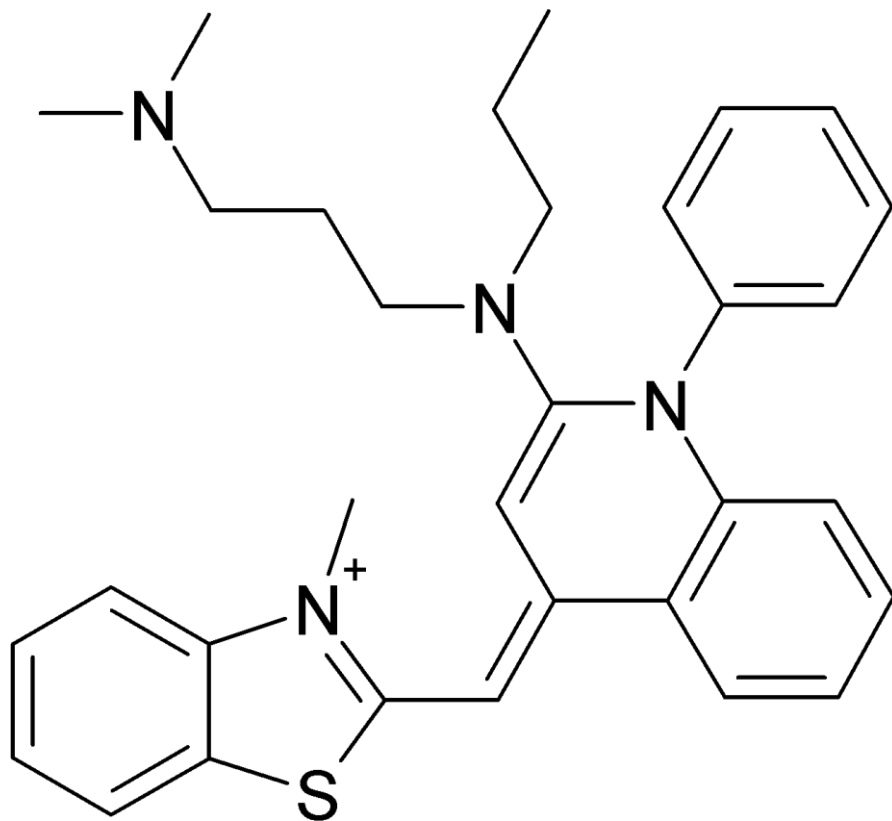
Schemat aparatu qPCR



Sposoby detekcji produktów w qPCR

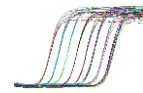


Barwniki wiążące DNA: **SYBR Green**

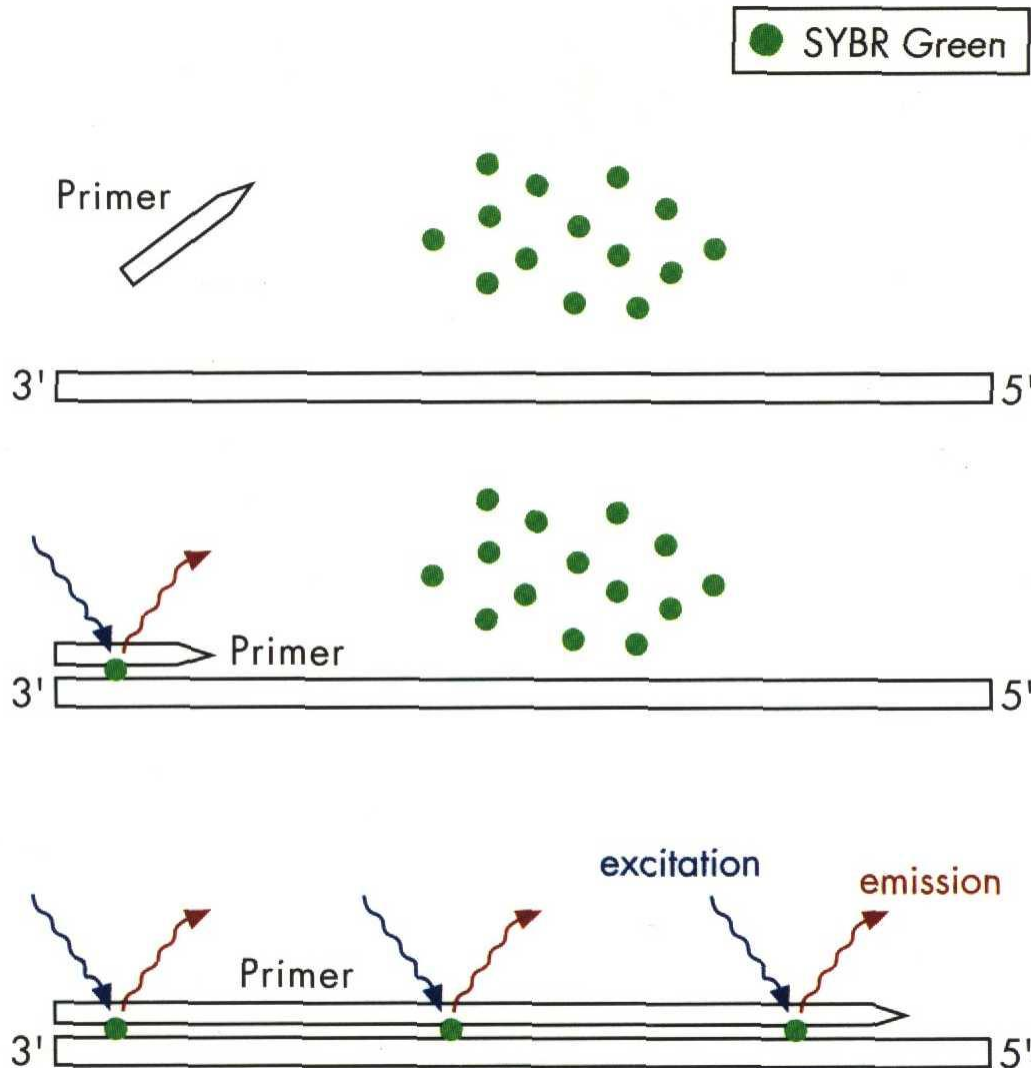


SYBR Green I, za: Wikipedia

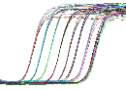
- Należy do barwników **cyjaninowych** (zawierających pierścienie heterocykliczne z wiązaniami $-C=$)
- Wiąże **dsDNA**, słabo ssDNA
- Wzbudzany światłem niebieskim ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$)
- Emituje światło zielone ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$)



SYBR Green

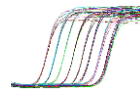


- Wykrywa wszelkie **dsDNA**
- Wykrywanie na etapie **ELONGACJI**
- Startery nie mogą tworzyć **DIMERÓW**
- Wielkość produktu najlepiej w przedziale **100-200bp**
- Wielkość wykrywanych produktów dla różnych genów musi być **BARDZO ZBLIŻONA**
- Umożliwia analizę **KRZYWYCH TOPNIENIA**
- Metoda **NAJTAŃSZA**

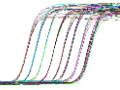


Projektowanie starterów do qPCR

- 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%**
- **$T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$**
- Stosować przynajmniej **2 programy** i porównywać wyniki!!!



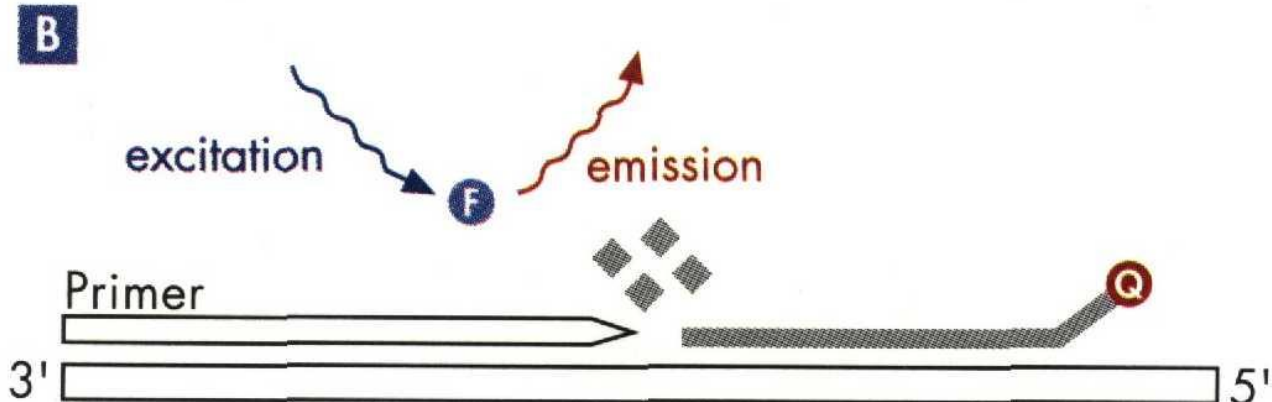
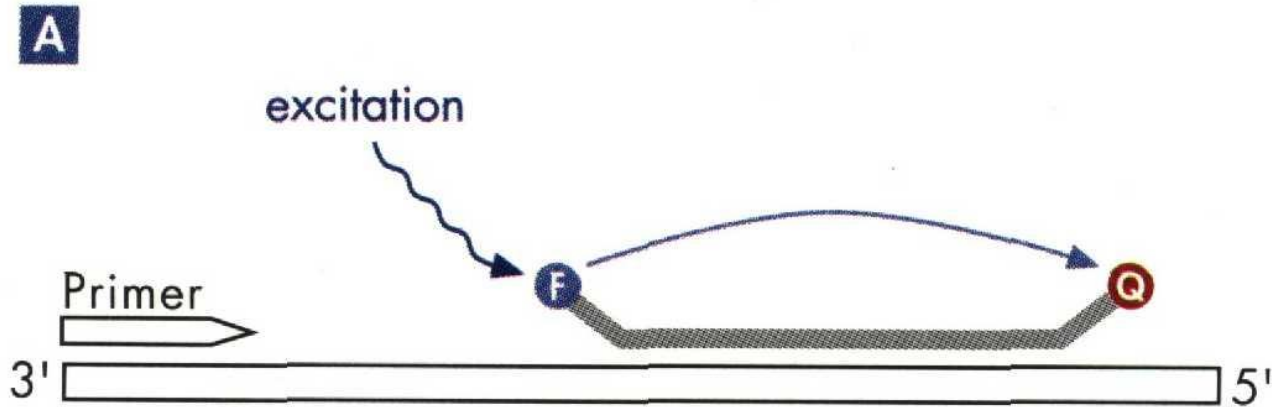
Sondy hybrydyzacyjne



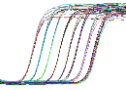
Sondy TaqMan - hydrolizowane

DNA Pol Exo⁺!!!

F Fluorophore **Q** Quencher
◆ Cleaved nucleotides

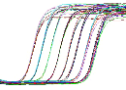


ABI, Roche (UPL)

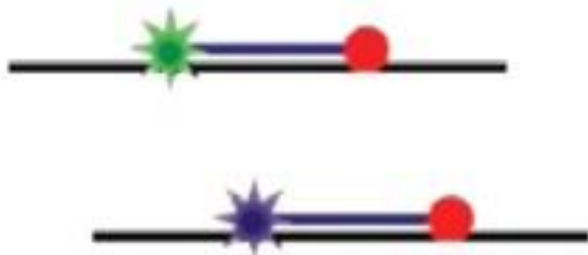
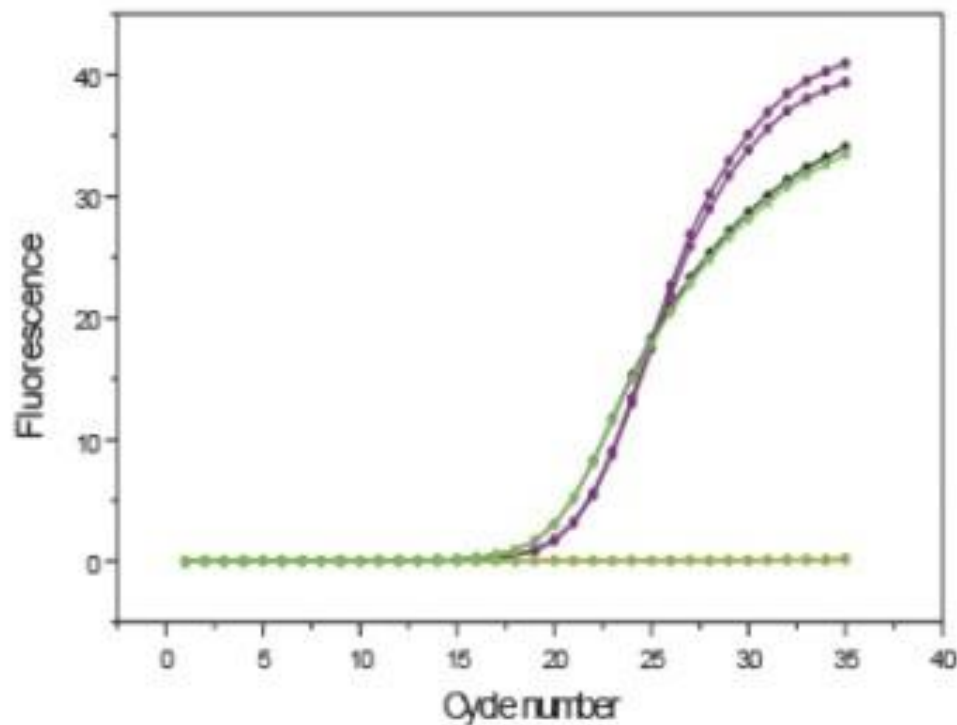
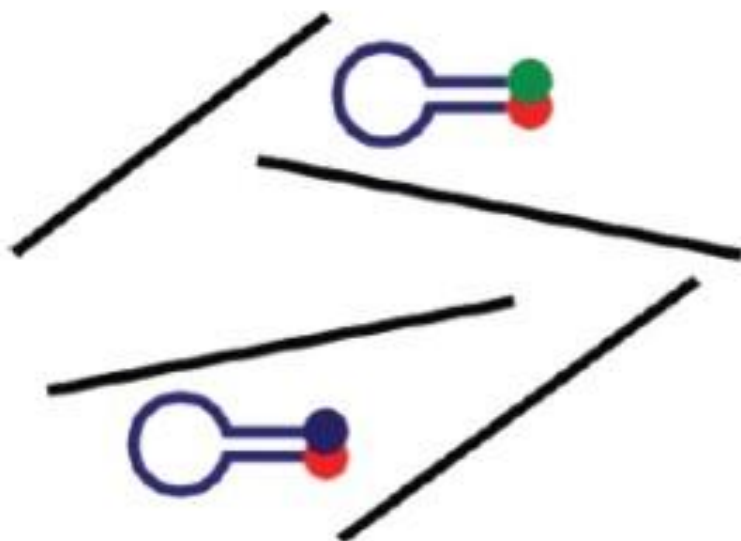


Zasady projektowania sond TaqMan

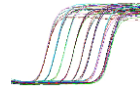
- Krótkie ampkikony: **70-150 bp**
- **T_m sondy = 68-70°C**
- Zawartość GC **30-60%**
- Nigdy **G na 5' końcu**, (naturalny wygaszacz)
- Długość sond **maks. 30 nt**
- Unikać ciągów identycznych zasad
- Unikać struktur II-rzędowych
- Unikać komplementarności ze starterami
- Wybierać nic z większą zawartością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



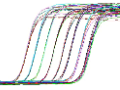
Złożony qPCR (ang. „multiplex”)



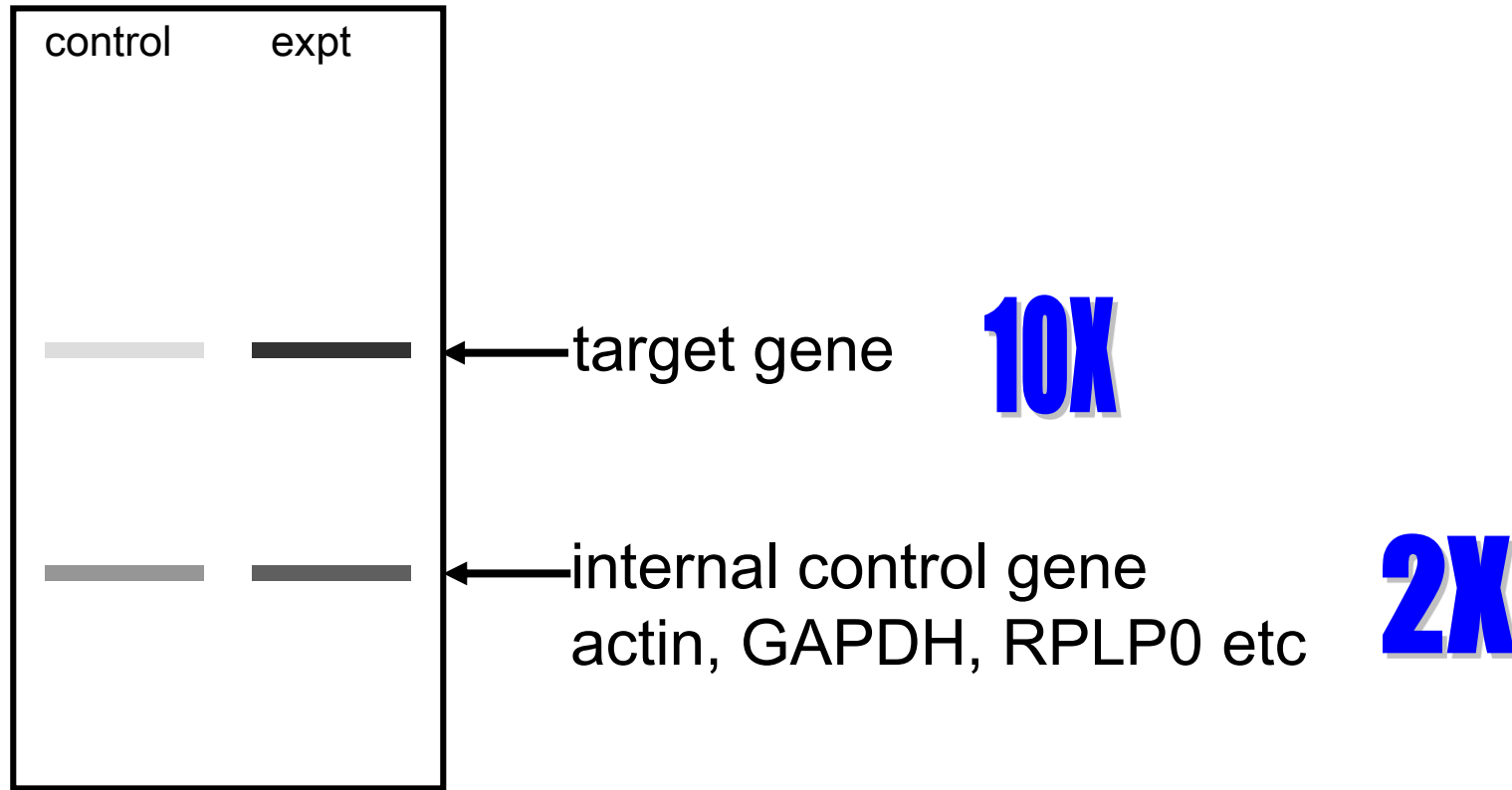
Różne formaty detekcji i różne barwniki pozwalają na **wykrywanie więcej jak 1 produktu w pojedynczej reakcji** (po za SYBR Green!!!)



Określanie ilości RNA

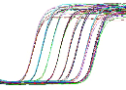


Klasyczna technika northern-blot

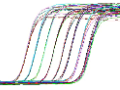


$$\text{Corrected fold increase} = 10/2 = 5$$

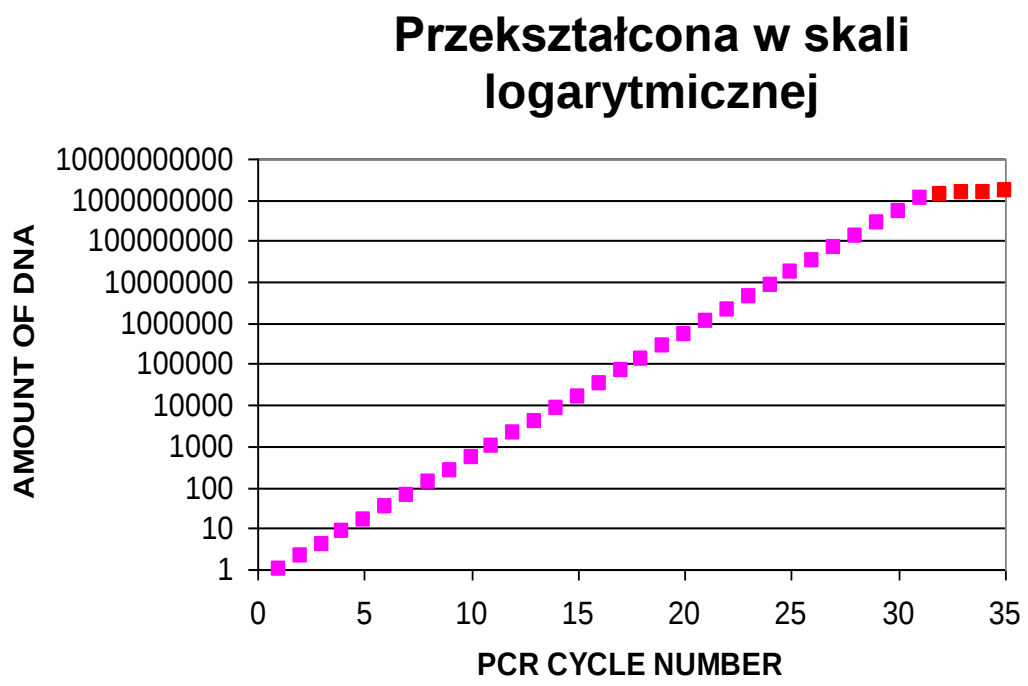
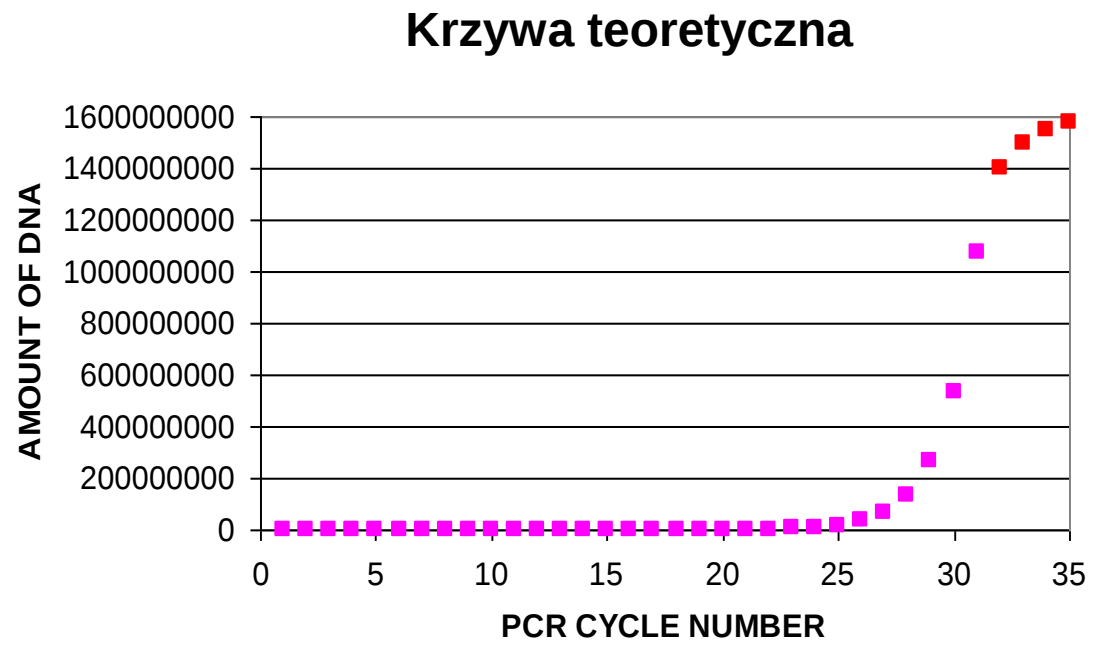
$$\text{Ratio target gene in experimental/control} = \frac{\text{fold change in target gene}}{\text{fold change in reference gene}}$$



Teoretyczne podstawy qPCR



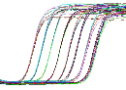
CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29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

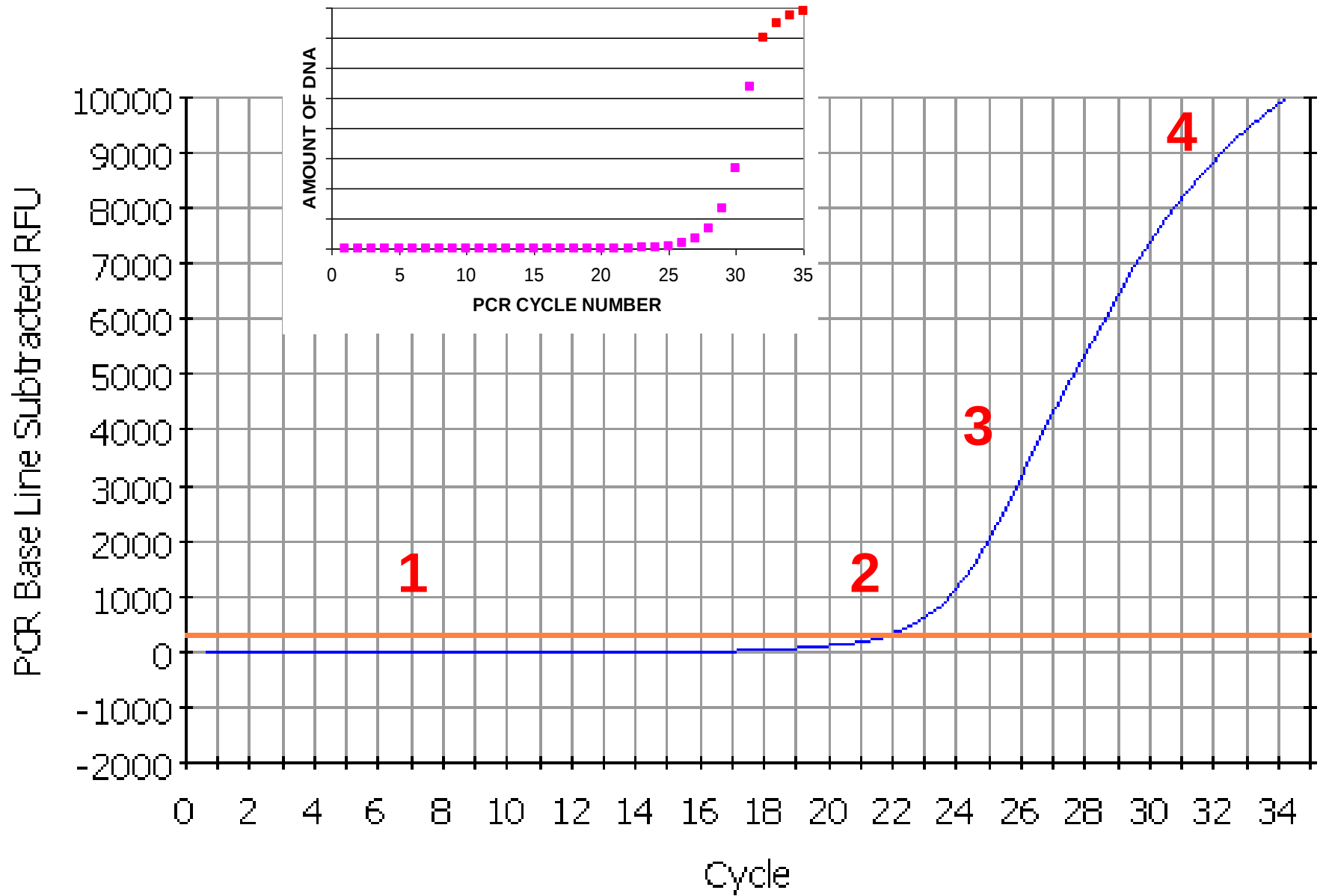


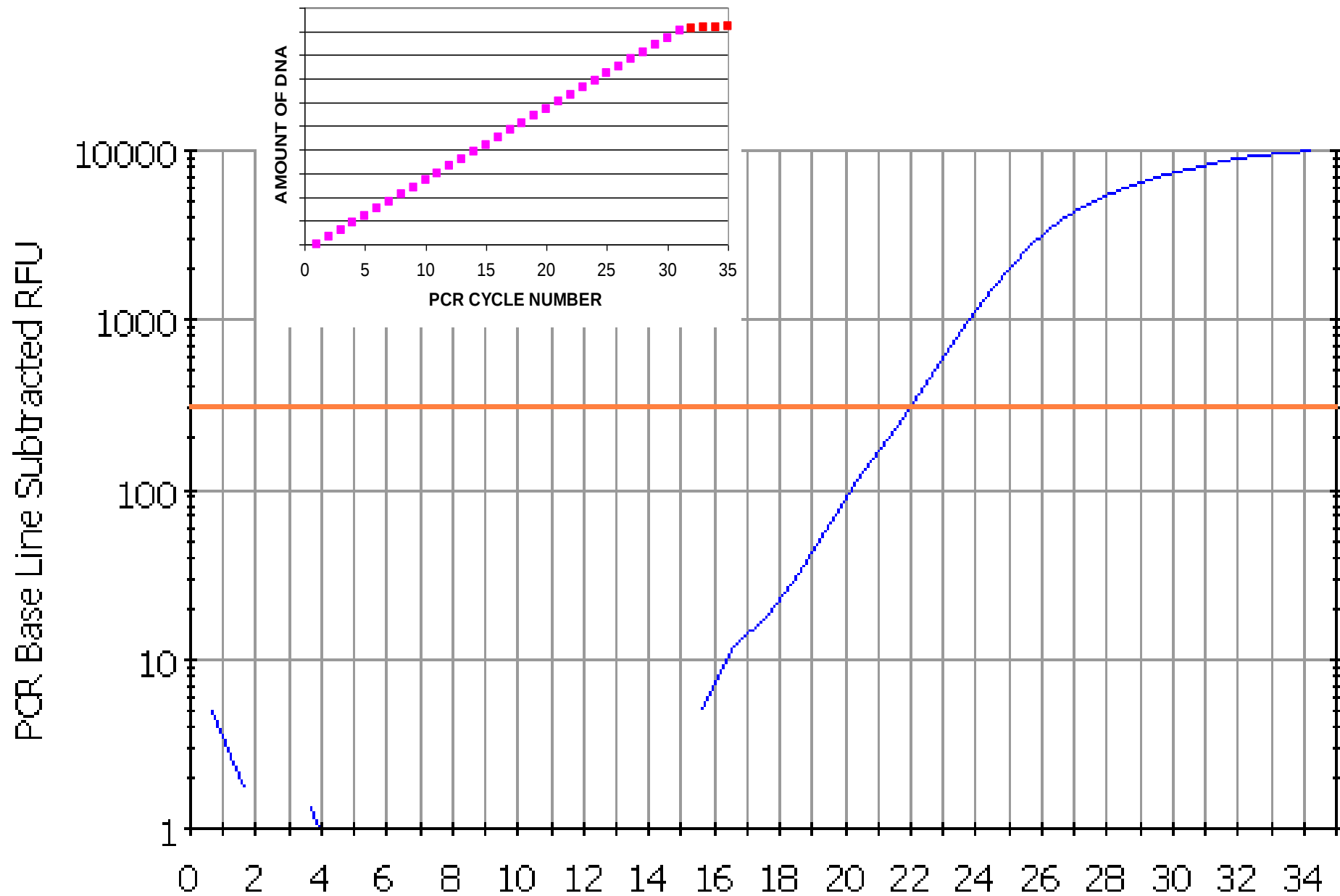
4 fazy reakcji qPCR

- **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

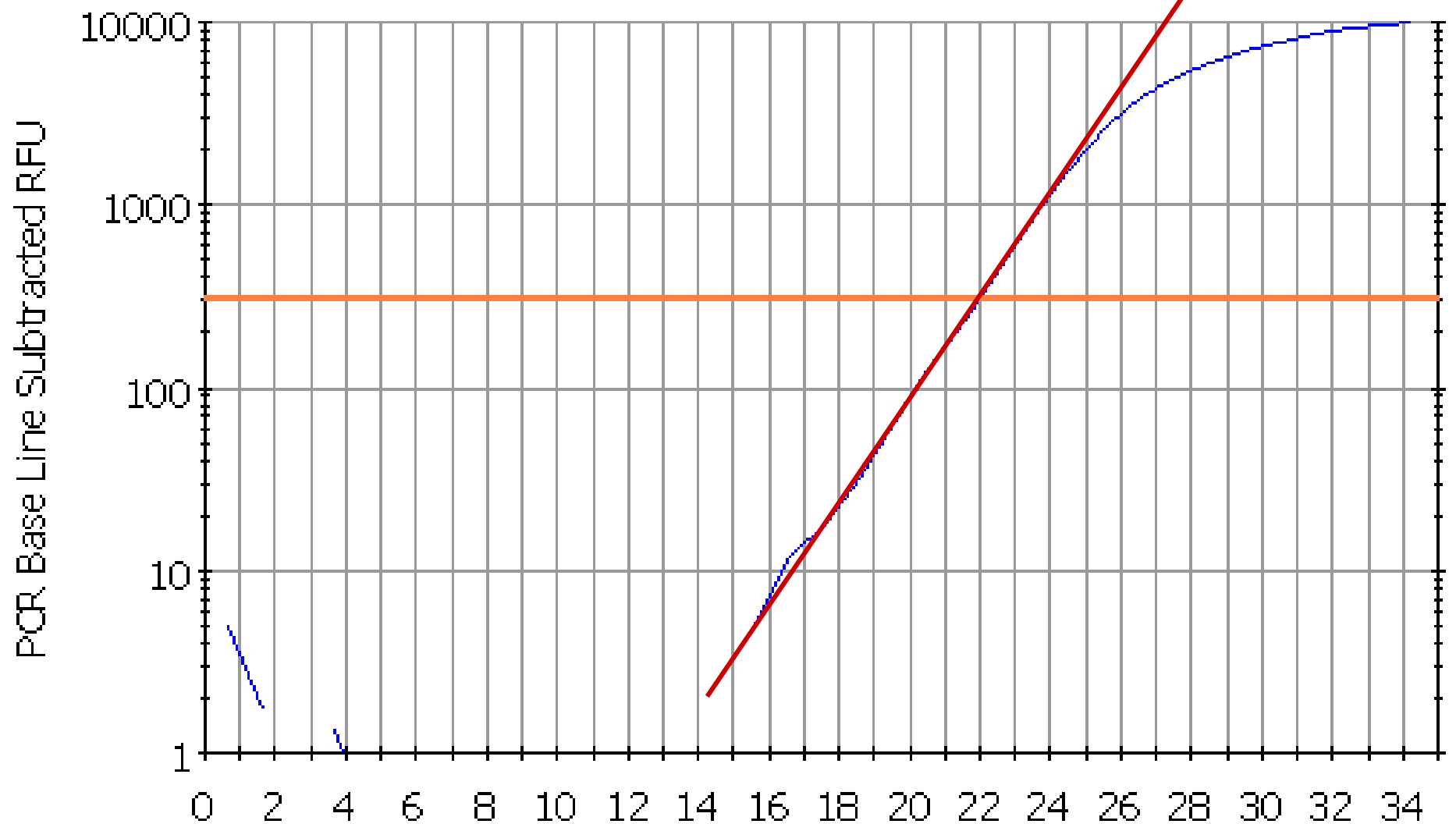
M. W. Pfaffl: *Quantification strategies in real-time PCR* w *A-Z of quantitative PCR* (Edytor: S.A. Bustin)



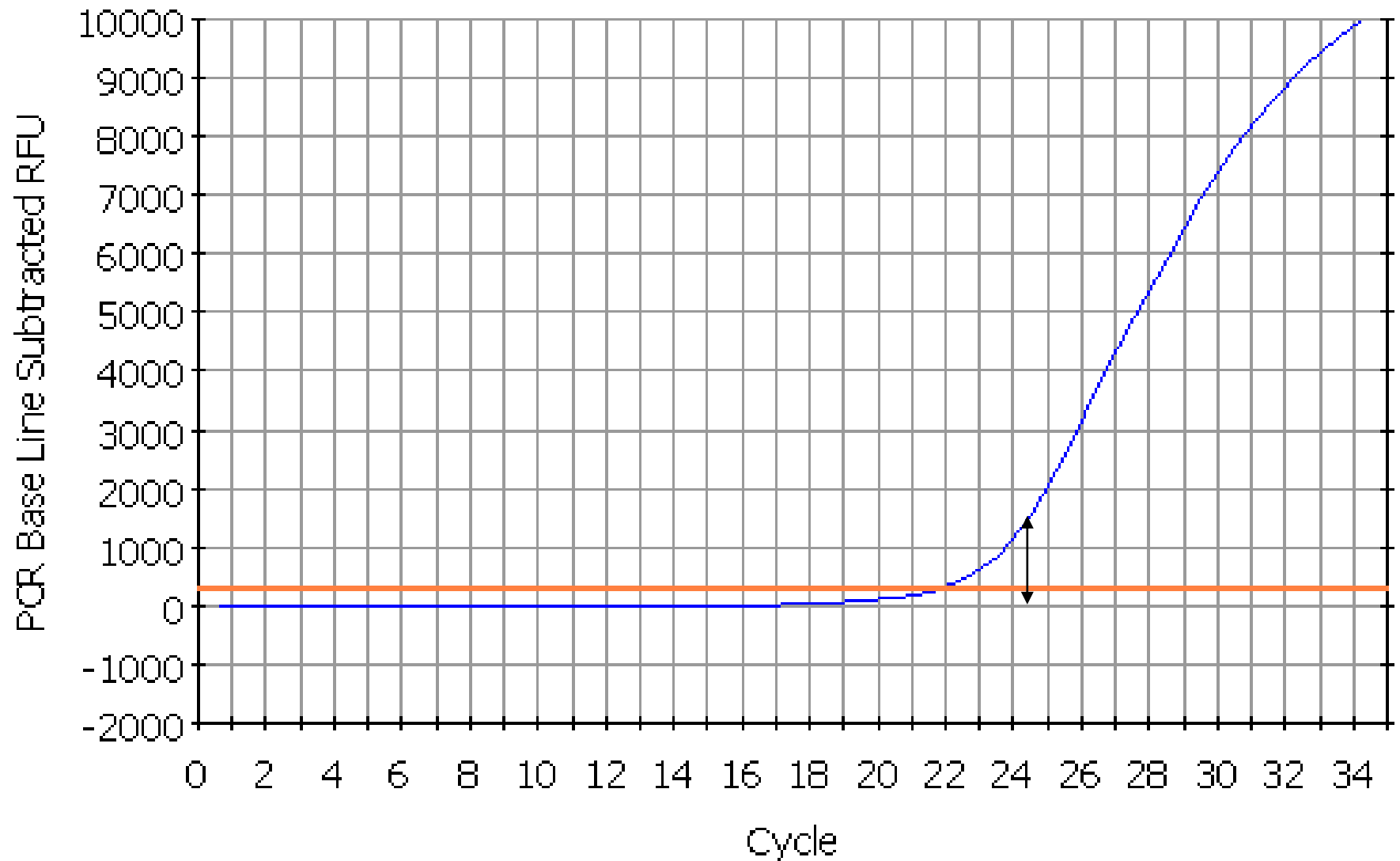


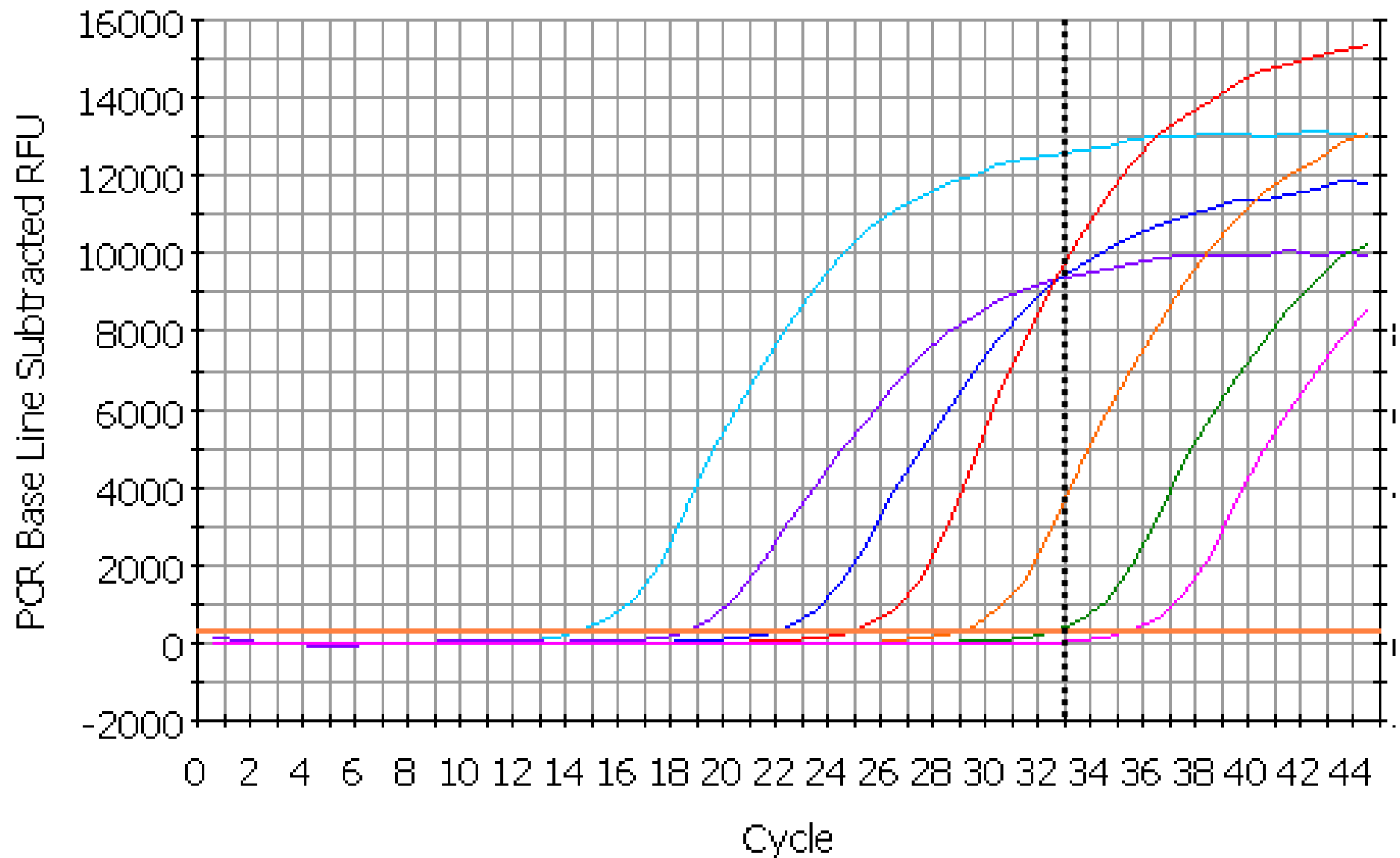


Reakcja liniowa w przedziale ~ 20 do ~ 1500

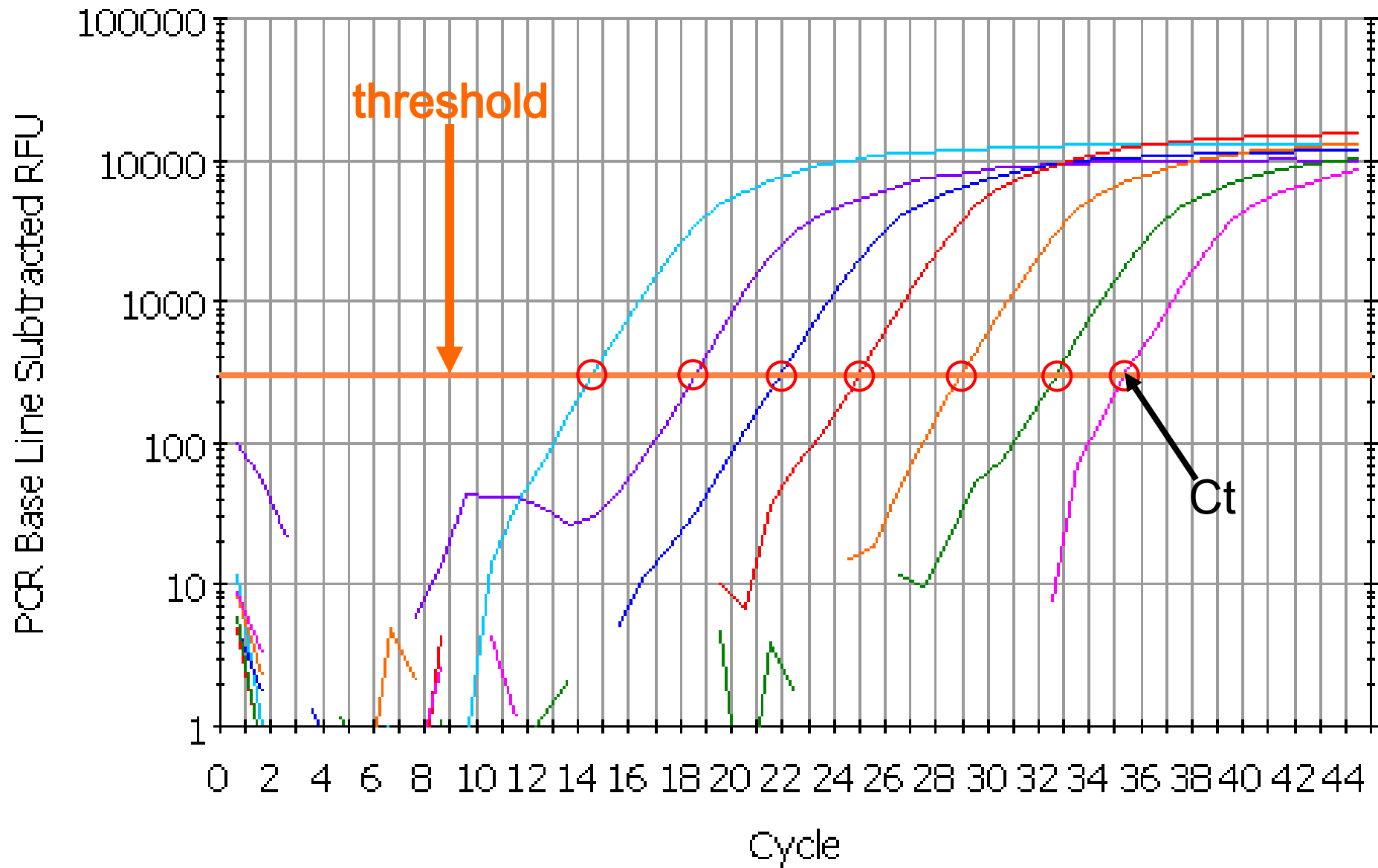


Reakcja liniowa w przedziale ~20 do ~1500



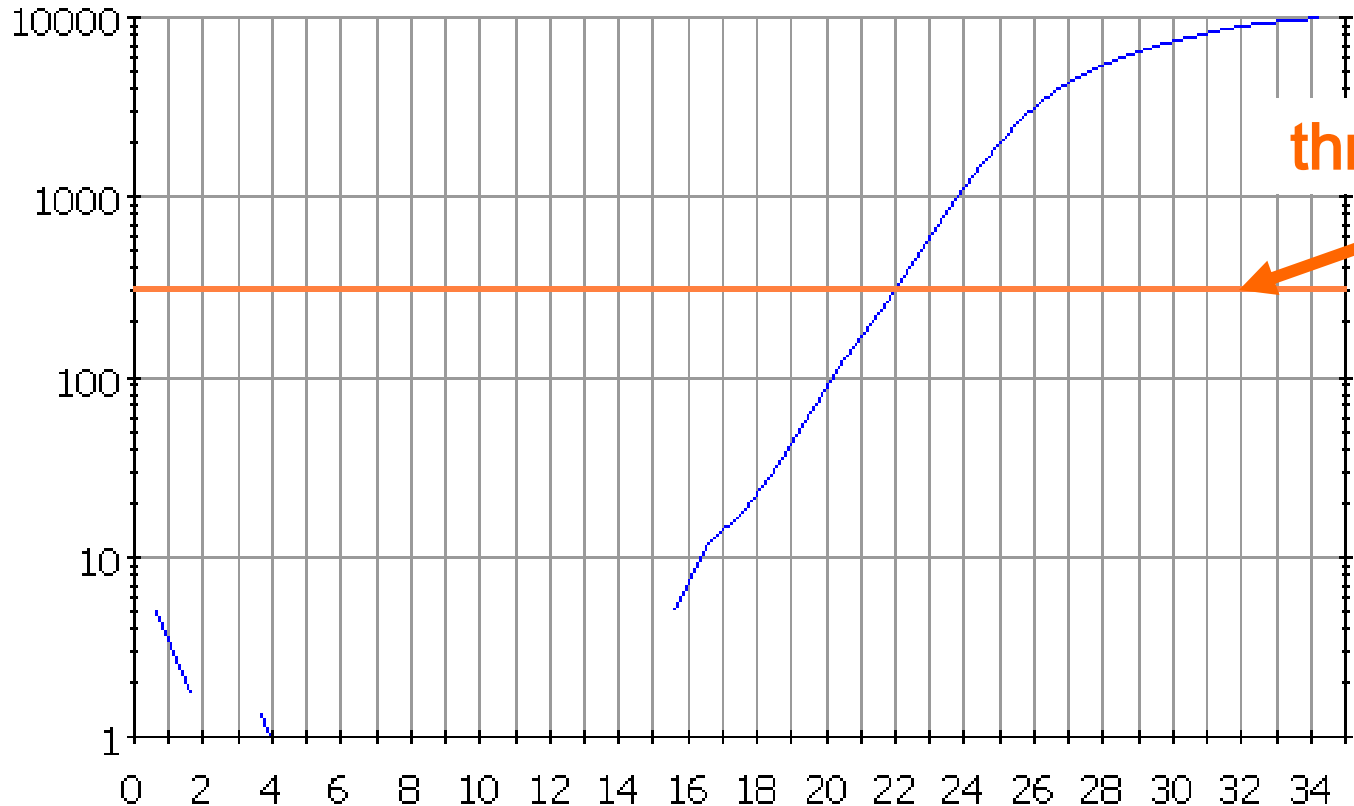


SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS



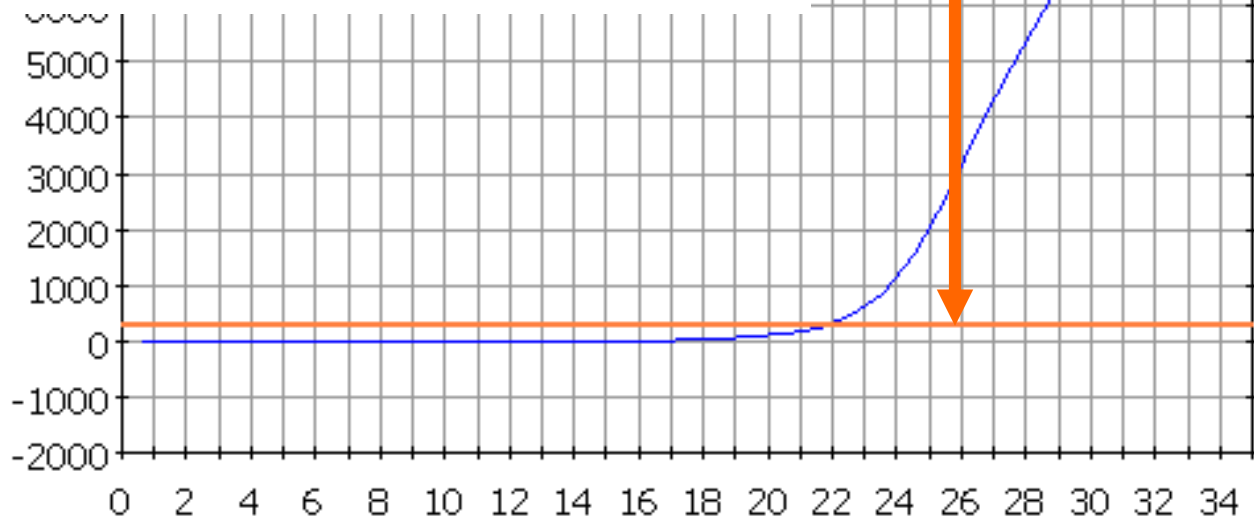
SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS

PCR Base Line Subtracted RFU

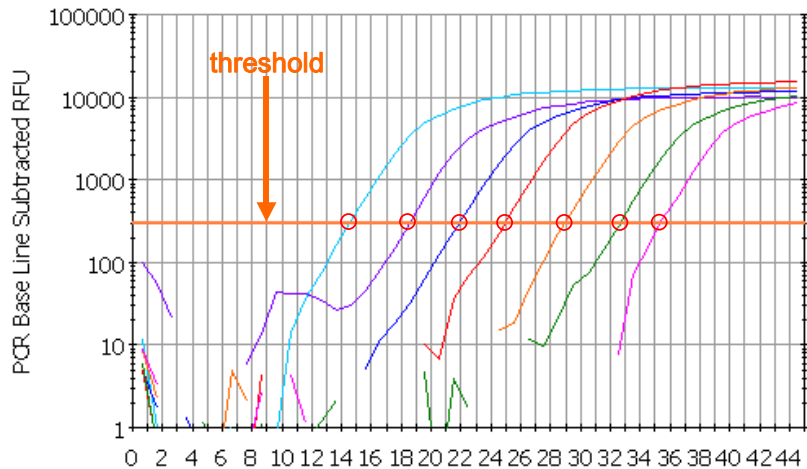


threshold = 300

PCR Base Line Subtra



Cycle



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

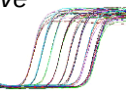
- Unknowns
- ◊ Standards



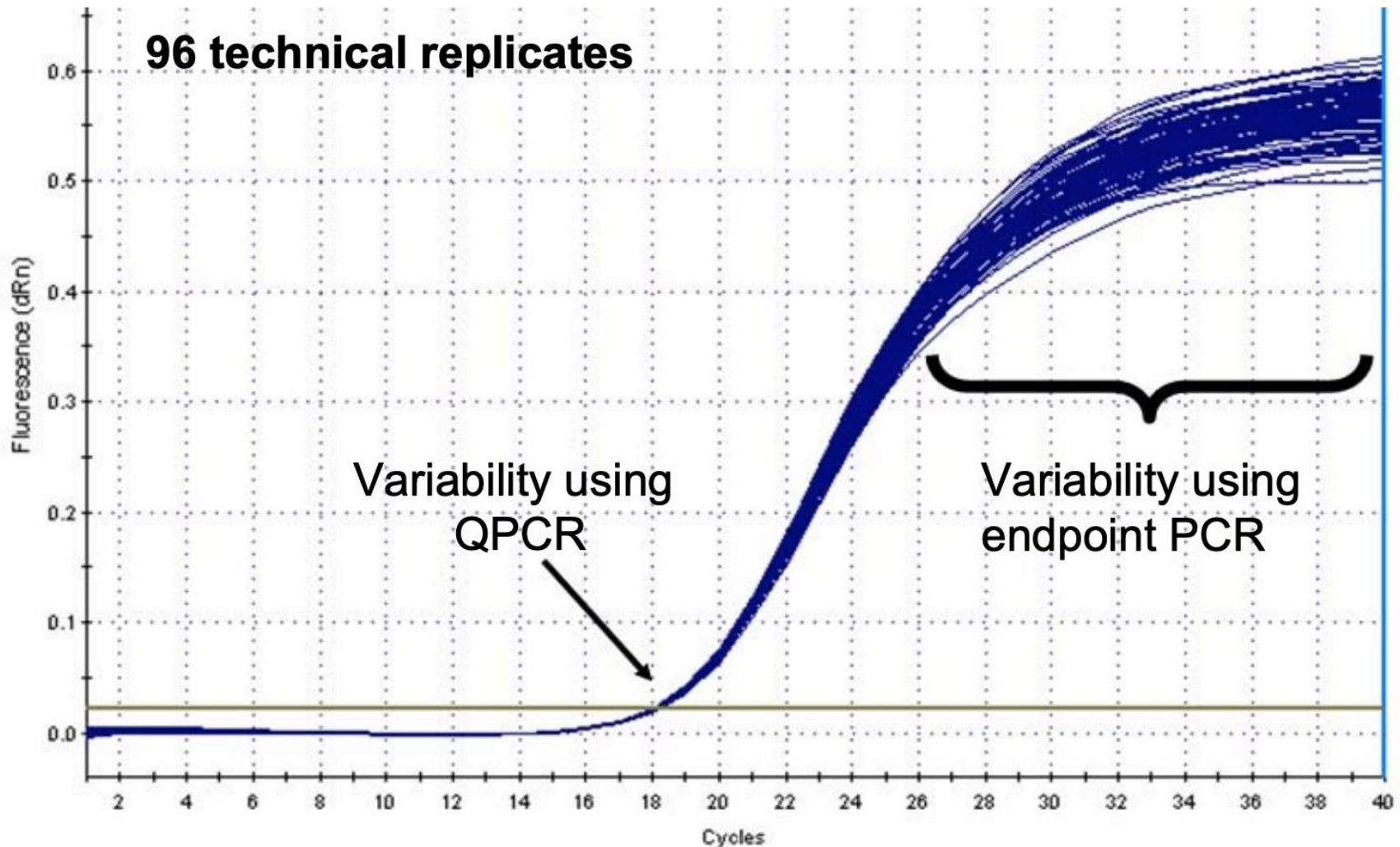
PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

Czułość i powtarzalność reakcji qPCR vs semi-qPCR

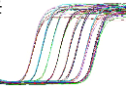
- Zakres dynamiczny: do **9** rzędów wielkości (10^9) w qPCR a w półilościowym-PCR najwyżej **2** (10^2)
- Wariancje **wewnątrz** eksperymentu qPCR - do kilku % a w semi-qPCR do 30-40%
- Wariancje **pomiędzy** eksperymentami qPCR- do kilkunastu % a w semi-qPCR do 50-70%
- Poziom detekcji w qPCR: ok.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



Czułość i powtarzalność reakcji qPCR vs semi-qPCR



<https://help.medicinalgenomics.com/qpcr-vs-end-point-pcr#>



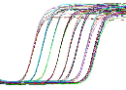
Różne algorytmy dla określenia **wartość cyklu „przebiecia”** (odcięcia; oznaczenia)

$$C_t = C_p = C_q$$

Threshold cycle –
odcięcia; progowy

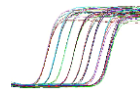
Maksimum 2-giej
pochodnej (Roche)

Quantification cycle –
oznaczenia ilościowego



Dwie metody kwantyfikacji

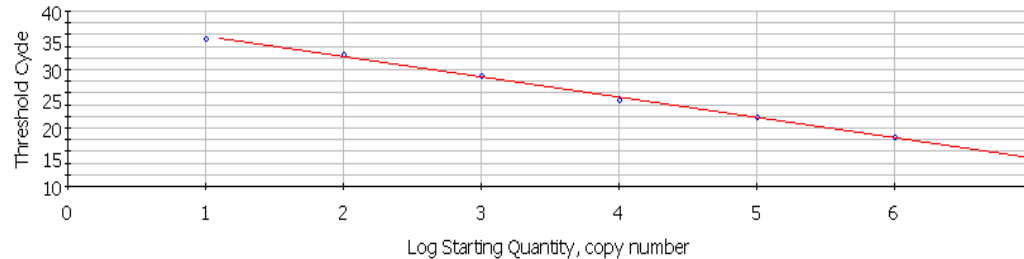
- „ABSOLUT QUANTIFICATION” czyli metoda krzywych standardowych
- „RELATIVE QUANTIFICATION”
- **Obie metody są w istocie proporcjonalne!**



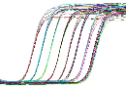
Metoda krzywych standardowych

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











Cursor
Standard
Unknown
Blank
+ Control
- Control
Puri

	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

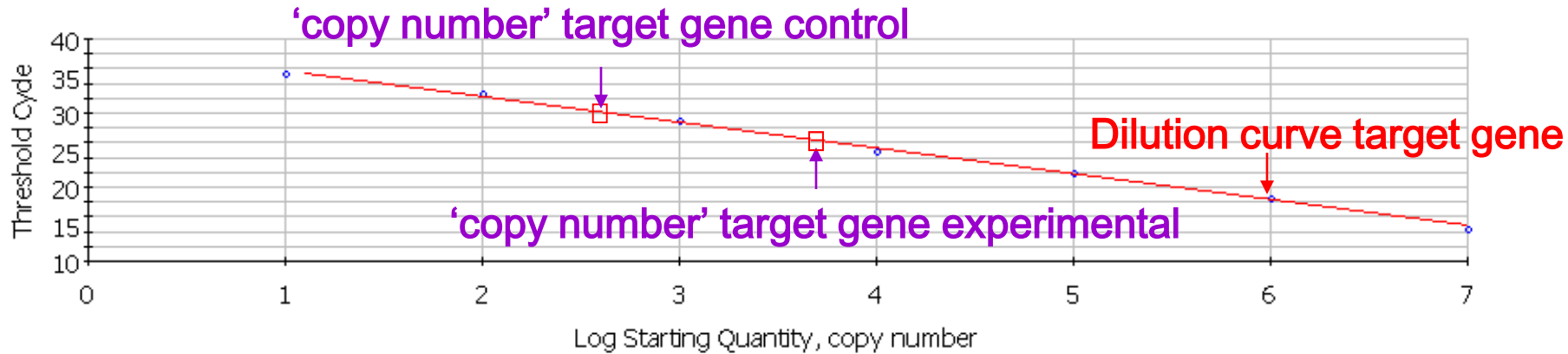
← triplicates cDNA

target primers

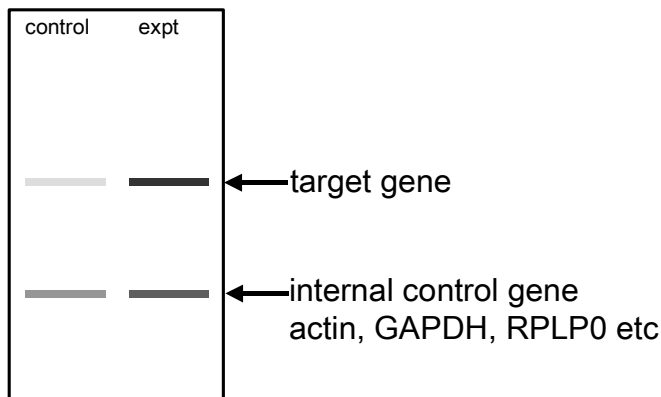
reference primers

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

□ Unknowns
● Standards



NORTHERN

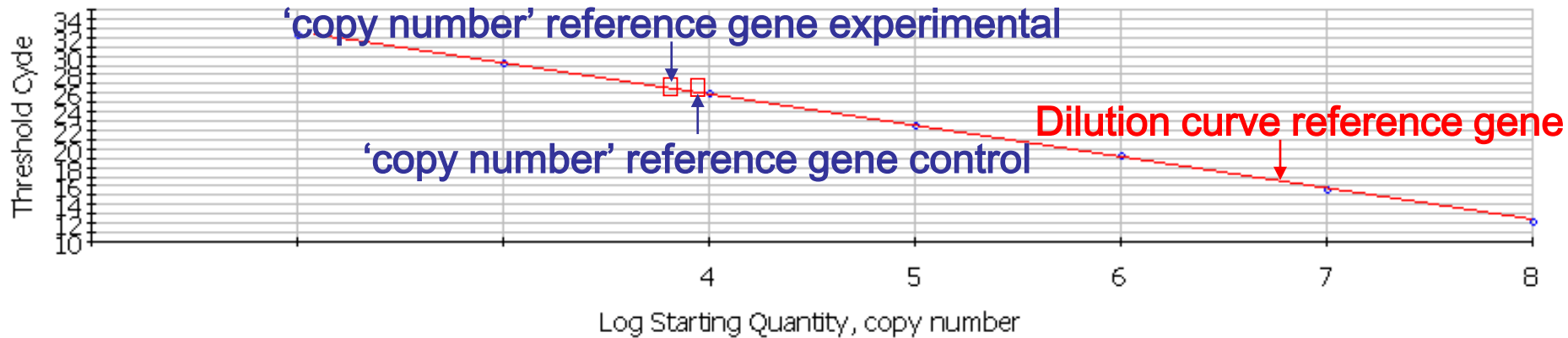


fold change in target gene =
 $\frac{\text{copy number experimental}}{\text{copy number control}}$

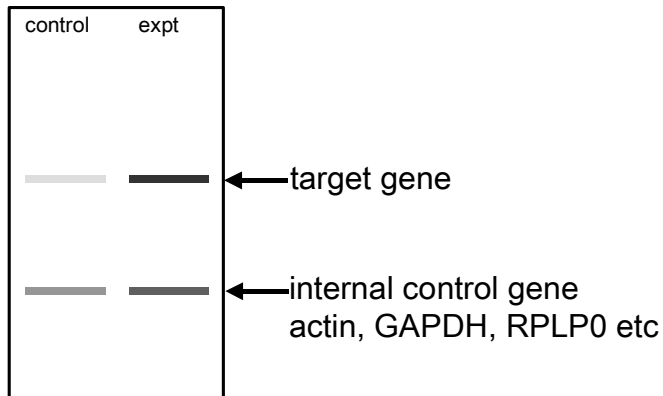
Ratio experimental/control = $\frac{\text{fold change in target gene}}{\text{fold change in reference gene}}$

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

□ Unknowns
● Standards



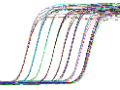
NORTHERN



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

	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									

Znajomość wydajności reakcji PCR jest kluczowa



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

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

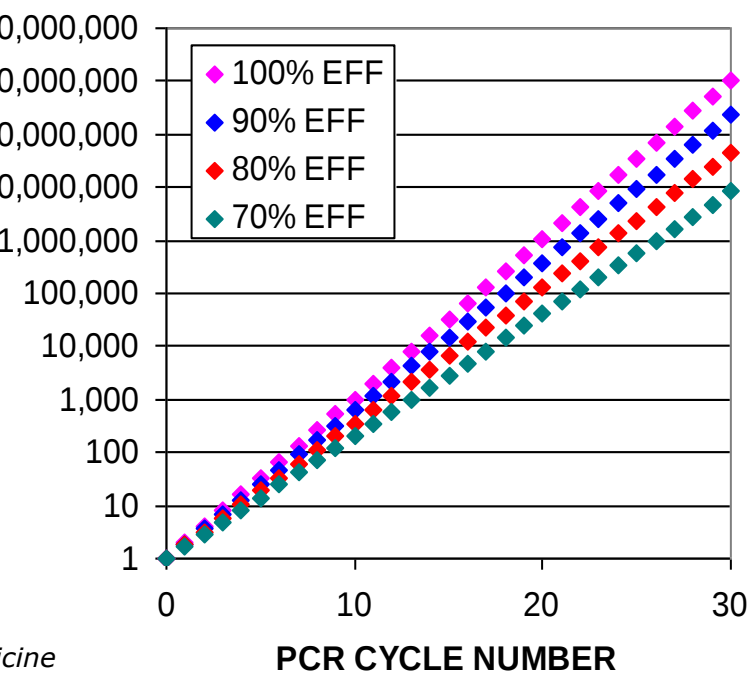
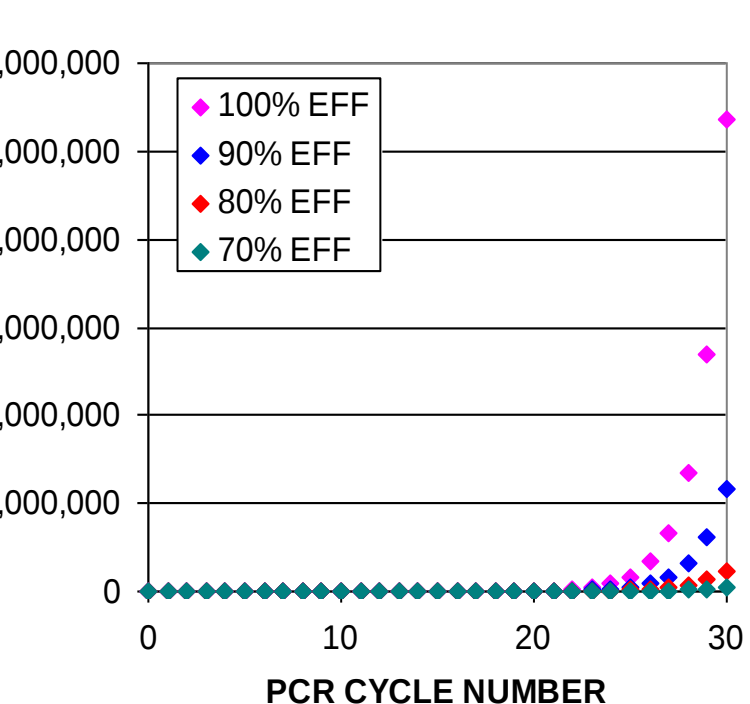
90% = 1.90x

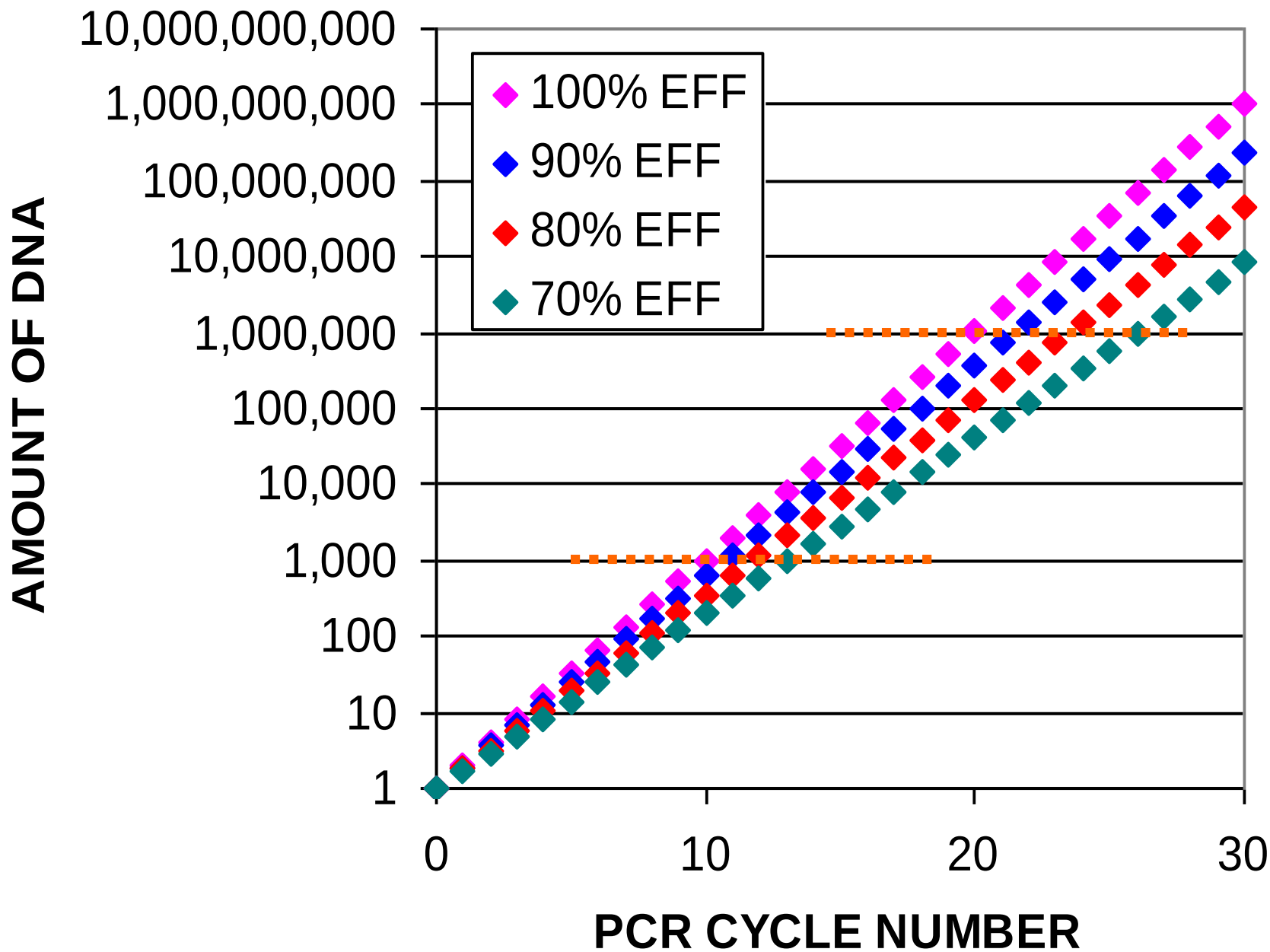
80% = 1.80x

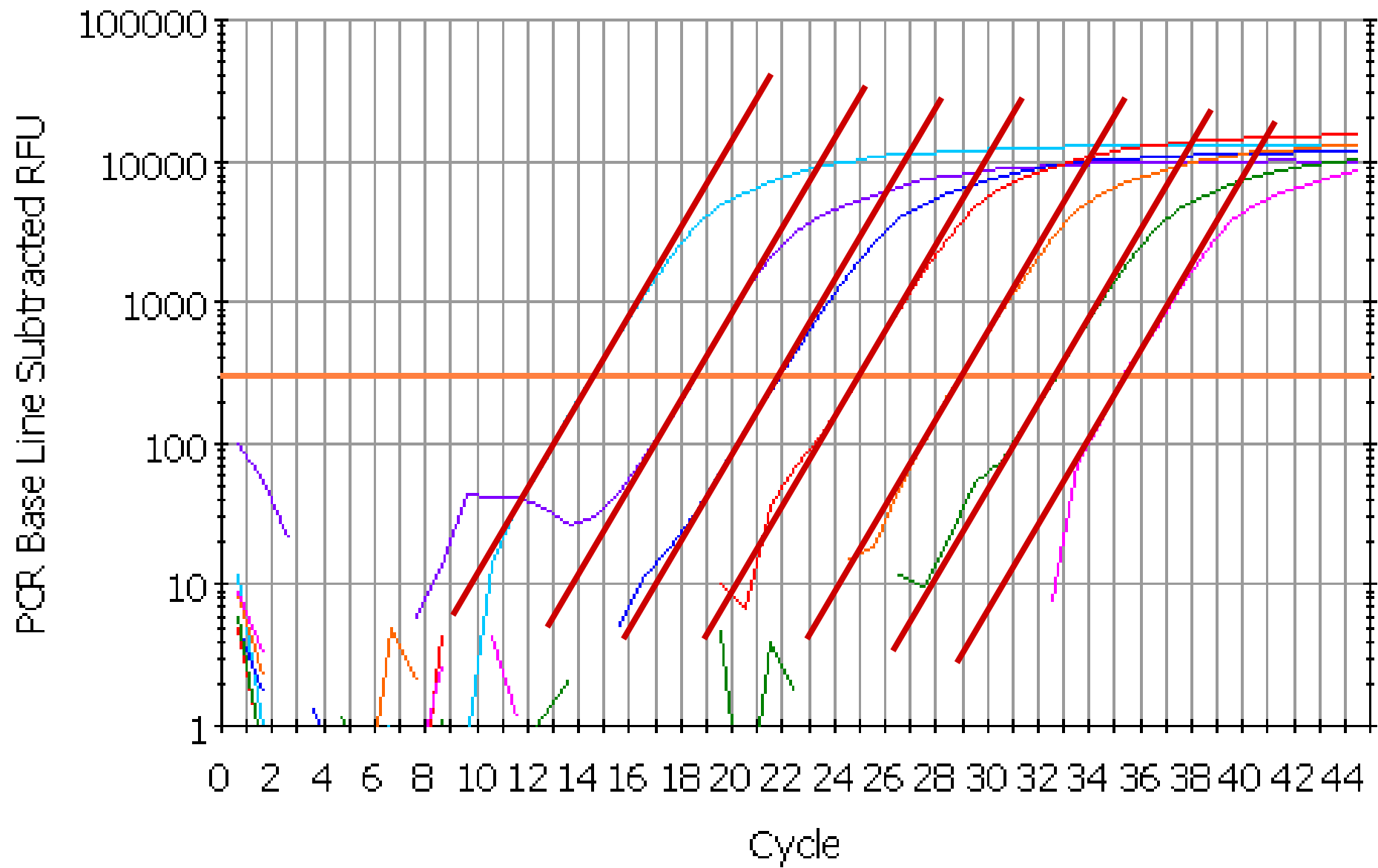
70% = 1.70x

**AFTER N CYCLES:
fold increase =
(efficiency)ⁿ**

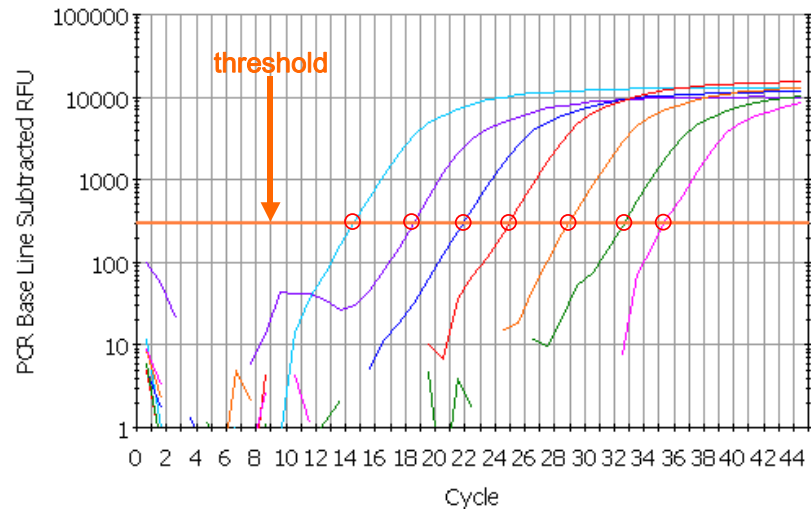
CYCLE	AMOUNT OF DNA	AMOUNT OF DNA	AMOUNT OF DNA	AMOUNT OF DNA
	100% EFFICIENCY	90% EFFICIENCY	80% EFFICIENCY	70% EFFICIENCY
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	3	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1,024	613	357	202
11	2,048	1,165	643	343
12	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



Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$
 PCR Efficiency: 93.5 %

□ Unknowns
 ♦ Standards



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

Wyznaczanie wydajności reakcji qPCR

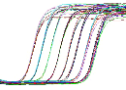
4 metody wyznaczania E qPCR:

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

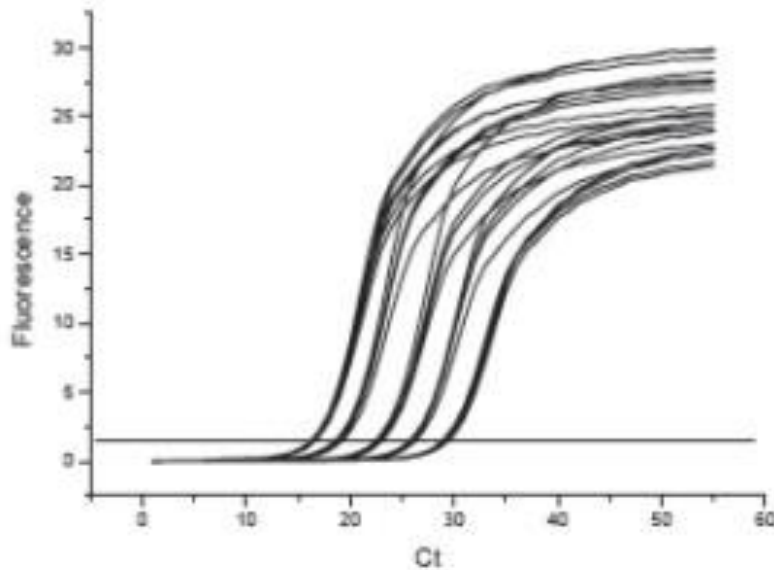
Możliwe dla każdej reakcji z osobna:

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

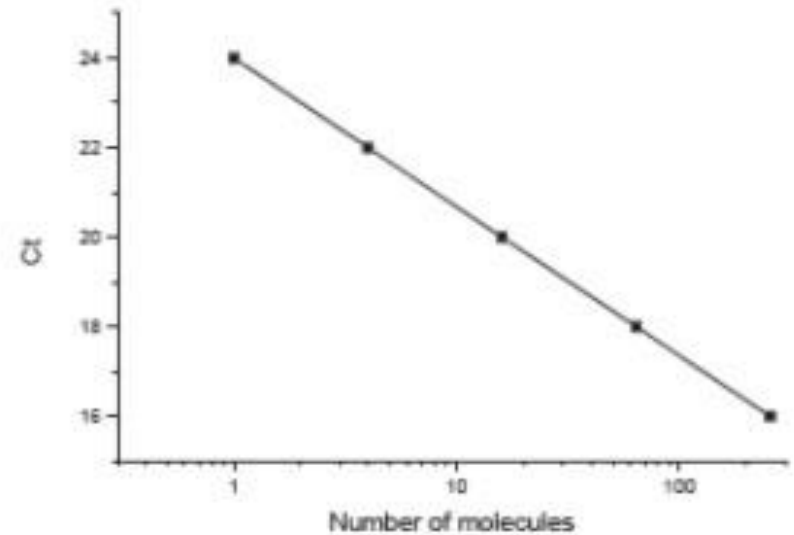
M. W. Pfaffl: *Quantification strategies in real-time PCR* w *A-Z of quantitative PCR* (Edytor: S.A. Bustin)



Wyznaczanie wydajności reakcji qPCR na podstawie krzywych wzorcowych

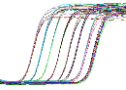


**Seryjne rozcieńczenia,
min. 5, lepiej 6 do 8**



$$E = 10^{-1/\text{slope}_1}$$

Za TATA Biocenter



Równanie reakcji qPCR

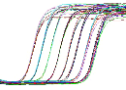
$$N_{Ct} = N_0(1 + E)^{Ct}$$

N_{Ct} : ilość cząsteczek po Ct cyklach amplifikacji

N_0 : początkowa ilość cząsteczek

E : wydajność reakcji PCR

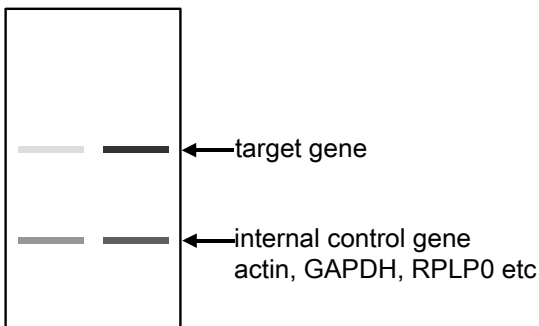
Ct : wartość „cyklu przegięcia”



Metoda PFAFFLa czyli „Realtive Quantification”

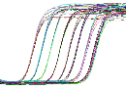
**M.W. Pfaffl, Nucleic Acids Research,
2001, 29:2002-2007**

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

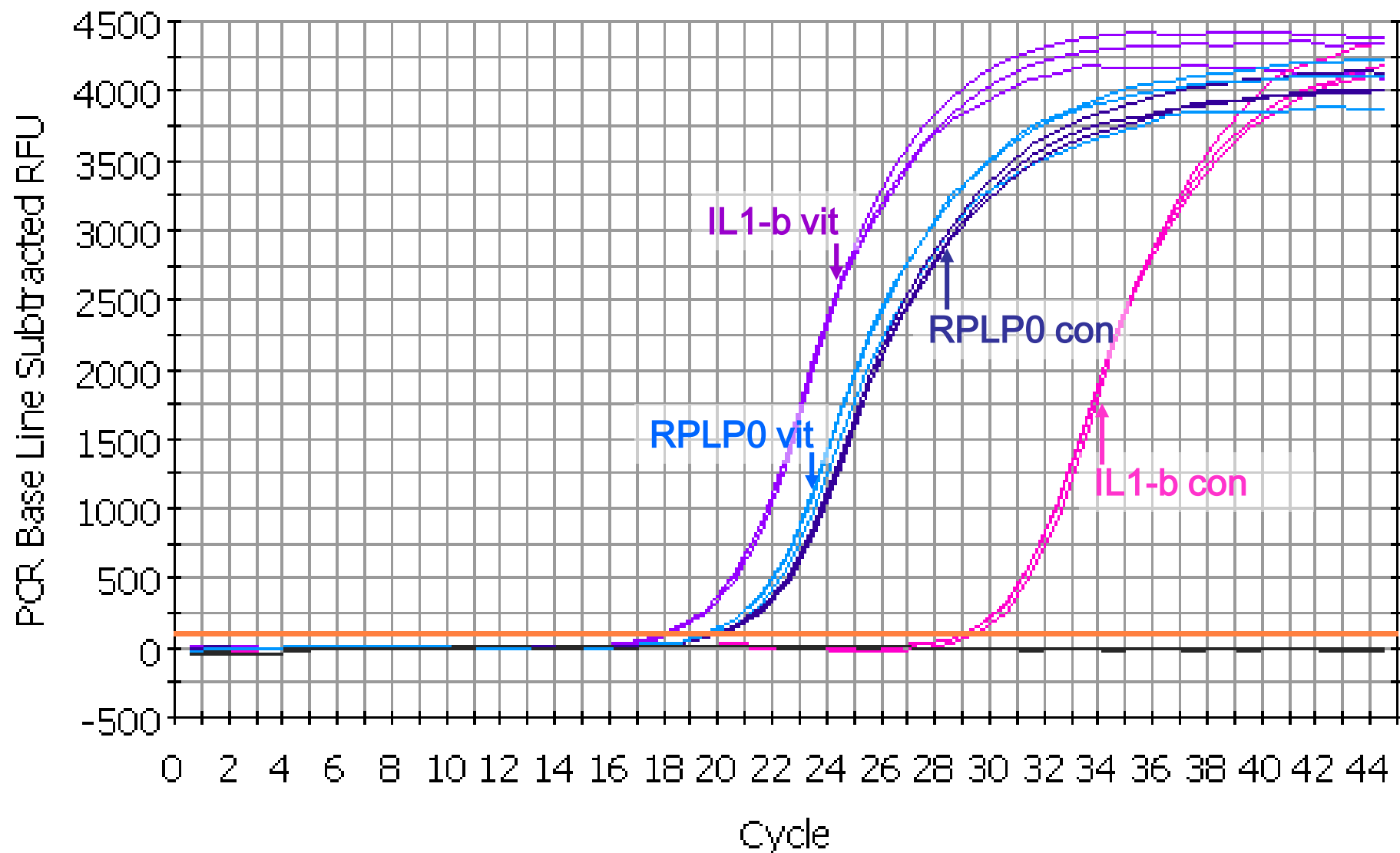
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A									
B									
C		C	C	C		E	E	E	
D									
E									
F		C	C	C		E	E	E	
G									

←triplicates cDNA

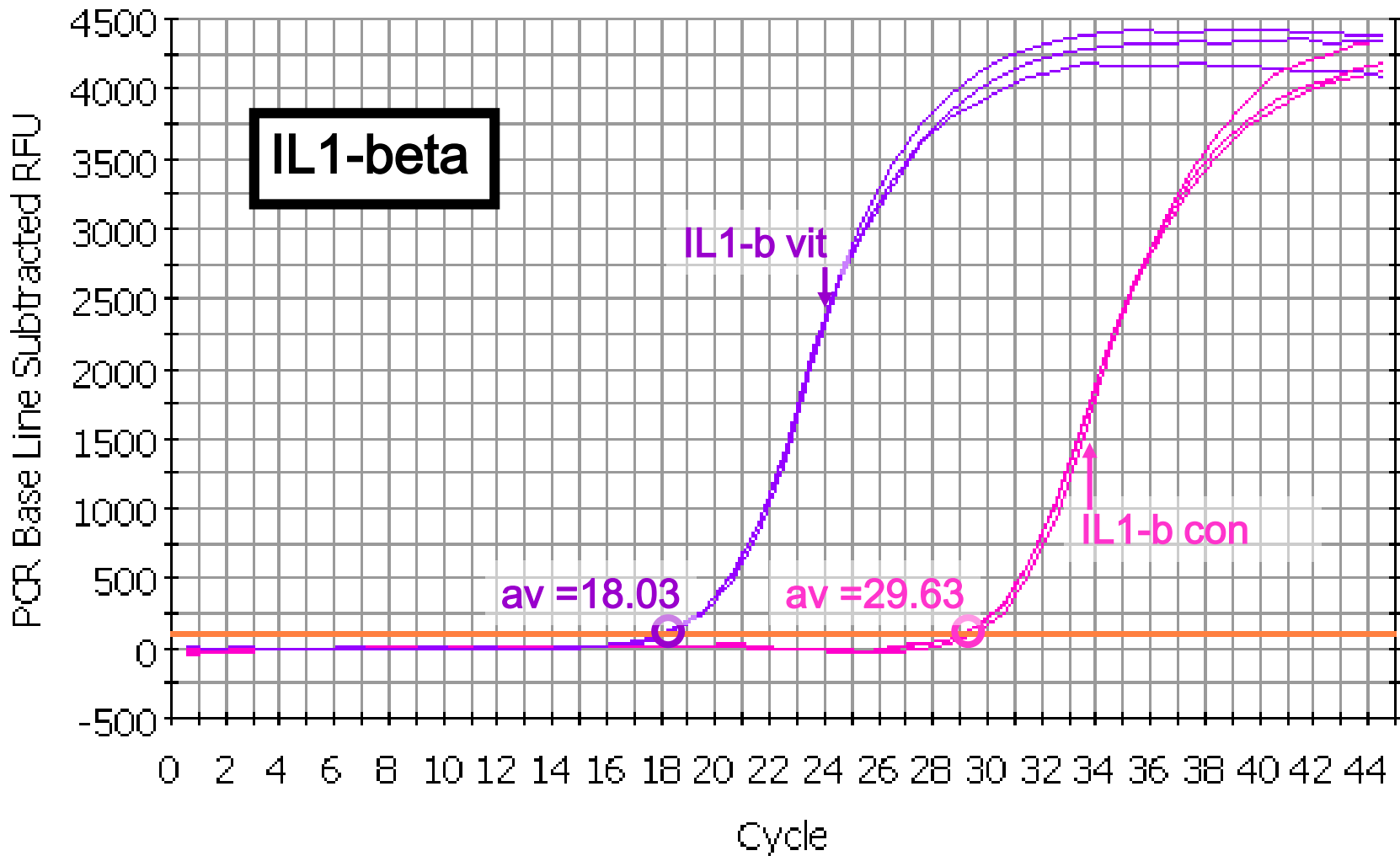
}target
primers

←triplicates cDNA

}reference
primers

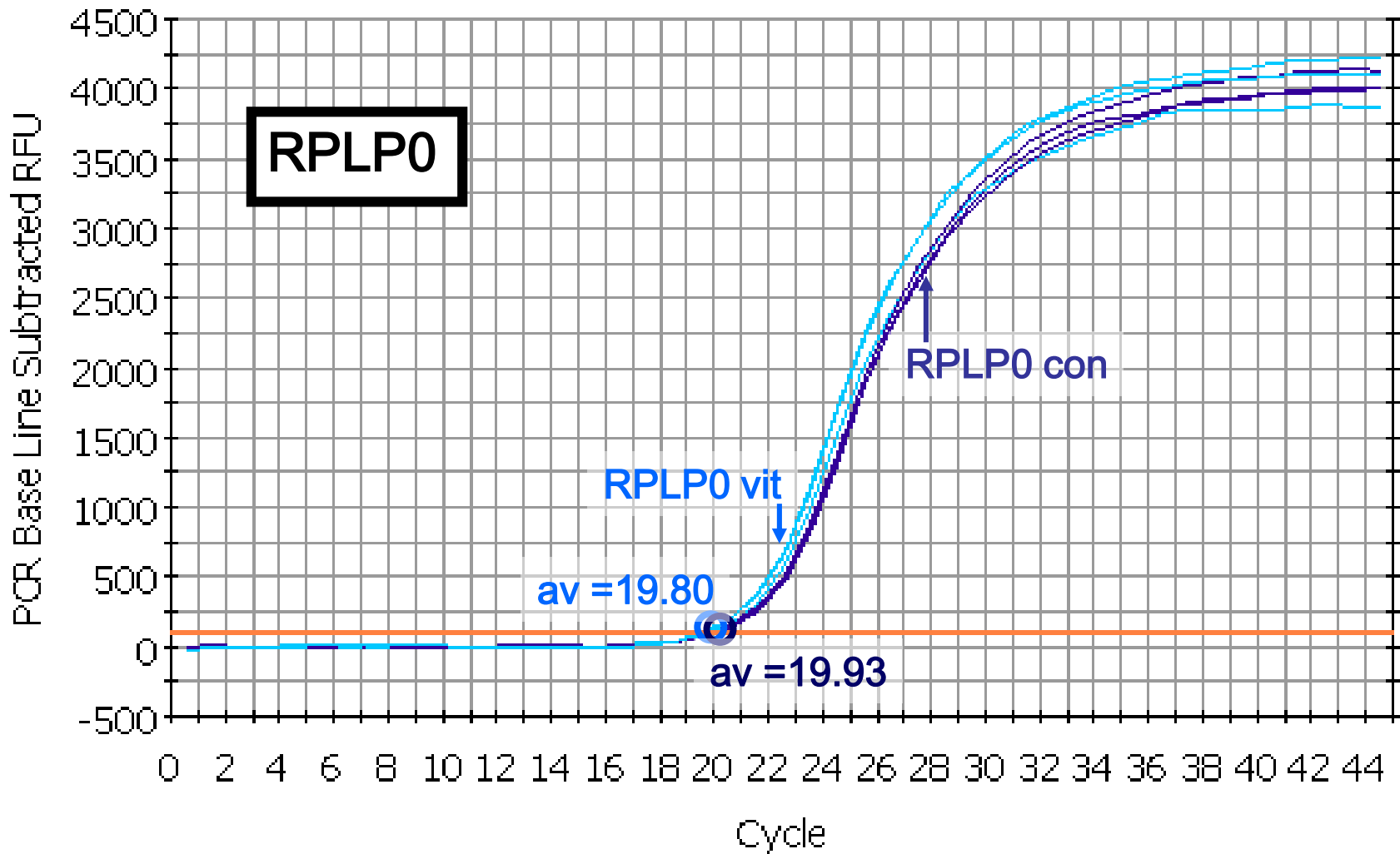


PCR Amplification vs Cycle: Data 26-Feb-03 1147.opd



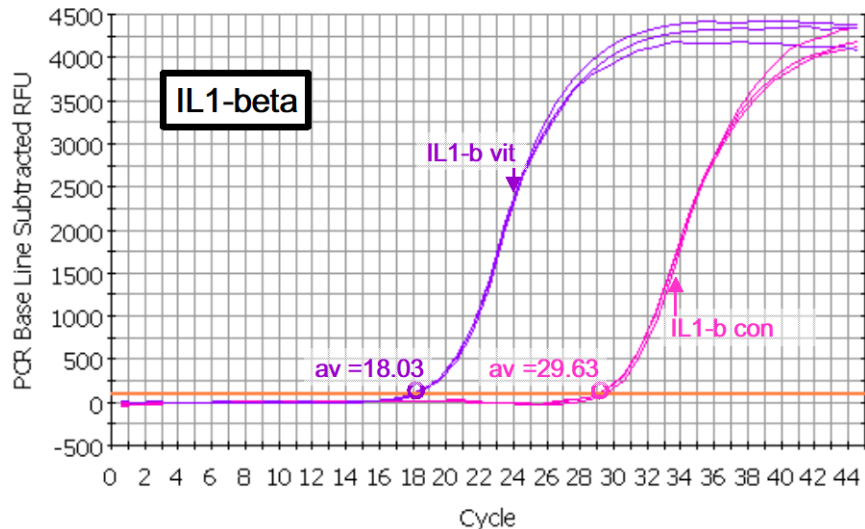
AFTER N CYCLES: change = (efficiency)ⁿ

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



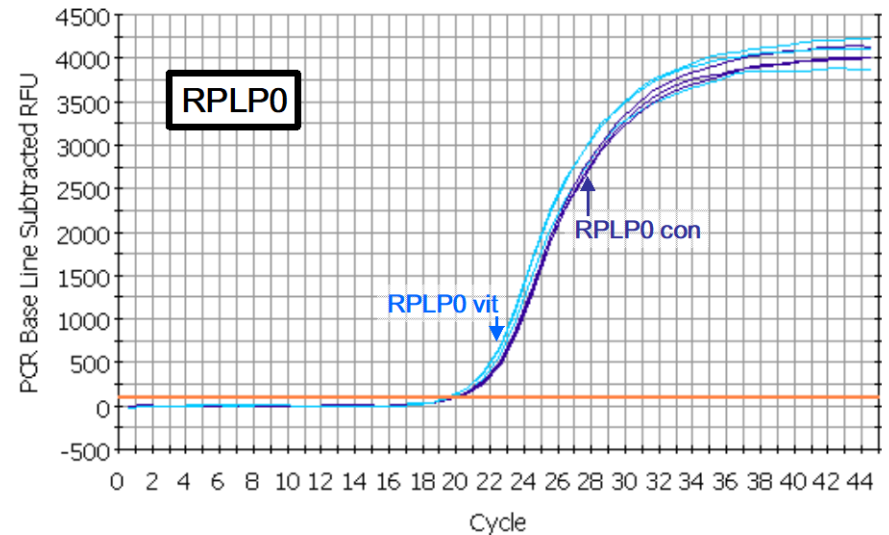
AFTER N CYCLES: change = (efficiency)ⁿ

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

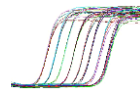
$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1 = 80 \%$$

(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(sample A) = 23.5

Ct(sample B) = 26.5

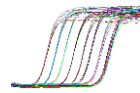
Calculate the relative expression:

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

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

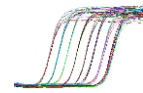
Interpretation:

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

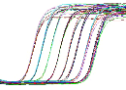
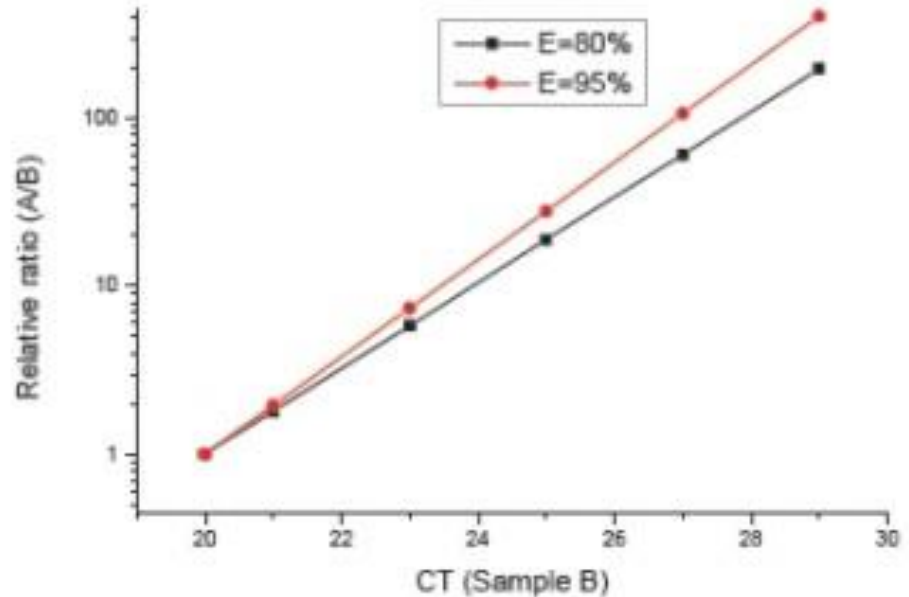
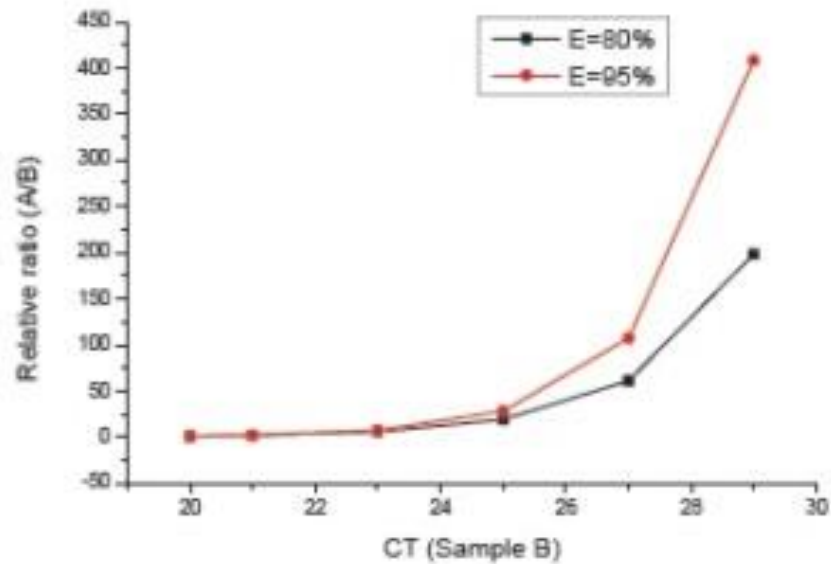


Znajomość wydajności reakcji jest konieczna!

<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

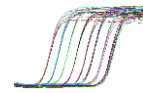
$$\frac{N_A}{N_B} = K_{RS} \frac{\eta_B (1 + E_B)^{CT_B - 1}}{\eta_A (1 + E_A)^{CT_A - 1}}$$

η – wydajność RT

CT – wartość (cykl) Ct

E – wydajność PCR

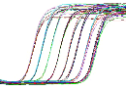
K_{RS} – względna czułość qPCR



Kwantyfikacja: 2 próby, 2 geny

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

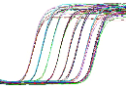
$$\frac{\text{Sample A}}{\text{Sample B}} = \frac{(1 + E_{ref})^{CtA_{ref} - CtB_{ref}}}{(1 + E_{tar})^{CtA_{tar} - CtB_{tar}}}$$



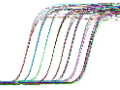
„garbage in, garbage out“

„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



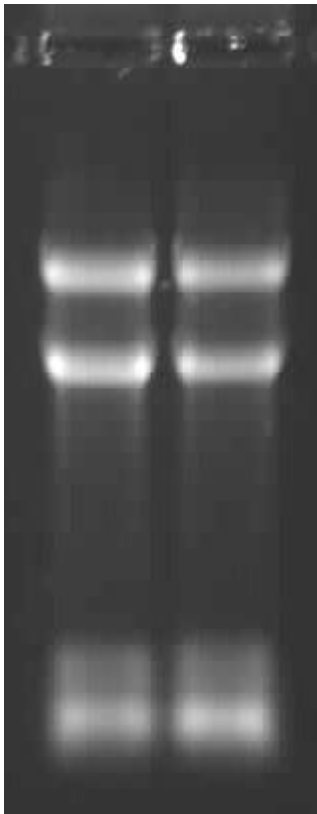
RT-qPCR w praktyce



Jakość RNA to podstawa!!!

Inkubacja z
DNazą, 1h 37°C

- +



Jakość RNA = czystość + integralność

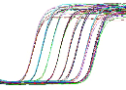
**Czystość – oznaczana
spektrofotometrycznie**

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

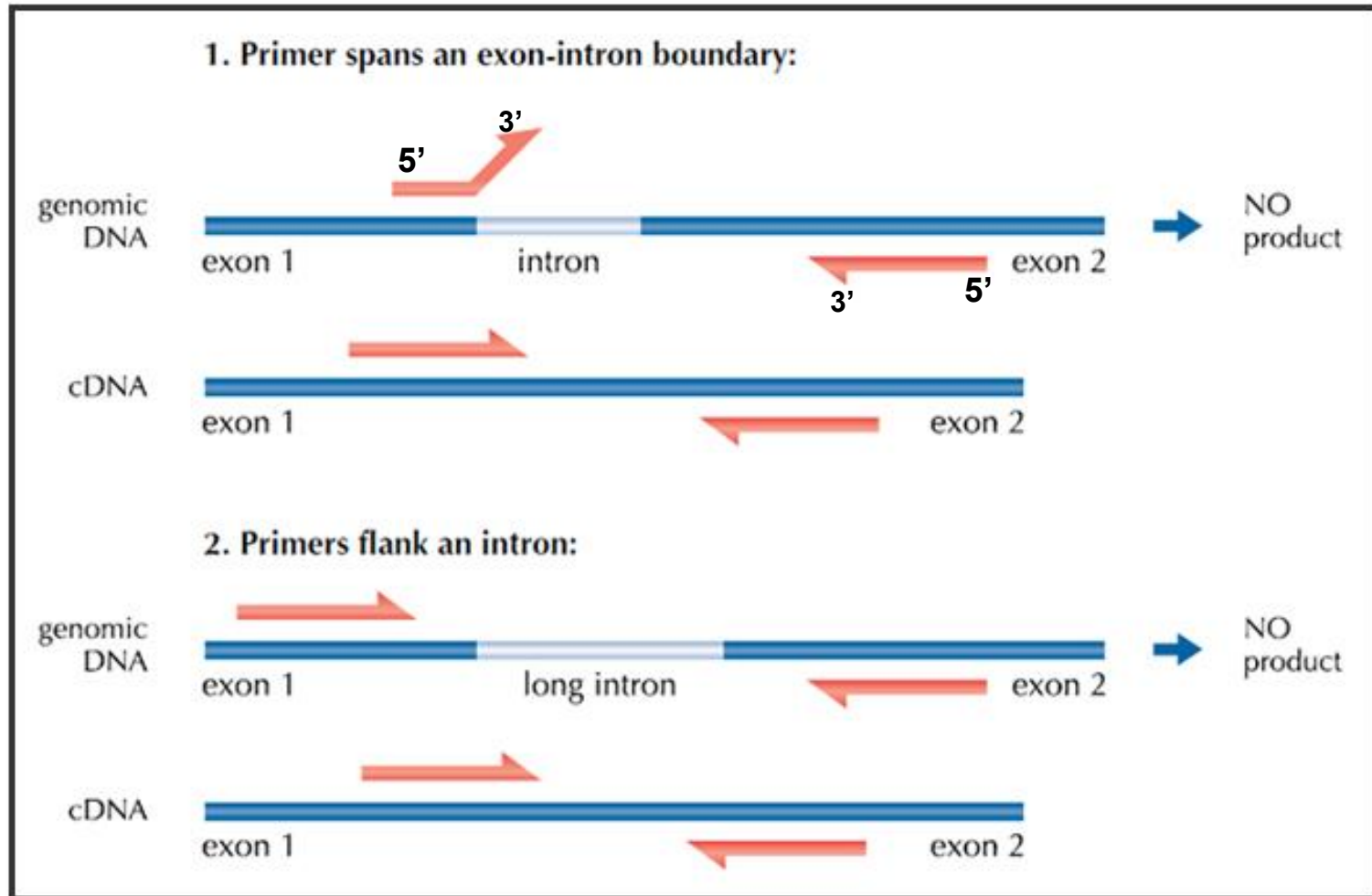
**Konieczna kontrola jakości RNA po
izolacji!**

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

**Zalecane stosowanie inhibitorów RNaz
przy RT!**

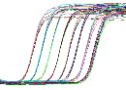


Projektowanie starterów – minimalizacja sygnałów dla kontaminacji gDNA



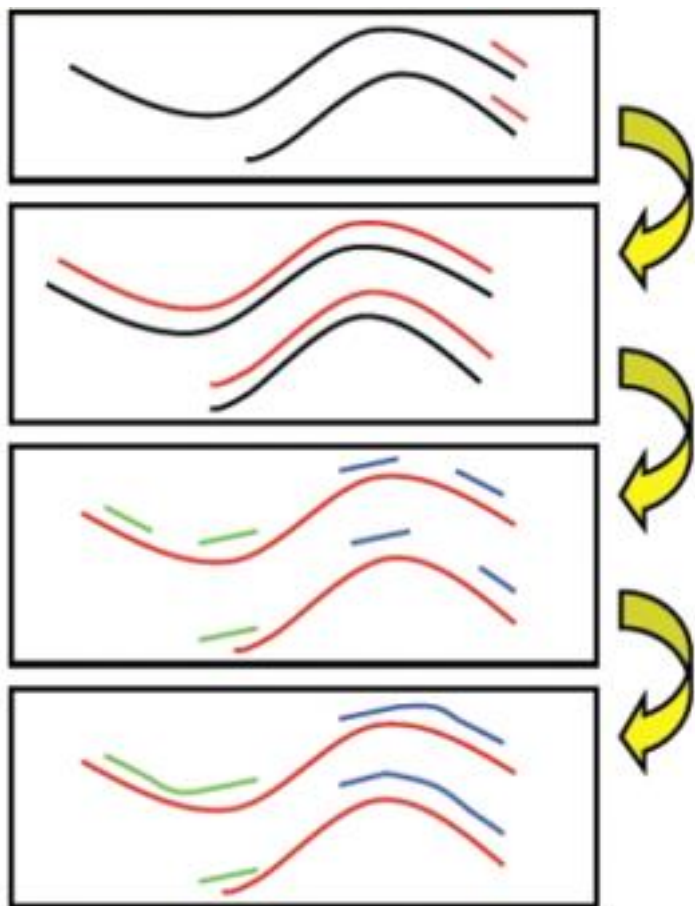
Za:

<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/basic-principles-rt-qpcr.html>

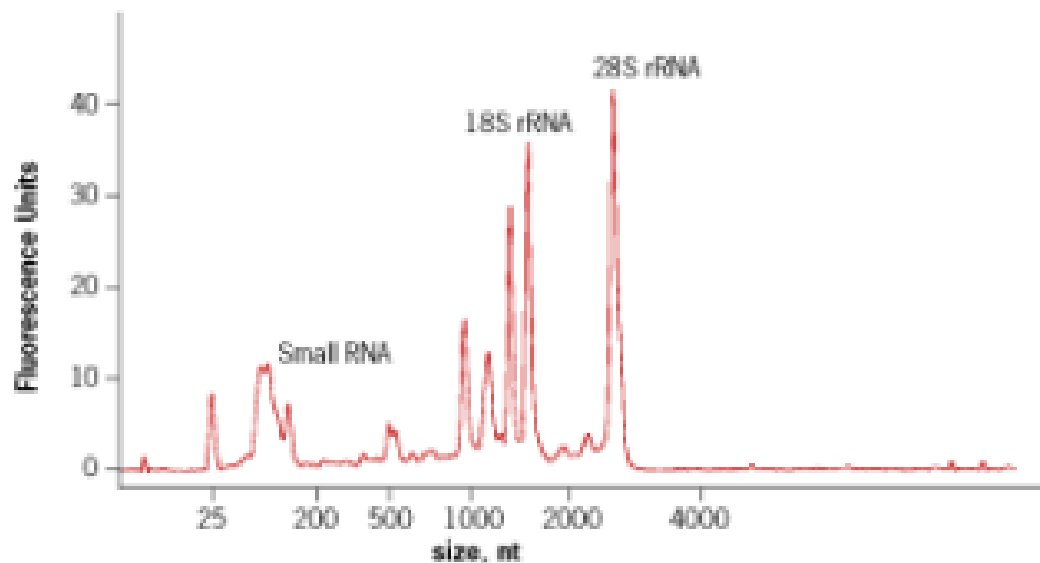


Ocena integralności RNA

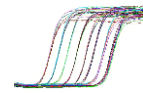
Test integralności końców 5'-3' RNA



Analizatory mikrocieczowe

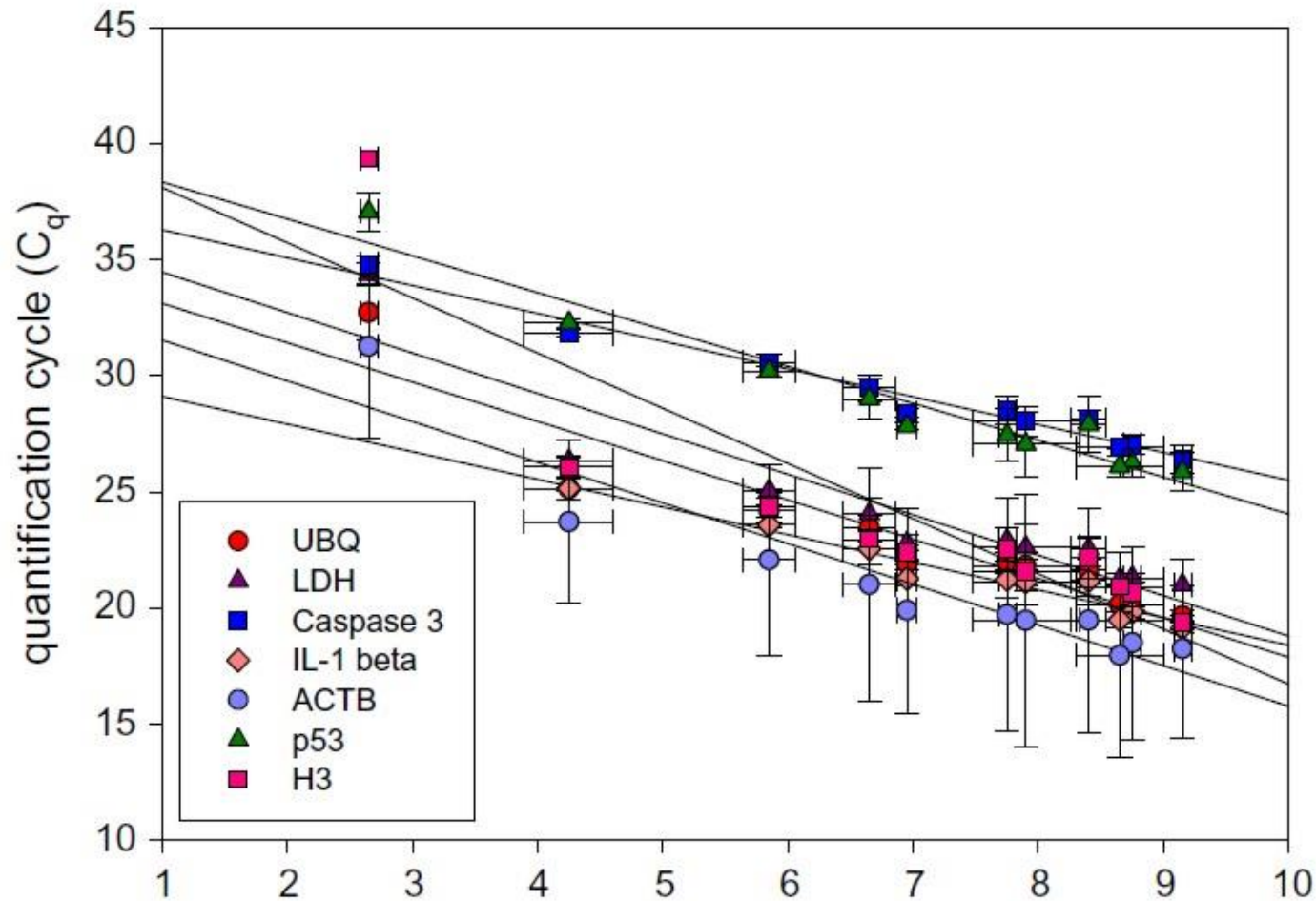


- Biorad: Experion
- Agilent: Bioanalyzer
- Elektroforeza kapilarna



Jakość wpływa na wyniki!!!

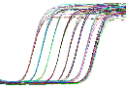
RIN: „RNA Integrity Number”, min. 7
(wg Bioanalyzer, Agilent Tech.)



**Najbardziej
kluczowym elementem**

**qPCR
jest reakcja**

**odwrotnej
transkrypcji!!!**

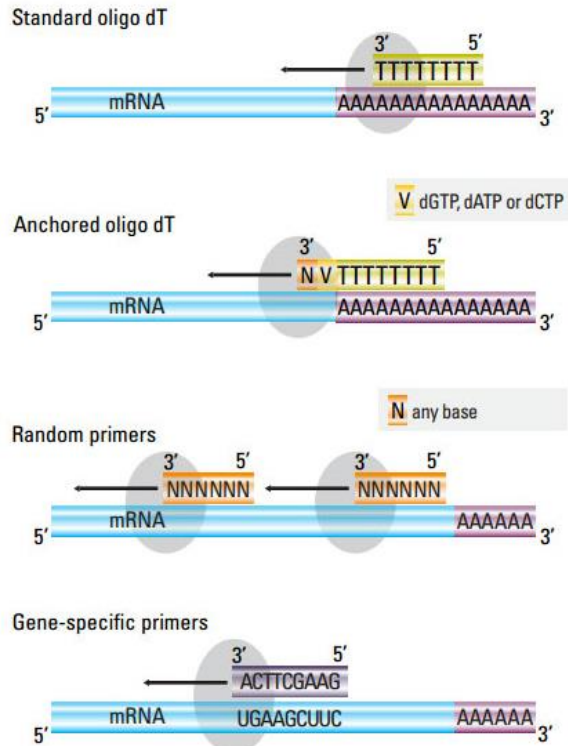


Wydajność i specyficzność RT

Specyficzność i wydajność reakcji odwrotnej transkrypcji
SILNIE zależy od:

- Metody startowania (primowania) reakcji.
- Rodzaju odwrotnej transkryptazy (cech enzymu).
- Sekwencji **DANEJ** cząsteczki RNA, w szczególności od struktur 2-rzędowych w jej obrębie.
- **Różnice wydajności mogą sięgać nawet 100X!!!**
- Optymalne warunki RT zawsze należy wyznaczyć eksperymentalnie.

Metody startowania RT – wady i zalety



Primer Options

Oligo(dT)s (or anchored oligo(dT)s)

Structure and Function

Stretch of thymine residues that anneal to poly(A) tail of mRNA; anchored oligo(dT)s contain one G, C, or A (the anchor) residue at the 3' end

Random Primers

Six to nine bases long, they anneal at multiple points along RNA transcript

Sequence Specific Primers

Custom made primers that target specific mRNA sequence

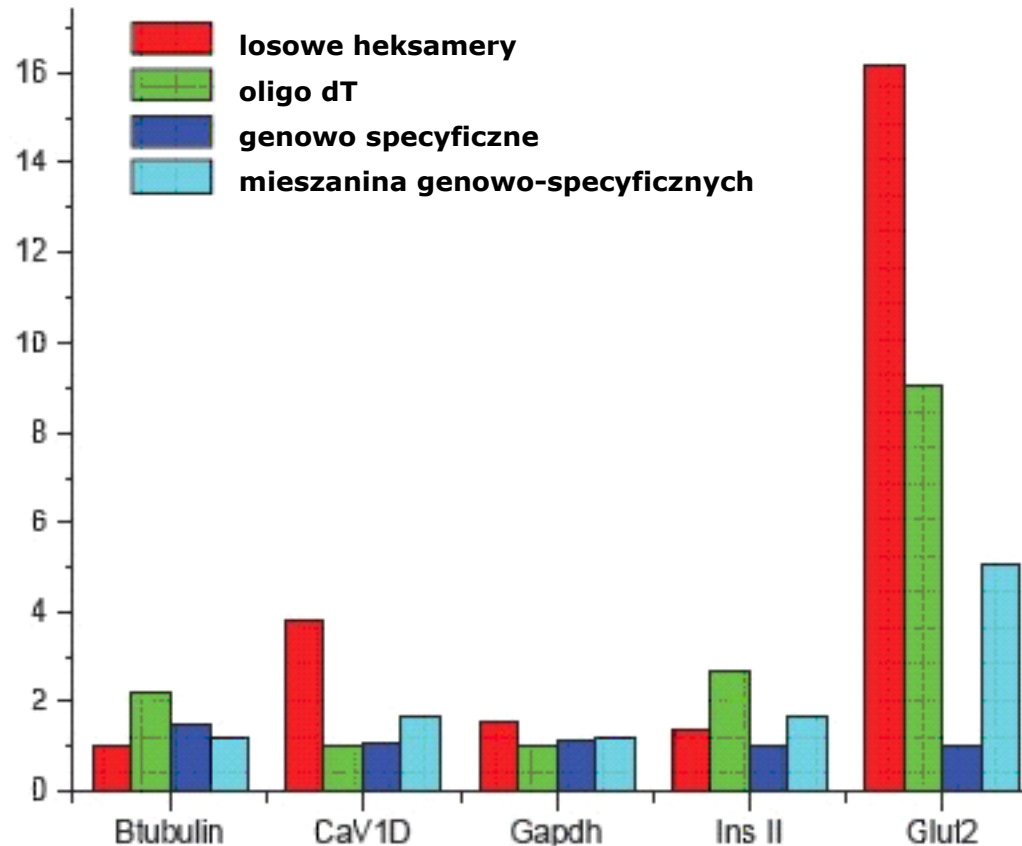
Advantages Disadvantages

- Generation of full length cDNA from poly(A)-tailed mRNA
- Good to use if little starting material is available
- Anchor ensures that the oligo(dT) primer binds at the 5' end of the poly(A) tail of mRNA
- Anneal to all RNA (tRNA, rRNA, and mRNA)
- Good to use for transcripts with significant secondary structures, or if little starting material is available
- High cDNA yield
- Specific cDNA pool
- Increased sensitivity
- Use reverse qPCR primer
- Only amplify gene with a poly(A) tail
- Truncated cDNA from priming internal poly(A) sites*2
- Bias towards 3' end*
- *Minimized if anchored oligo(dT)s are used
- cDNA is made from all RNAs which is not always desirable and can dilute mRNA signal
- Truncated cDNA
- Synthesis is limited to one gene of interest

Za:
<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/basic-principles-rt-qpcr.html>

Zależność wydajności RT od metody startowania

Wydajność RT



Sthalberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

Specyficzność metod startowania

RT priming ^a	β -tubulin ^b	CaV1D ^b	GAPDH ^b	Insulin II ^b	Glut2 ^b
hexamers	19.5	<u>26.5</u>	<u>15.8</u>	16.9	<u>27.5</u>
oligo(dT)	<u>18.1</u>	28.8	16.6	<u>15.9</u>	28.4
specific	18.8	28.7	16.4	17.4	31.8
mix	19.1	27.9	16.2	16.6	29.3
max Δ Ct ^c	1.4	2.3	0.8	1.5	4.4

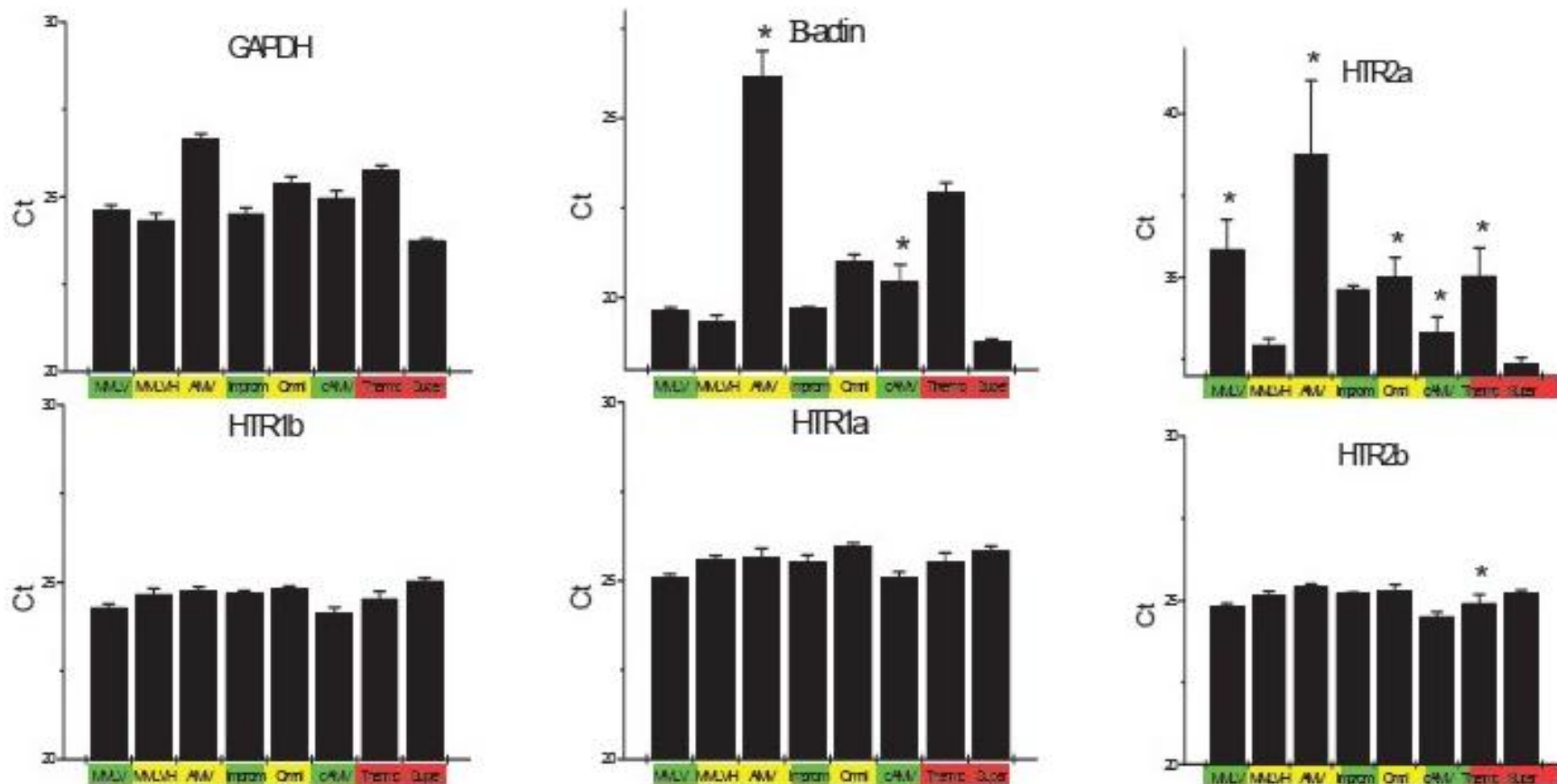
Stahlberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

Zależność wydajności RT od metody startowania

RT priming	β -tubulin ^a	CaV1D ^a	GAPDH ^a	Insulin II ^a	Glut2 ^a
<u>β-tubulin</u>	<u>18.8</u>	28.7	19.0	18.8	30.6
CaV1D	27.0	<u>28.7</u>	19.9	22.8	<i>b</i>
GAPDH	23.4	30.1	<u>16.4</u>	20.1	<u>29.7</u>
Insulin2	23.5	31.6	20.0	<u>17.4</u>	31.0
Glut2	25.8	31.9	22.7	22.7	31.8
<u>no primer</u>	27.6	33.7	23.6	23.1	32.6

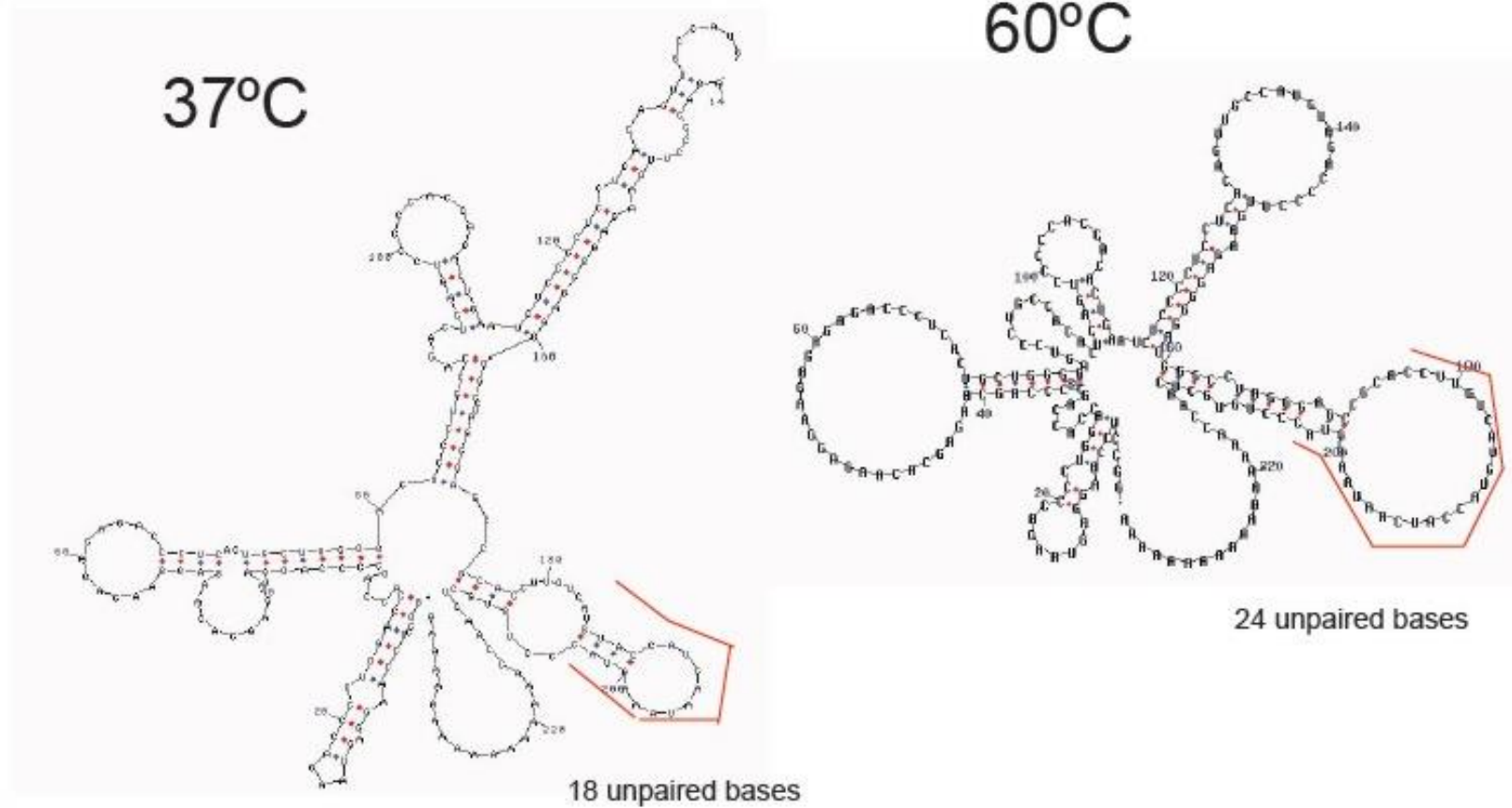
Stahlberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

Różnice w wydajności RT mogą sięgać 100X!



Stahlberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

Optymalizacja RT



Za TATA Biocenter

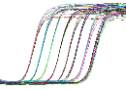
Zawsze KONTROLE!!!

Kontrole negatywne:

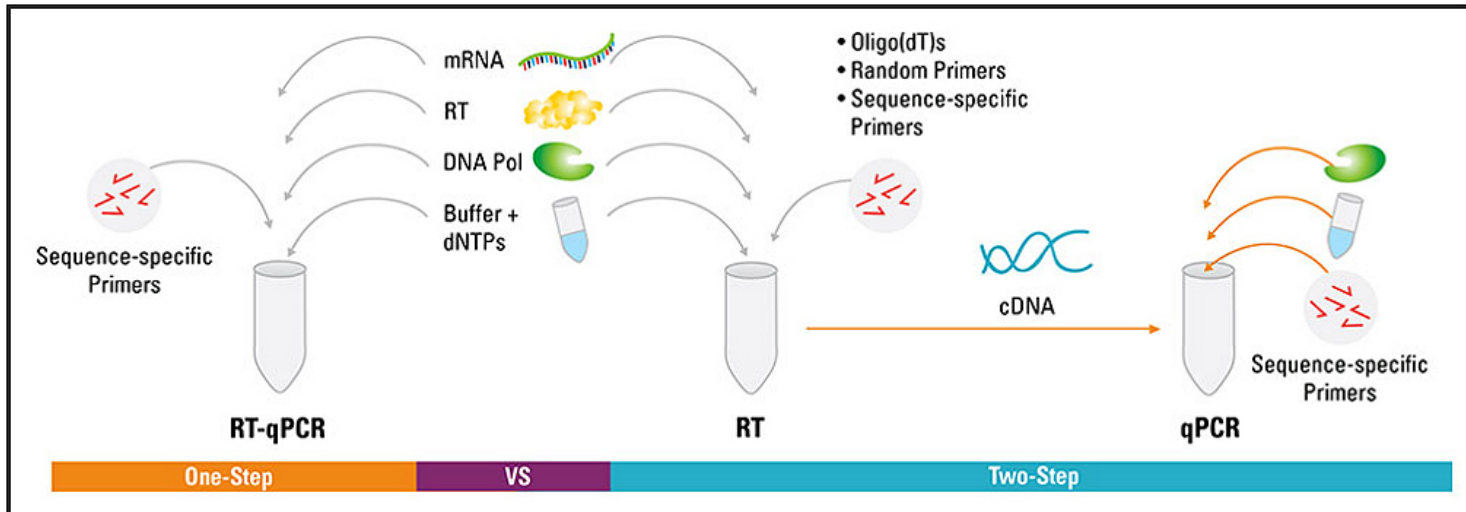
- **-RT**: kontrola kontaminacji DNA genomowym, konieczna!
- **NTC**: „no template controle”: kontrola czystości odczynników!!!

Kontrola pozytywna:

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



Wybór pomiędzy 1-etapową albo 2-etapową reakcją RT-qPCR



1-step

2-step

Advantages

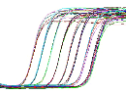
- Less experimental variation since both reactions take place in the same tube
- Fewer pipetting steps reduces risk of contamination
- Suitable for high throughput amplification/screening Fast and highly reproducible
- A stable cDNA pool is generated that can be stored for long periods of time and used for multiple reactions
- The target and reference genes can be amplified from the same cDNA pool without multiplexing
- Optimized reaction buffers and reaction conditions can be used for each individual reaction
- Flexible priming options

Disadvantages

- Impossible to optimize the two reactions separately
- Less sensitive than two-step because the reaction conditions are a compromise between the two combined reactions
- Detection of fewer targets per sample
- The use of several tubes and pipetting steps exposes the reaction to a greater risk of DNA contamination
- Time consuming
- Requires more optimization than one-step

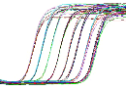
Za:

<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/basic-principles-rt-qpcr.html>

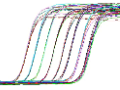


Dobra praktyka laboratoryjna TO PODSTAWA!!!

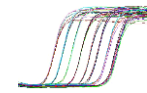
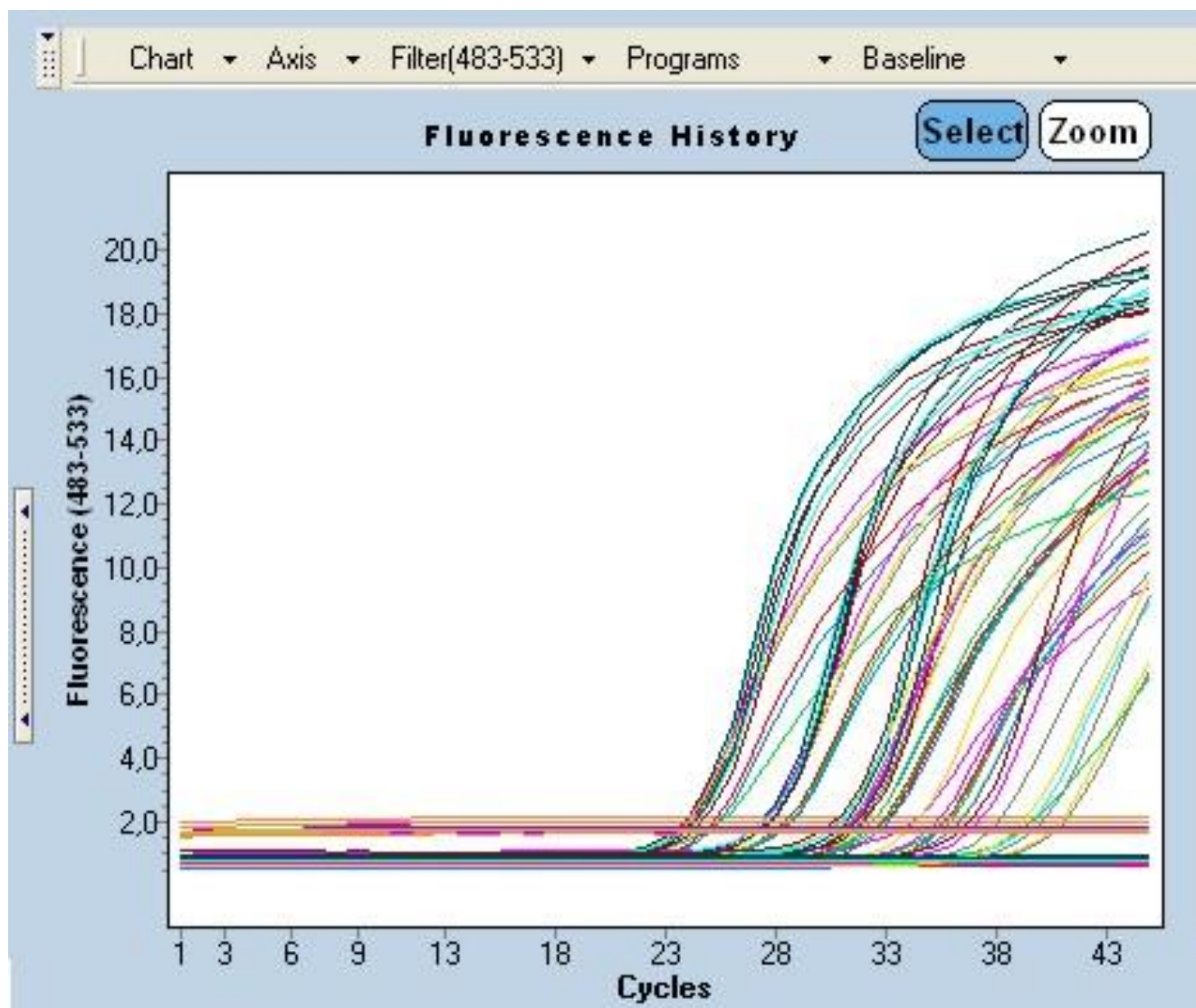
- Nie pipetować ręcznie **mniej jak 2 μ l** na raz!
- Oddzielne miejsce dla przygotowywania reakcji bez matrycy i oddzielne dla dodawania DNA!
- Rękawiczki **bez talku!**
- Składanie reakcji w „**MIXach**” a nie oddzielenie!
- Nie otwierać probówek/płytek po reakcji w pomieszczeniach do ich przygotowywania!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



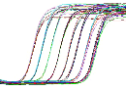
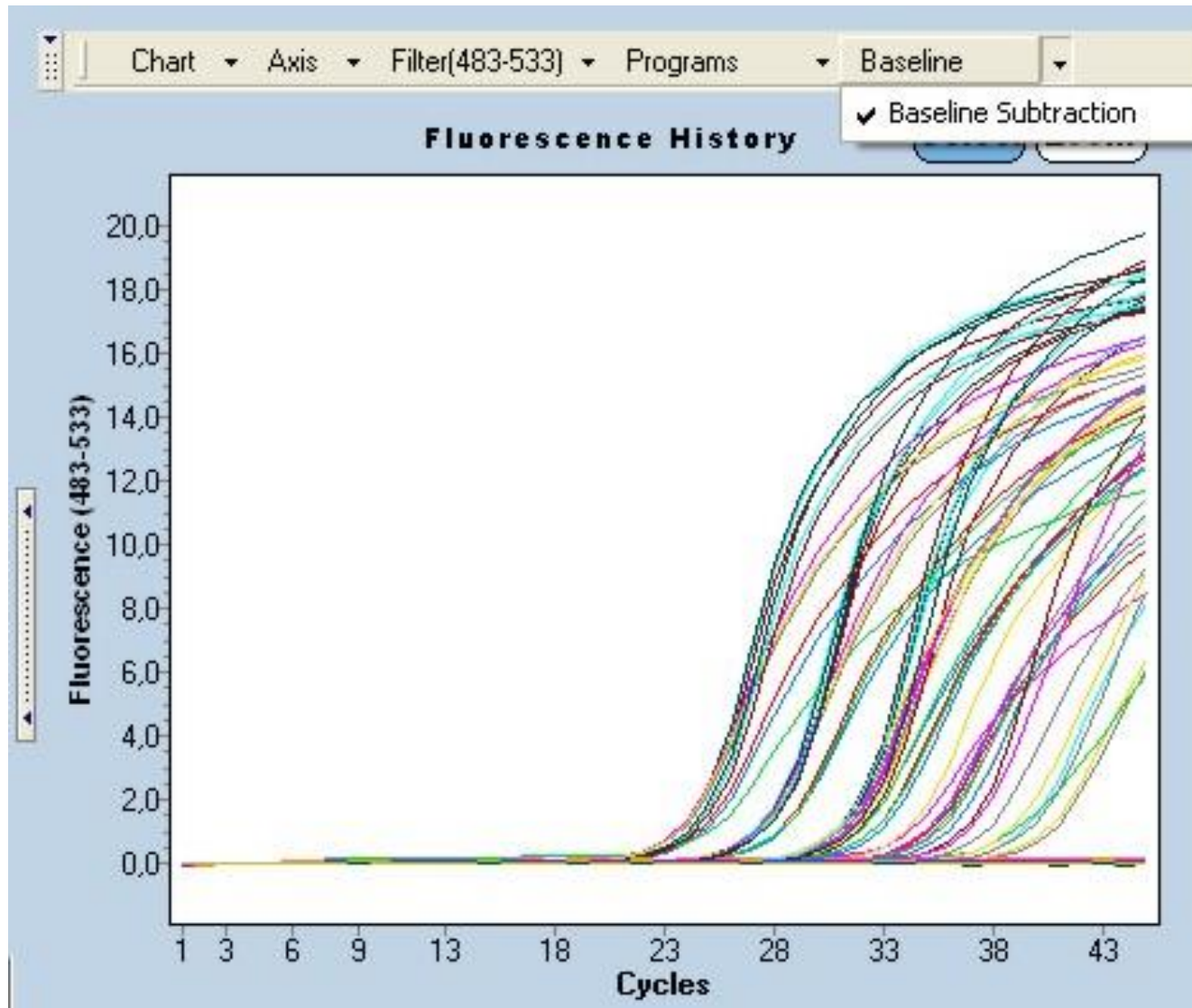
Podstawowa analiza reakcji qPCR



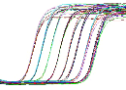
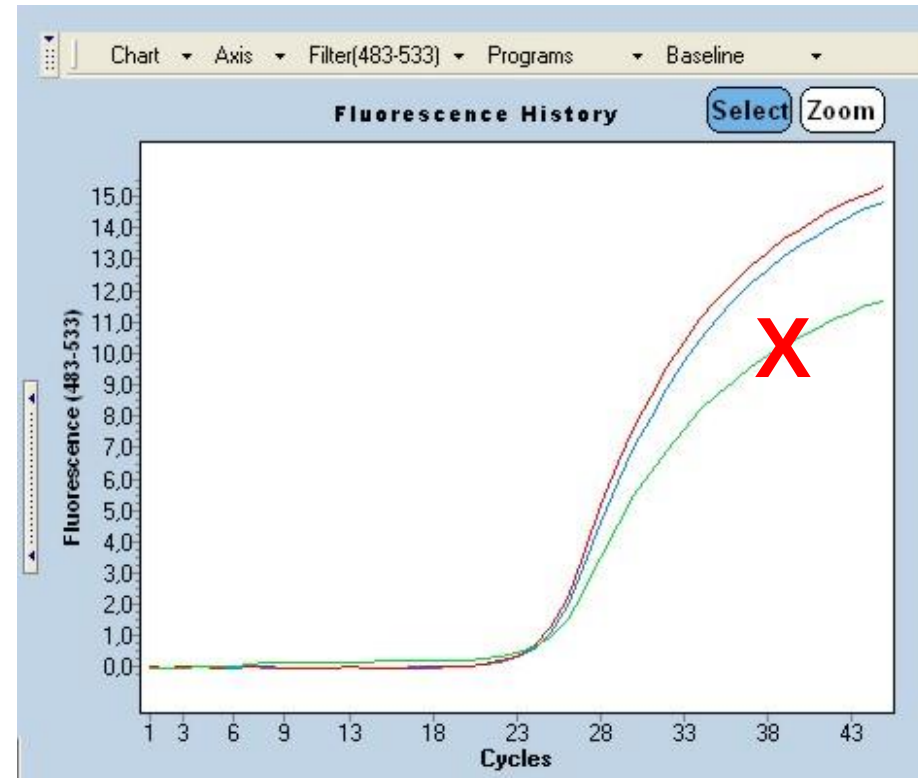
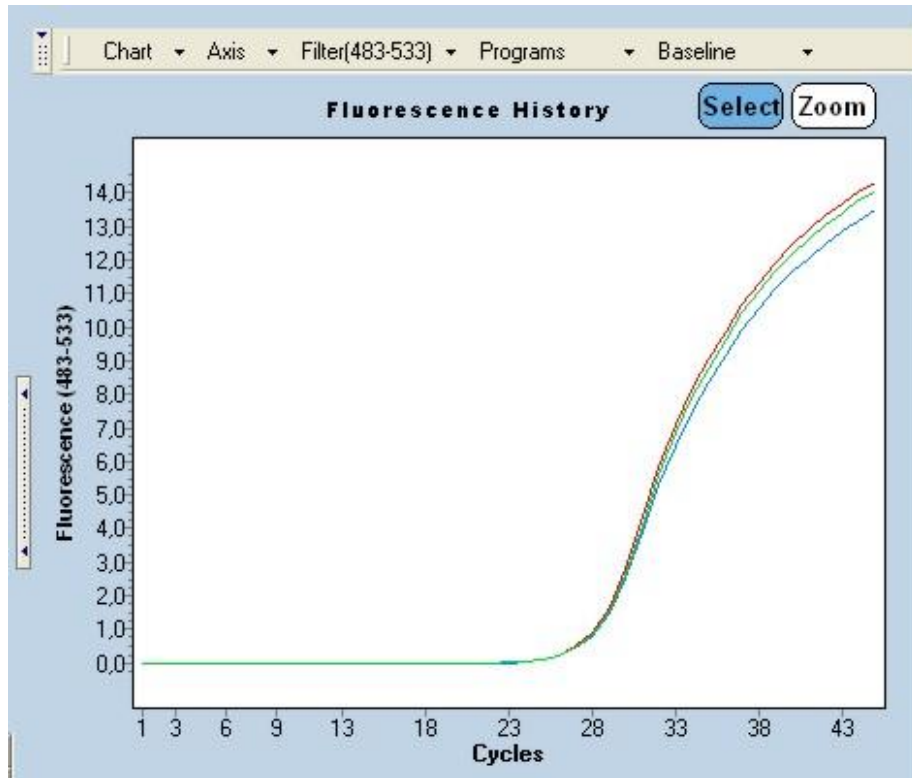
Krzywe amplifikacji – „surowe” dane



Odjęcie linii podstawowej

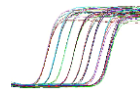
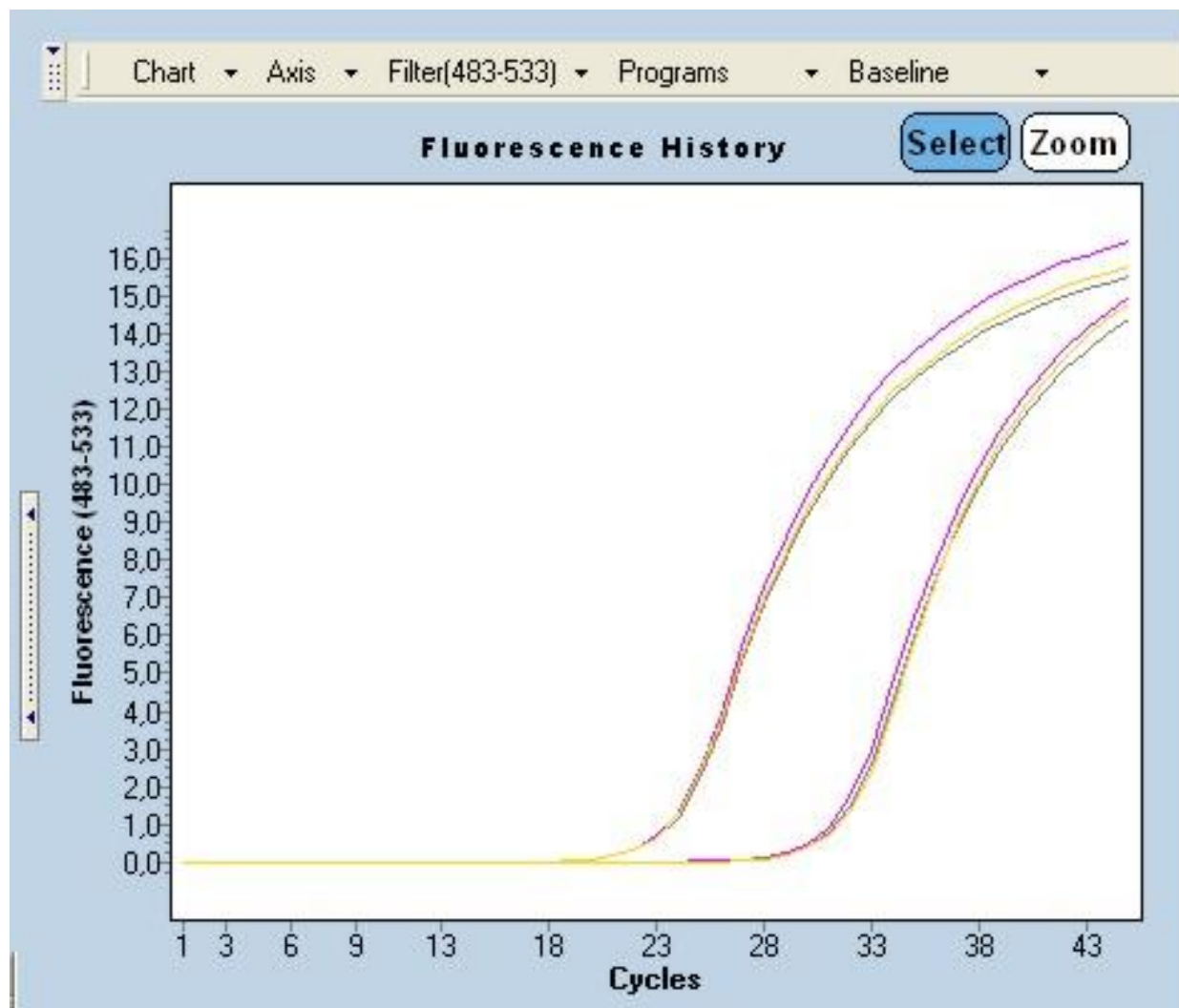


1 qPCR = 3 powtórzenia reakcji!!!



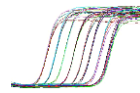
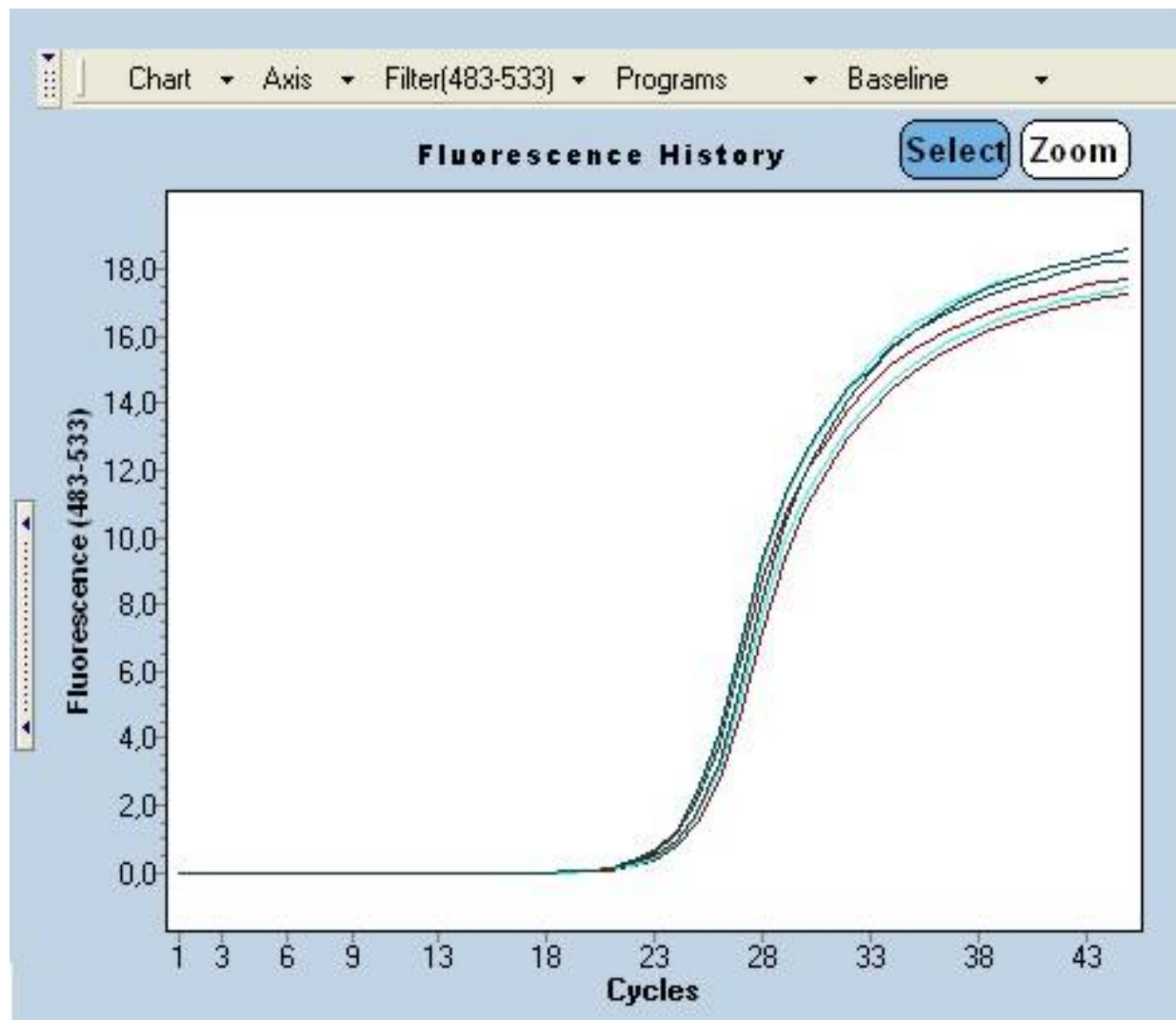
Inspekcja krzywych amplifikacji

Gen badany



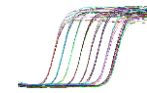
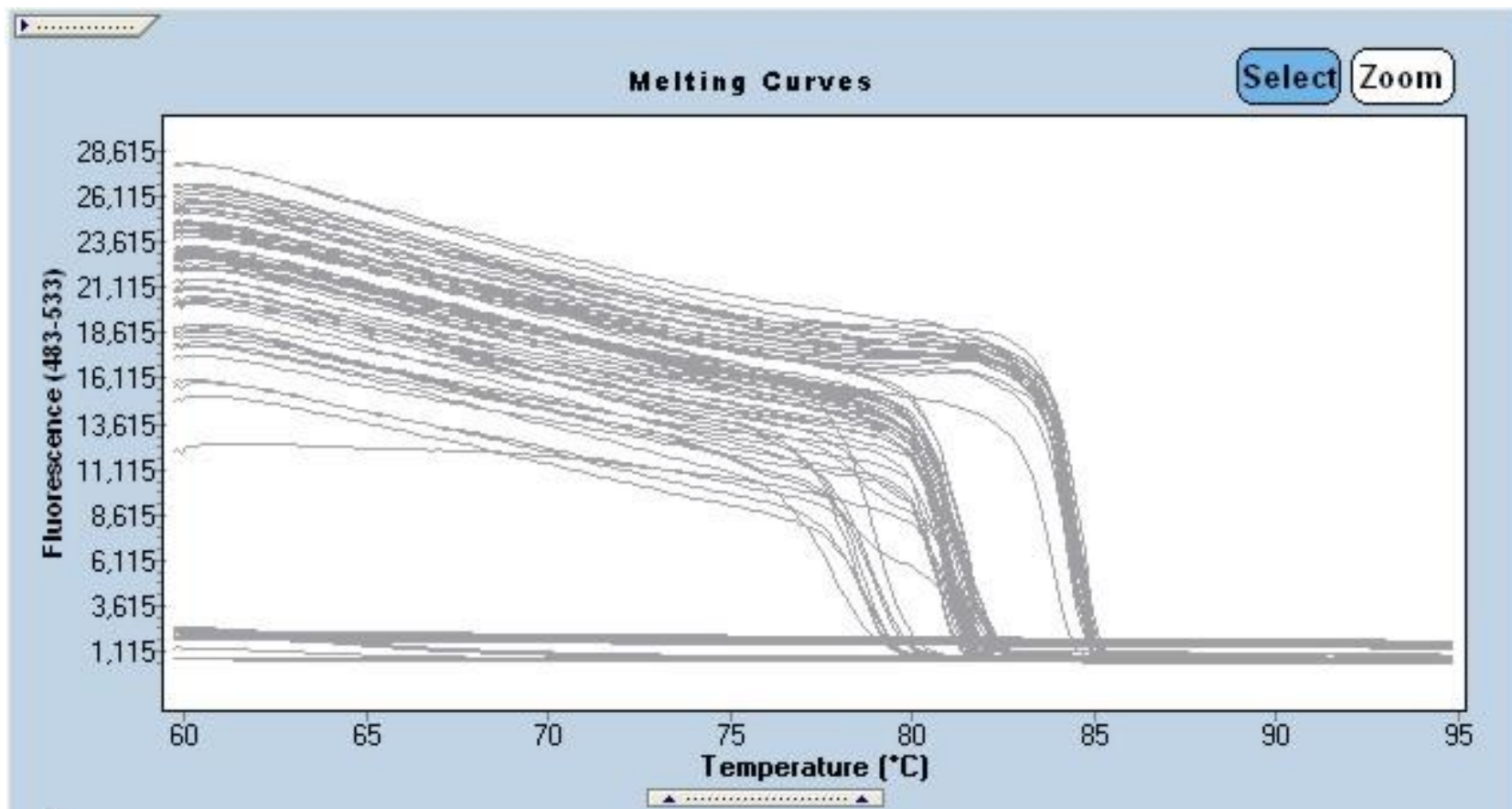
Inspekcja krzywych amplifikacji

Gen referencyjny



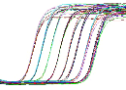
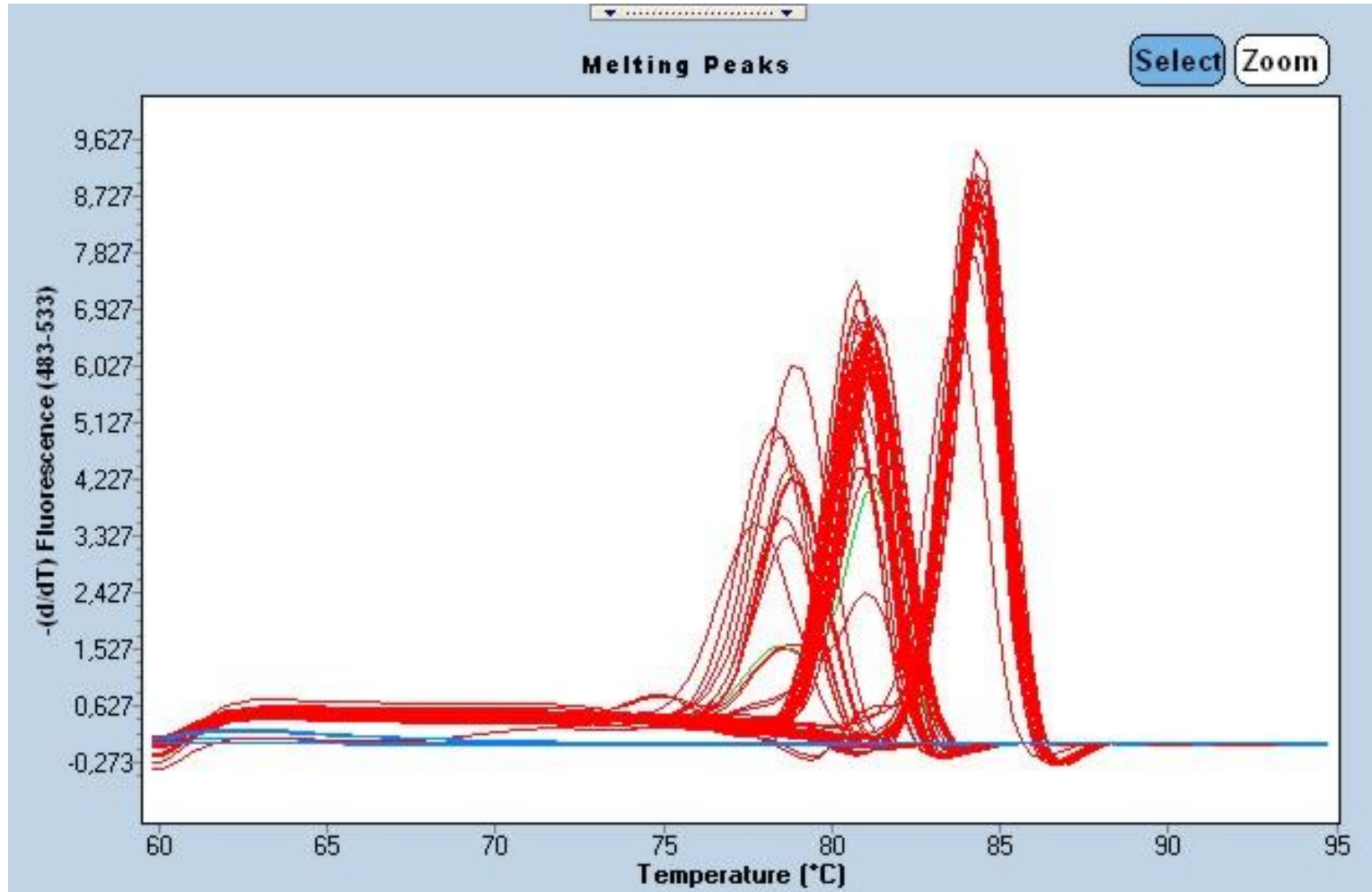
Analiza krzywych topnienia

Możliwa głównie dla SYBR Green



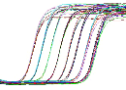
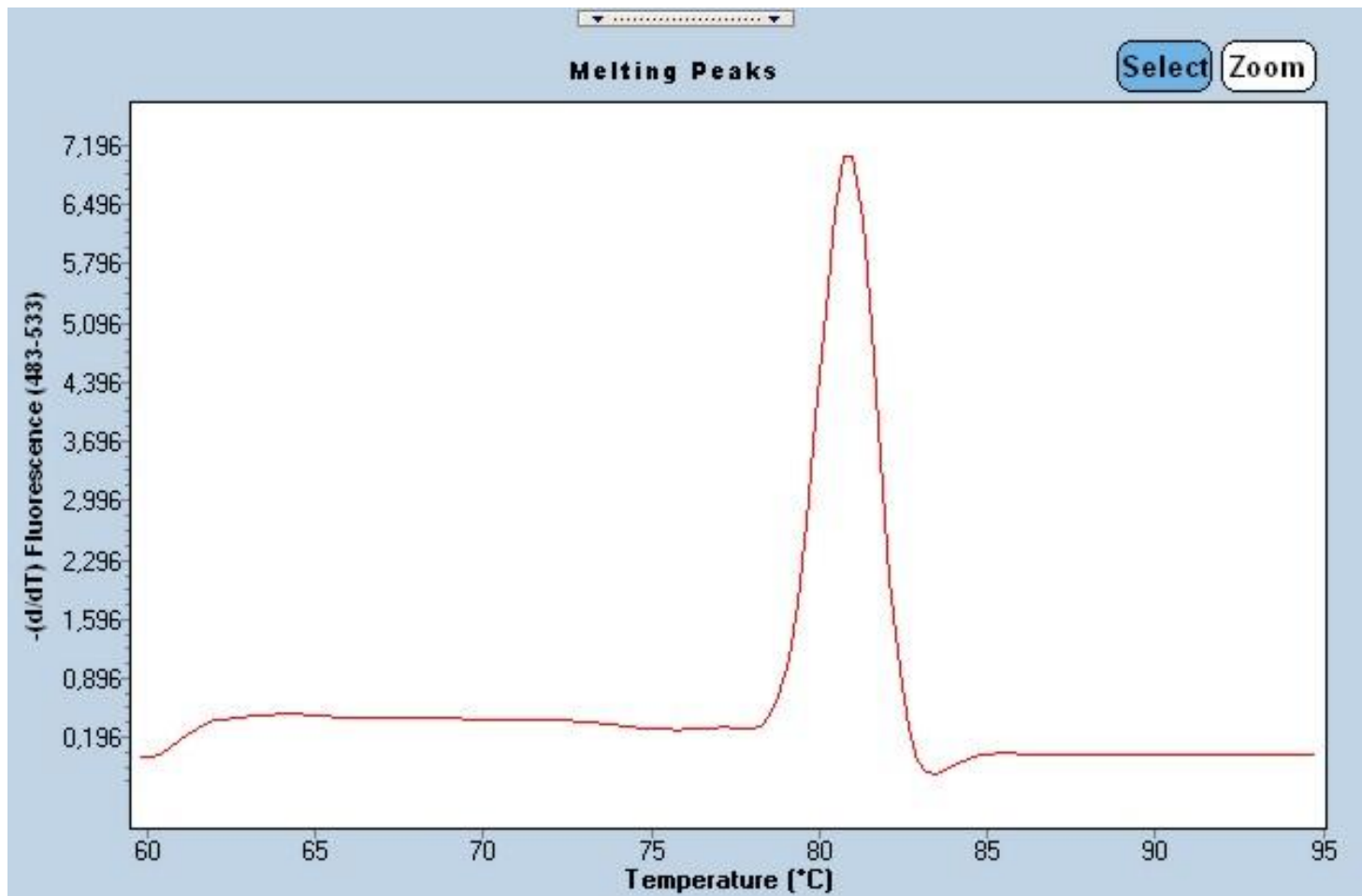
Analiza krzywych topnienia

T_m – wypadkowa długości i zawartości GC/AT



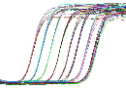
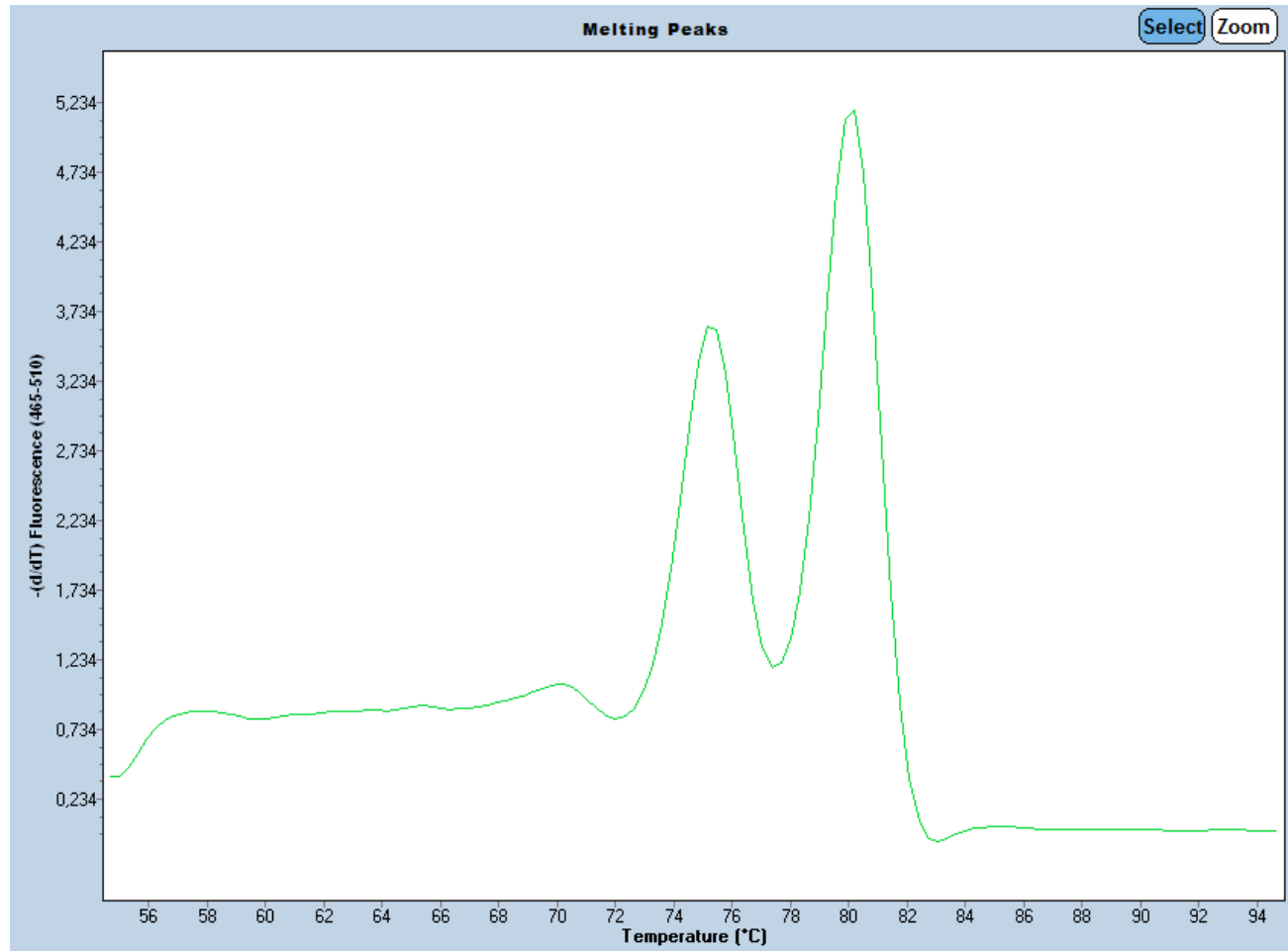
Analiza krzywych topnienia

Czysty produkt qPCR



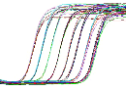
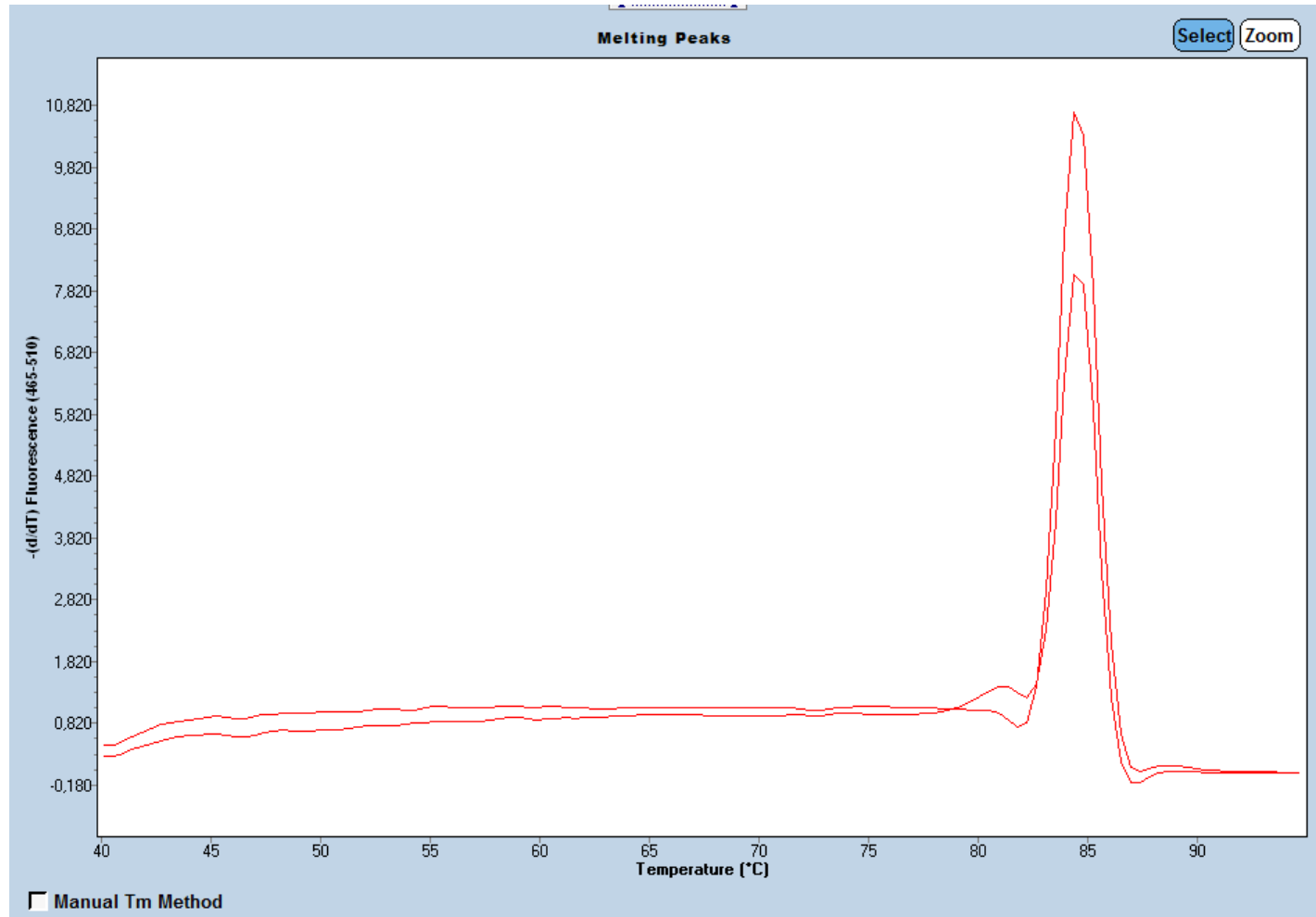
Analiza krzywych topnienia

Problem niespecyficznych produktów



Analiza krzywych topnienia

Problem „primer-dimer”

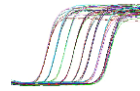


Analiza krzywych topnienia

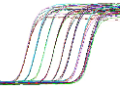
Nie wierzyć ślepo krzywym topnienia!!

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”.



Podsumowanie



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 Helleman,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) S1–S5



Contents lists available at ScienceDirect

Methods

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

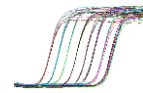


Mini-review

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

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

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547, USA





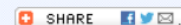
www.Gene-Quantification.info

The Reference in qPCR & dPCR - Academic & Industrial Information Platform

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



Amplify your knowledge in qPCR, dPCR and NGS -- follow our streaming server with 420 talks -- [eConferences.de](#)



GQ site search

ENHANCE

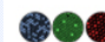


[MIQE & iBook / PDF NEW](#)
[Books & eBooks ... NEW](#)
[eConferences & Webinars](#)
[Quantification Strategy](#)
[Normalisation](#)
[qPCR & Optimisation](#)
[Bioinformatics & Statistics](#)
[Software Downloads](#)
[RNAi -- RNA interference](#)
[qPCR dPCR NGS Events](#)
[digital PCR & qPCR Array](#)
[Cyclers & Robotics](#)
[RNA & RT & RNA QC](#)
[Dyes & HRM dyes](#)
[Liquid Biopsy & Biomarkers](#)
[Molecular Physiology](#)
[qPCR Efficiency](#)
[qPCR & dPCR applications](#)
[GQ info portal](#)

[EV & Exosomes & EV RNA](#) / [Liquid Biopsy](#) / [Biomarker Discovery](#) / [Transcriptional Biomarkers](#) / [qPCR Evolution](#)
[BDQ](#) / [Protocols](#) / [Methods](#) / [Translation](#) / [ASIA portal](#) / [GQ Page Directory](#) / [qPCR Platform](#)
[Free access to 420 recorded talks](#) [Gene Quantification Events 2010-2019 ... UPDATE](#) / [Talks](#) / [Webinars](#) / [Podcasts](#)
Quantification strategies in RT-qPCR: [absolute Quantification](#) & [relative Quantification](#)
[RT-qPCR normalisation strategies](#) & [microRNA](#) / [Genom](#) / [BestKeeper](#) / [RefGenes ... UPDATE](#)
[real-time PCR](#) / [interesting reviews](#) / [MIQE & Apps & iBook ... NEW](#) / [Primer-Resources & Algorithms](#)
[Big Data in Biology ... NEW](#) / [qPCR data analysis](#) / [Regulatory Networks](#) / [data clustering](#) / [Integrated Analysis](#)
[REST \(main page\)](#) / [REST-2009](#) / [RDML](#) / [RefGenes](#) / [GenEx 7.0 ... NEW VERSION ... FREE DOWNLOAD](#)
[siRNA](#) / [saRNA](#) / [microRNA](#) & [microRNA normalisation](#) / [mirtron ... NEW](#) / [qPCR statistics](#)
[#GQ2019 Events & Workshops](#) / [qPCR dPCR NGS 2019](#) / [eConferences ... UPDATE](#) / [previous qPCR Events](#)
[digital PCR ... UPDATE](#) / [MIQE & dPCR ... UPDATE](#) / [qPCR array](#) / [normalisation and analysis software](#)
real-time PCR hardware: [overview of qPCR cyclers](#) / [qPCR robotics](#) / [page statistics](#)
[reverse transcription](#) / [mRNA transcript analysis ... UPDATE](#) / [RNA QC & RNA ... UPDATE](#) / [DNA integrity](#)
detection dyes, probes, and chemistries in real-time PCR / [HRM dyes](#) / [Chips & Lab-on-Chip](#)
[Exosomes](#) / [EV & Exosomal RNA ... UPDATE](#) / [CNA](#) / [microRNA](#) / [Transcriptional Biomarkers](#)
[CNA](#) / [HRM](#) / [CNV](#) / [microRNA](#) / [siRNA](#) / [saRNA](#) / [RNAi](#) / [digital PCR ... UPDATE](#) / [single-cell qPCR](#)
determination of [real-time qPCR efficiency](#) by various methods [... new efficiency papers](#) |
[Exosomes](#) / [CNA \(circulating nucleic acids\)](#) / [digital PCR ... UPDATE](#) / [single-cell handling](#) / [single-cell qPCR](#)
[microRNA ... UPDATE](#) / [CNV](#) / [microRNA transfer](#) / [HRM](#) / [RNA interference](#) / [siRNA](#) / [saRNA](#) / [Liquid Biopsy](#)



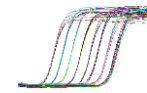
Crystal
Digital PCR
with the
Naica System



Learn More

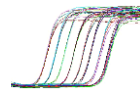


Gene
Quantification
Newsletter
is sponsored by

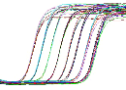


PODSUMOWANIE

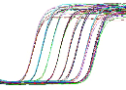
- qPCR to bardzo wydajna, szybka i dokładna metoda kwantyfikacji kwasów nukleinowych
- Umożliwia nisko i średnioprzepustowe badania ekspresji genów
- Oparta o detekcje DNA barwnikami fluorescencyjnymi w czasie rzeczywistym reakcji
- $(1+E)^n$, czyli 2^n jeżeli $E=100\%$ ($2^{\Delta\Delta C_t}$)
- Bardzo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

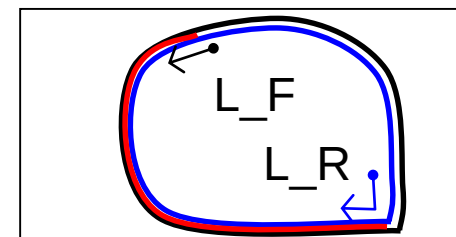
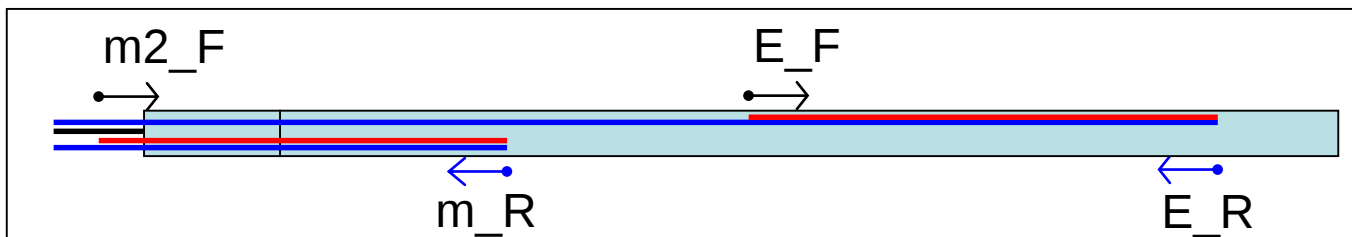
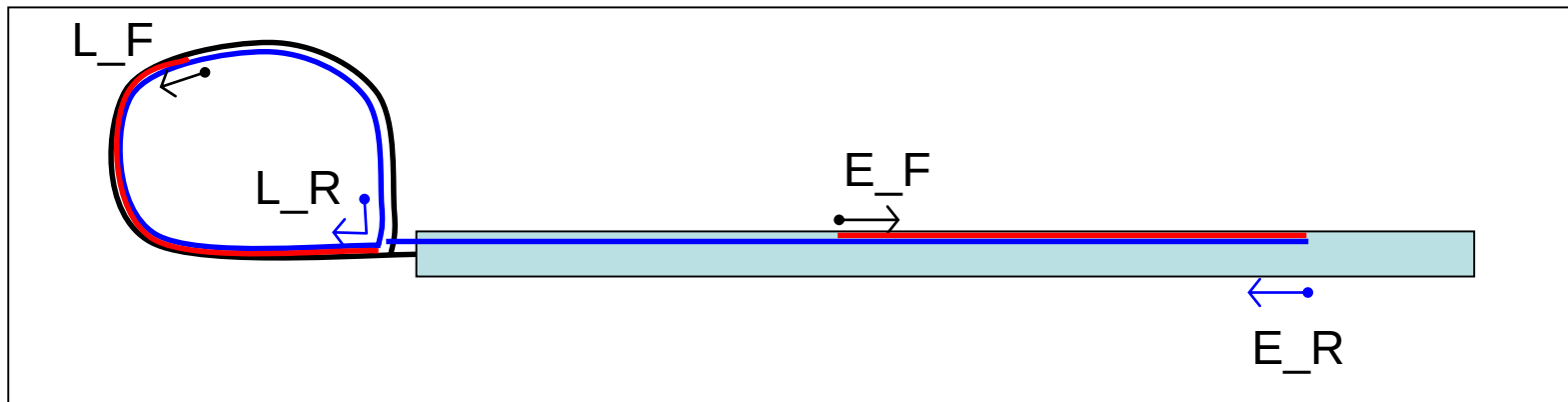
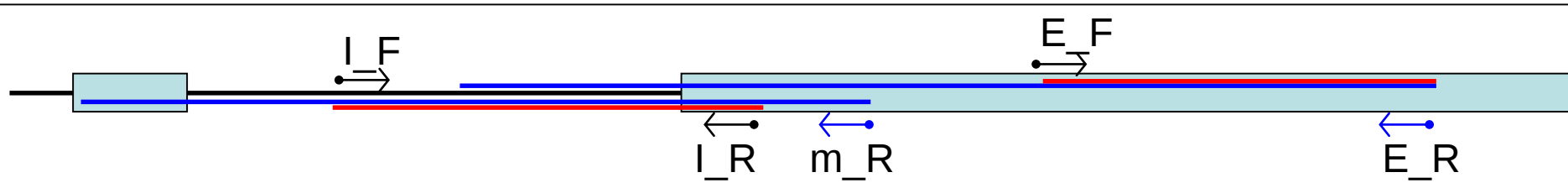
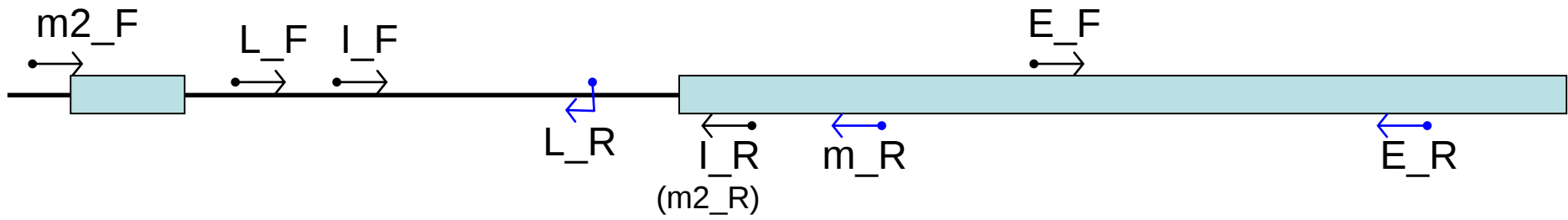


Dziękuję za uwagę



Suplement 1- przykłady zastosowania qPCR





qPCR z zawartości pojedynczej komórki

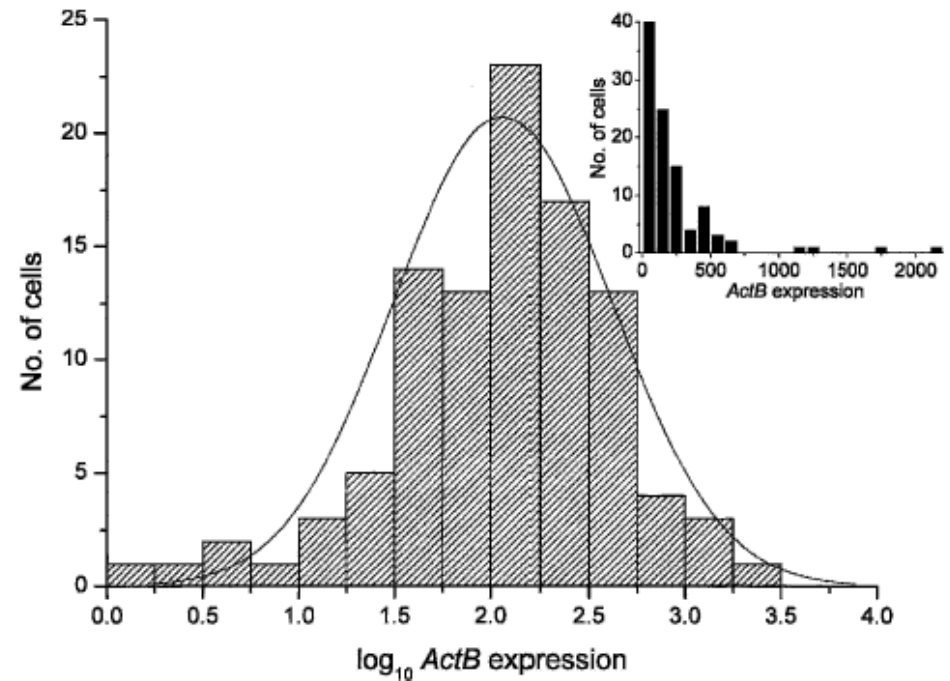
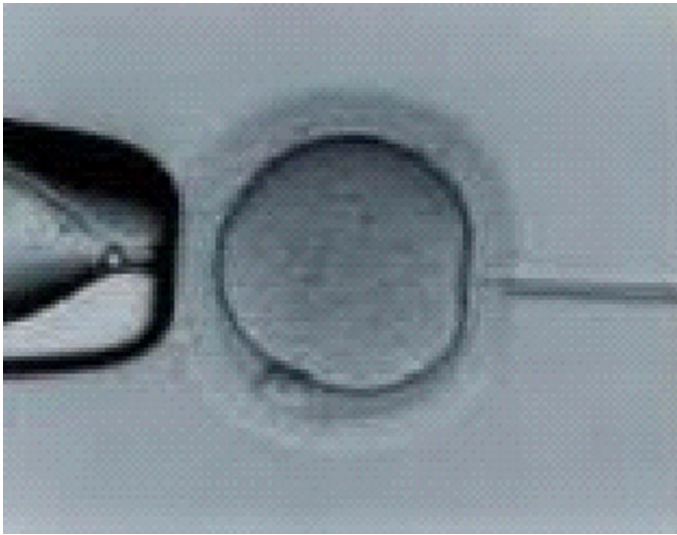
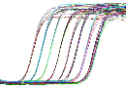
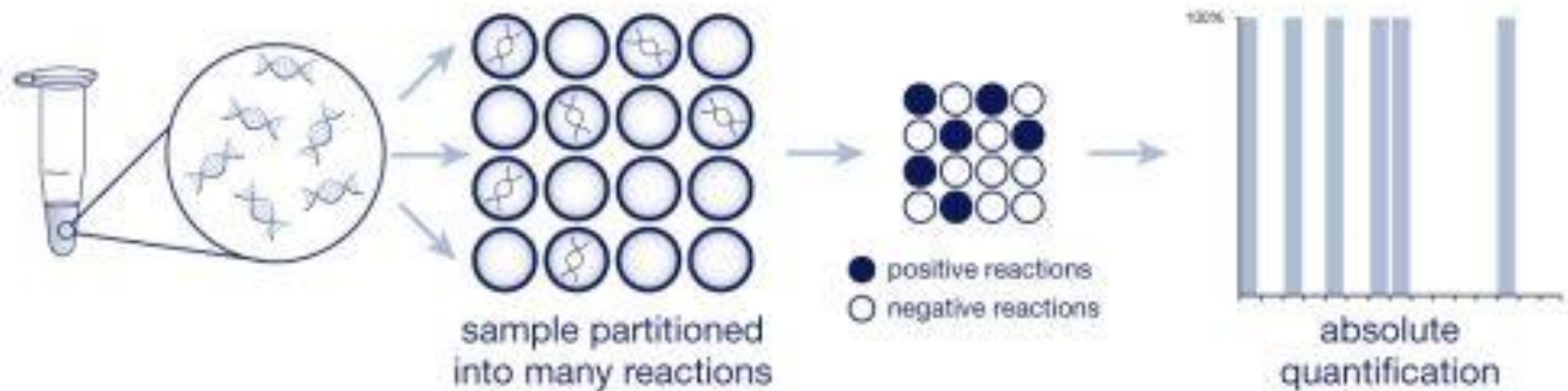


Figure 1. Histograms showing the expression levels of 96 cells expressing *ActB* in logarithmic and linear scale (*inset*). Logarithms of transcript levels are mean-centered for the two glucose concentrations. Solid line describes lognormal distribution centered on the geometric mean (2.06) of the *ActB*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

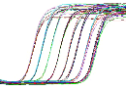
Bengtsson M, Stahlberg A, Rorsman P, Kubista M.
Genome Res. 2005 Oct;15(10):1388-92.



Digital PCR - dPCR



	Absolute Quantification (Digital PCR Method)	Absolute Quantification (Standard Curve Method)
Overview	In absolute quantification using Digital PCR, no known standards are needed. The target of interest can be directly quantified with precision determined by number of digital PCR replicates. Quantify copies of rare allele present in heterogenous mixtures.	In absolute quantification using the Standard Curve Method, you quantitate unknowns based on a known quantity. First you create a standard curve; then you compare unknowns to the standard curve and extrapolate a value.
Example	Count the number of cell equivalents in sample by targeting genomic DNA. Determine absolute number of viral copies present in a given sample without reference to a standard.	Correlating viral copy number with a disease state.



dPCR – przykładowe, dostępne platformy

Biorad QX200

Możliwe przygotowanie 1-8 prób jednocześnie

Do 20 000 reakcji / próbę

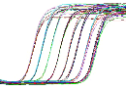
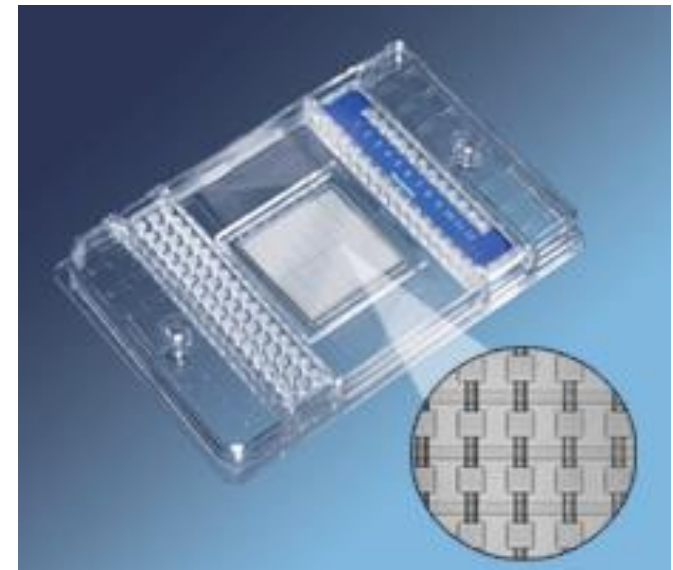
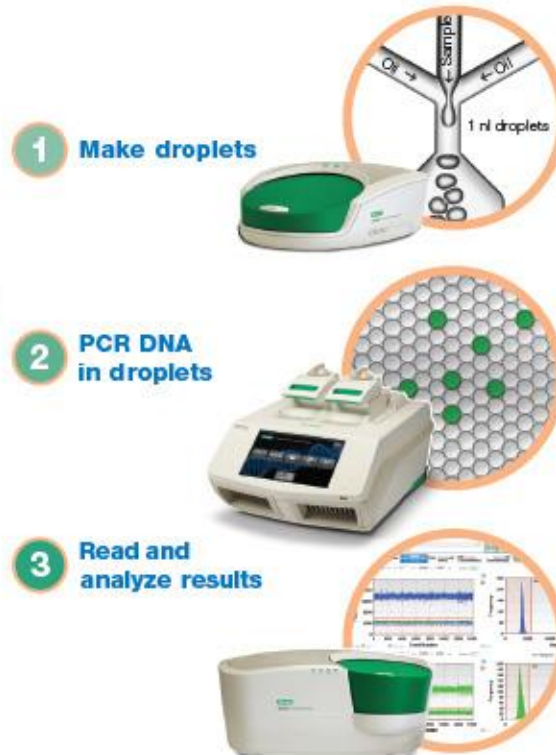
Możliwe odczytanie do 96 prób jednocześnie

Fluidigm Biomark HD

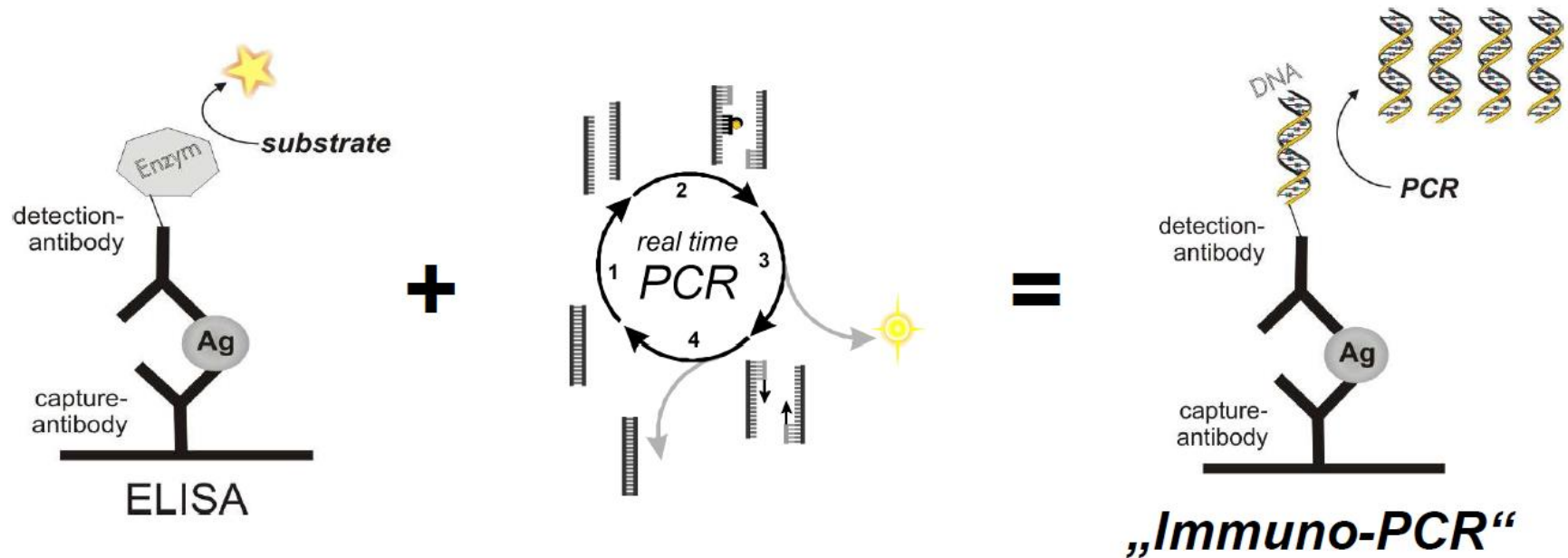
(także masowy qPCR!)

Od 2 304 do 36 960 niezależnych reakcji

(np. układy 48x48, 192x24, 48x770)

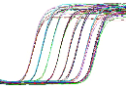


Immuno-qPCR

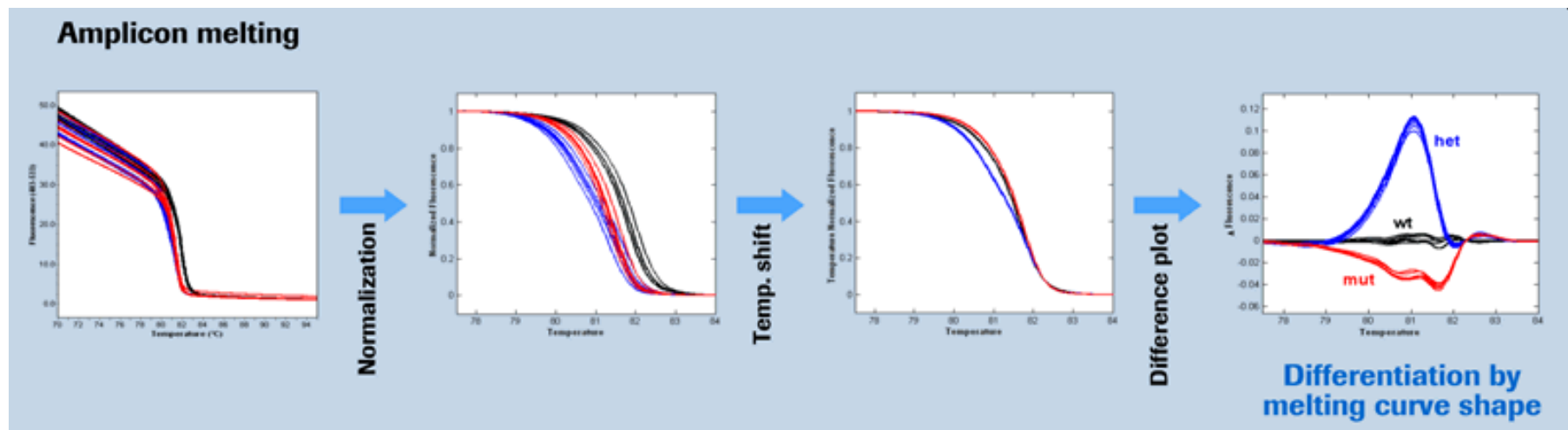


T. Sano, C.L. Smith, C.R. Cantor, *Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates*, Science 258 (1992), 120-122

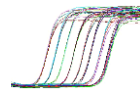
Za: M. Niemeyer; qPCR 2007



Analiza wysokorozdzielczych krzywych topnienia

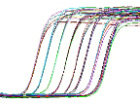


Za Roche

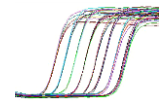
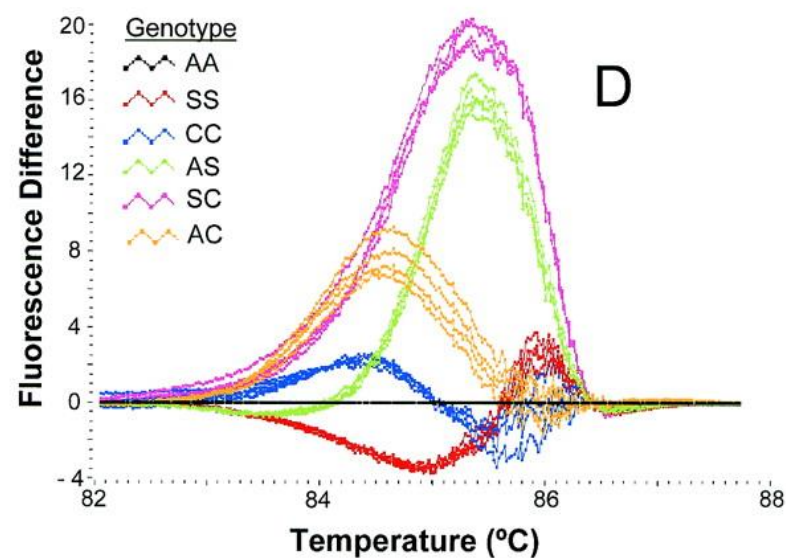
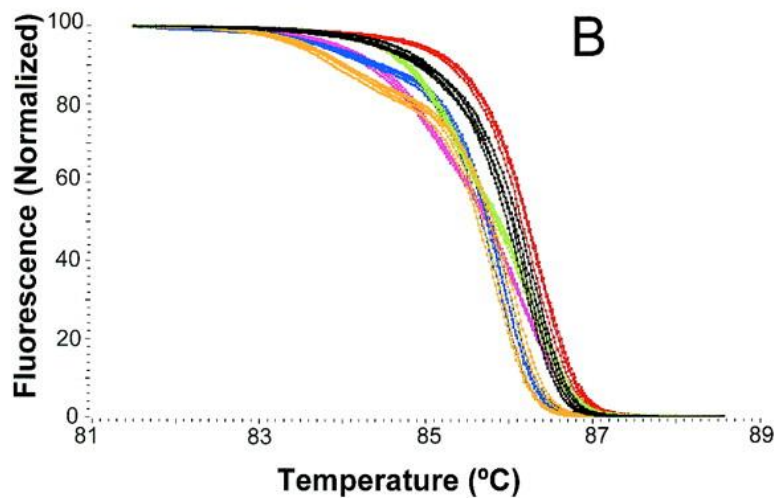
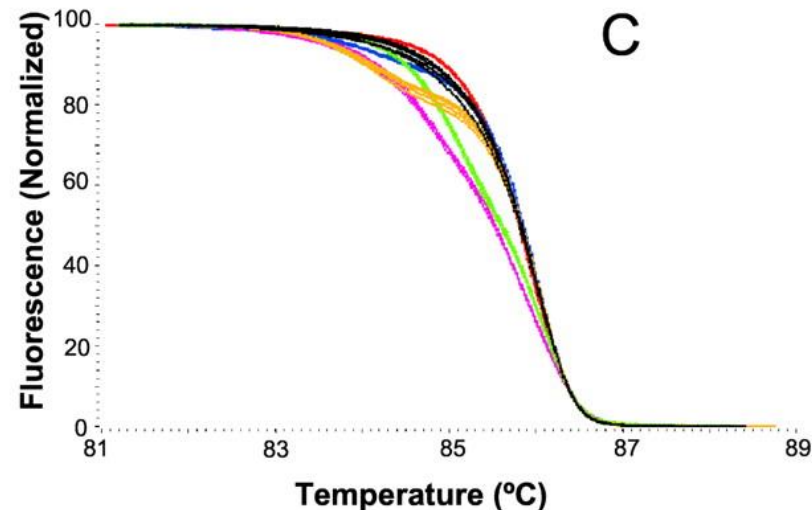
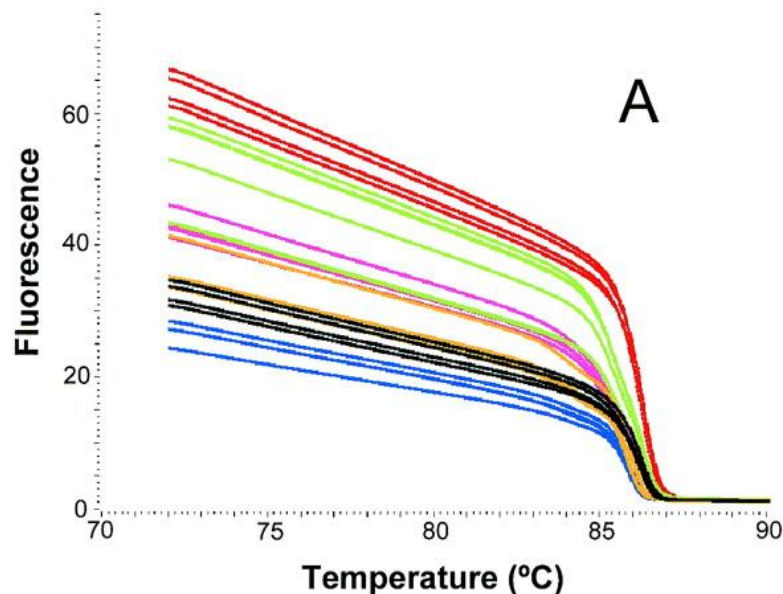


Analiza HRM = High Resolution Melting

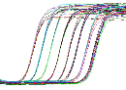
- Zamiast SYBR Green barwniki **SATURUJĄCE DNA!!!**
- Rozdzielczość do 50 pomiarów / 1°C
- Amplikony różnej długości
- Wydajność nie ma znaczenia: **analiza end-point!**
- Standaryzacja stężeń matrycy mniej istotna



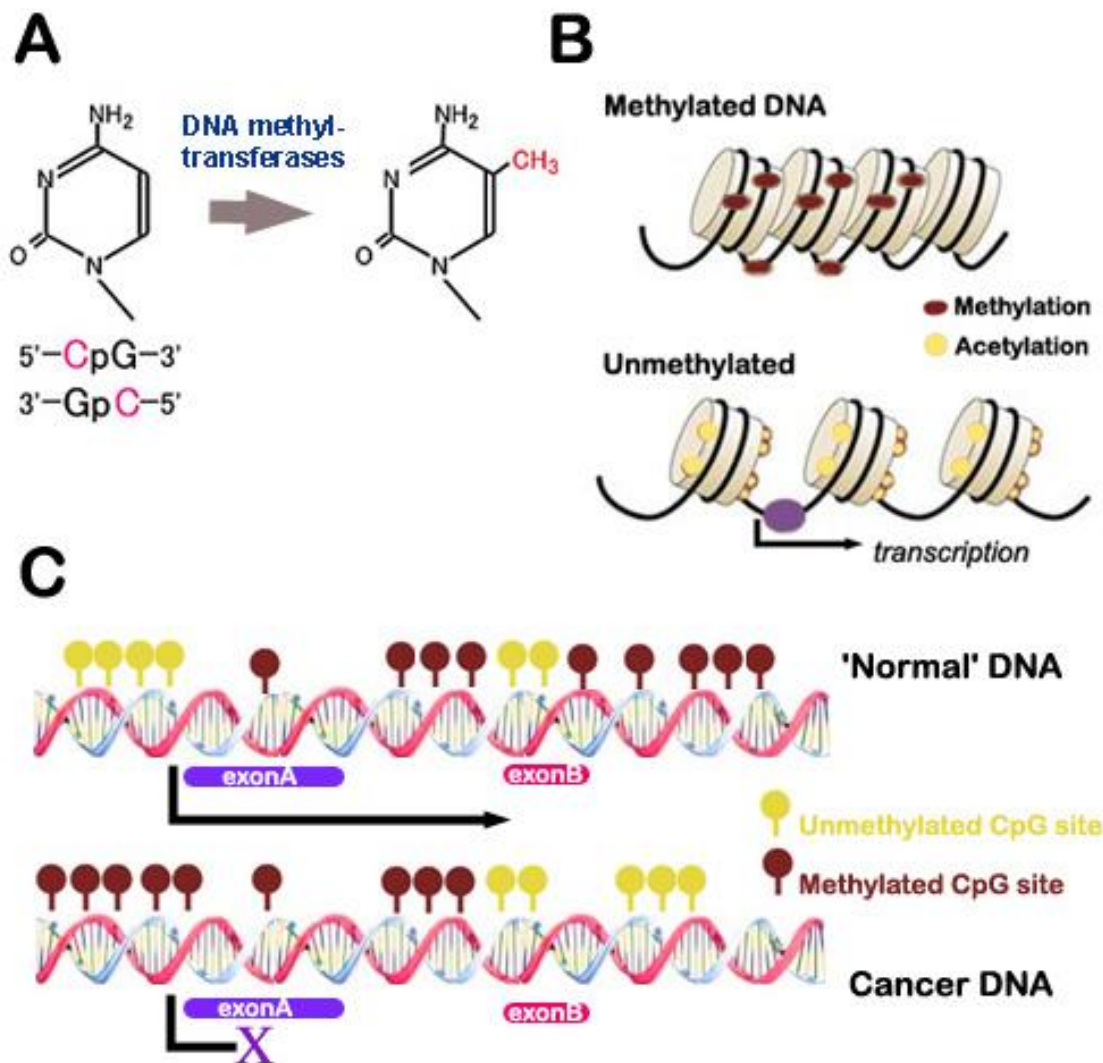
Analiza HRM = High Resolution Melting



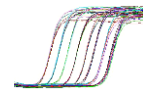
Suplement 2 – wykorzystanie qPCR do analizy statusu metylacji chromatyny



Metylacja DNA wycisza transkrypcję

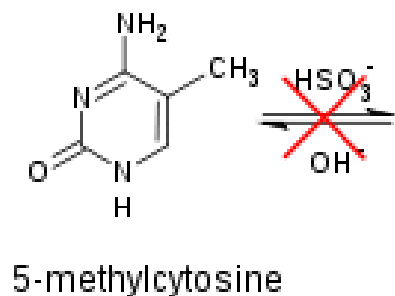
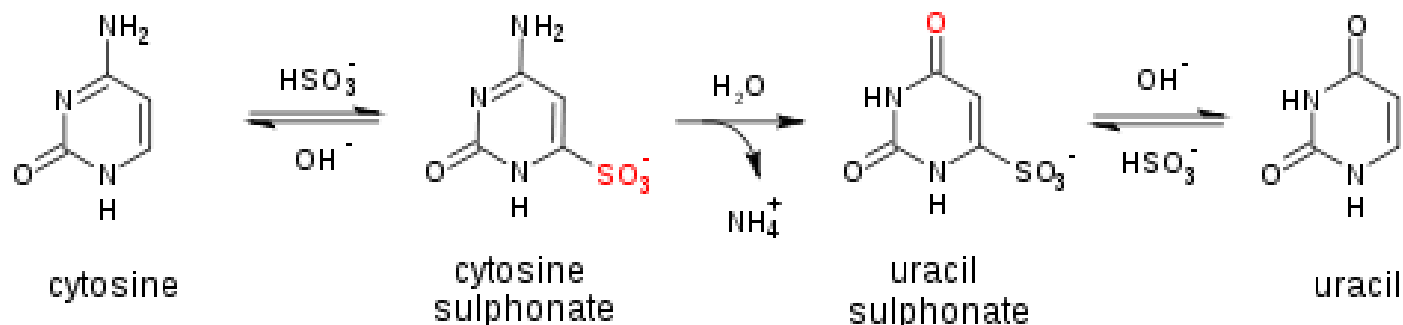


<http://philos.biol.mun.ca>



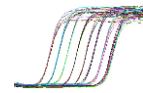
Traktowanie DNA dwusiarczkiem sodu

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

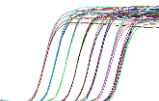
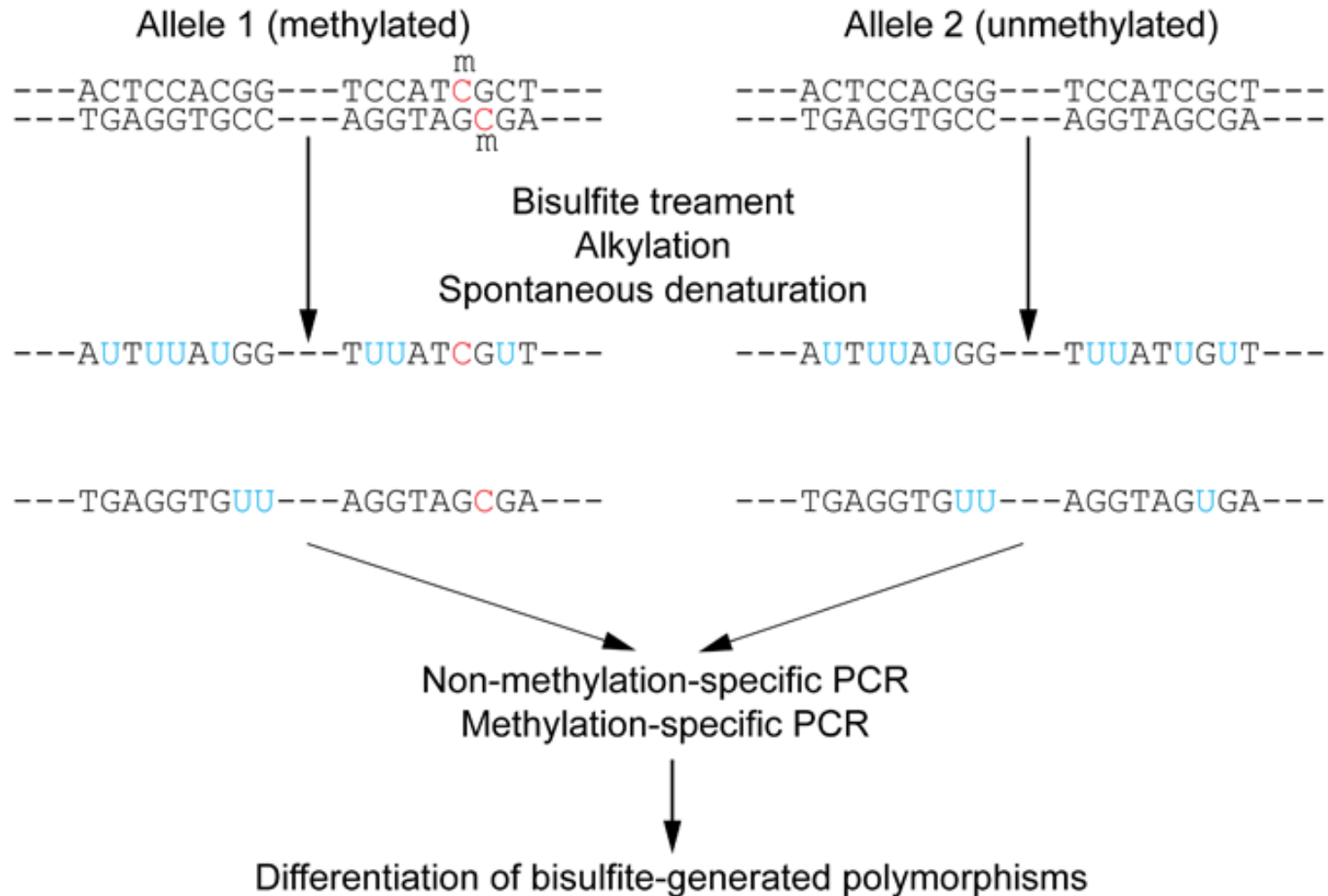


Wady:

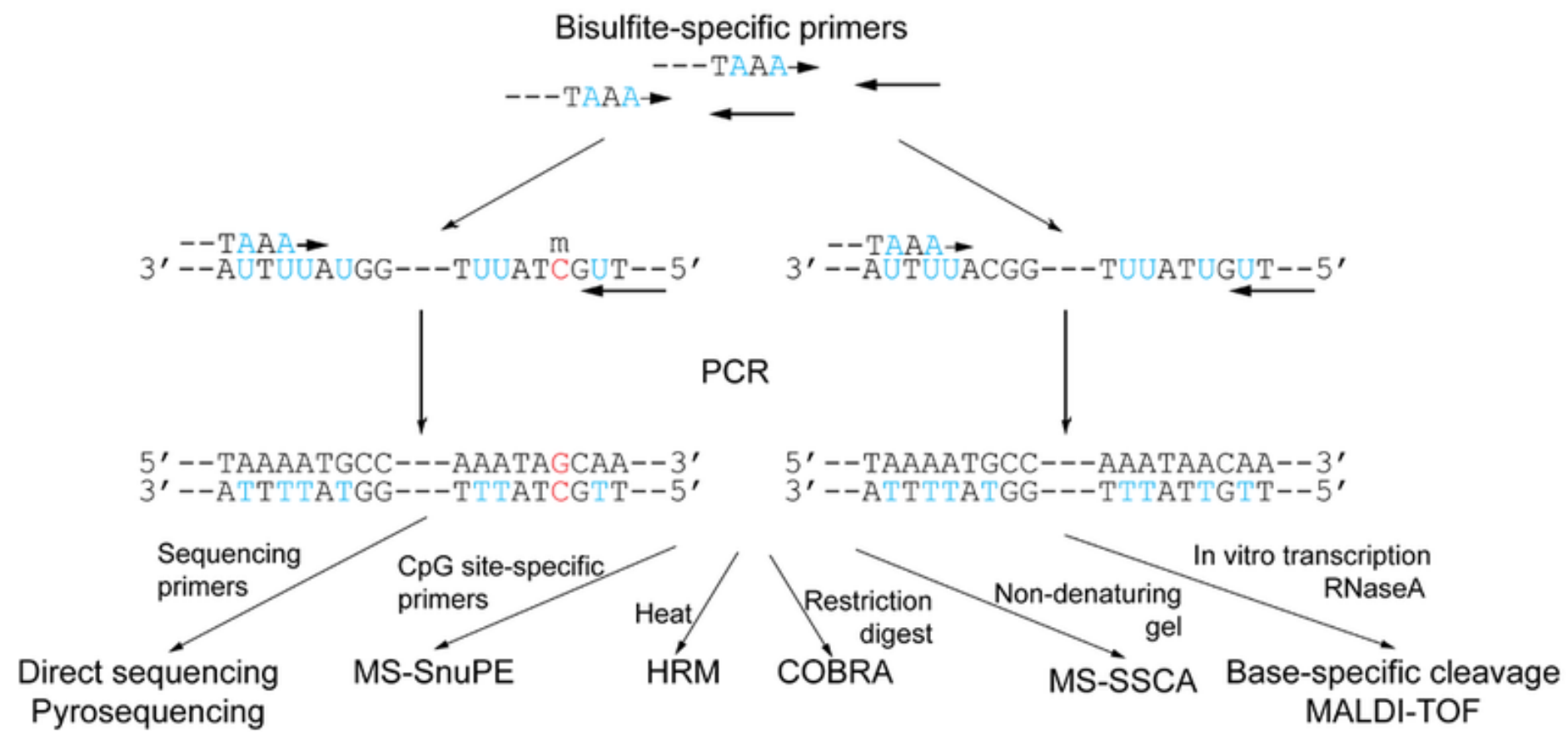
- niewydajna konwersja
- degradacja DNA



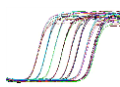
Traktowanie DNA dwusiarczkiem sodu



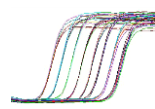
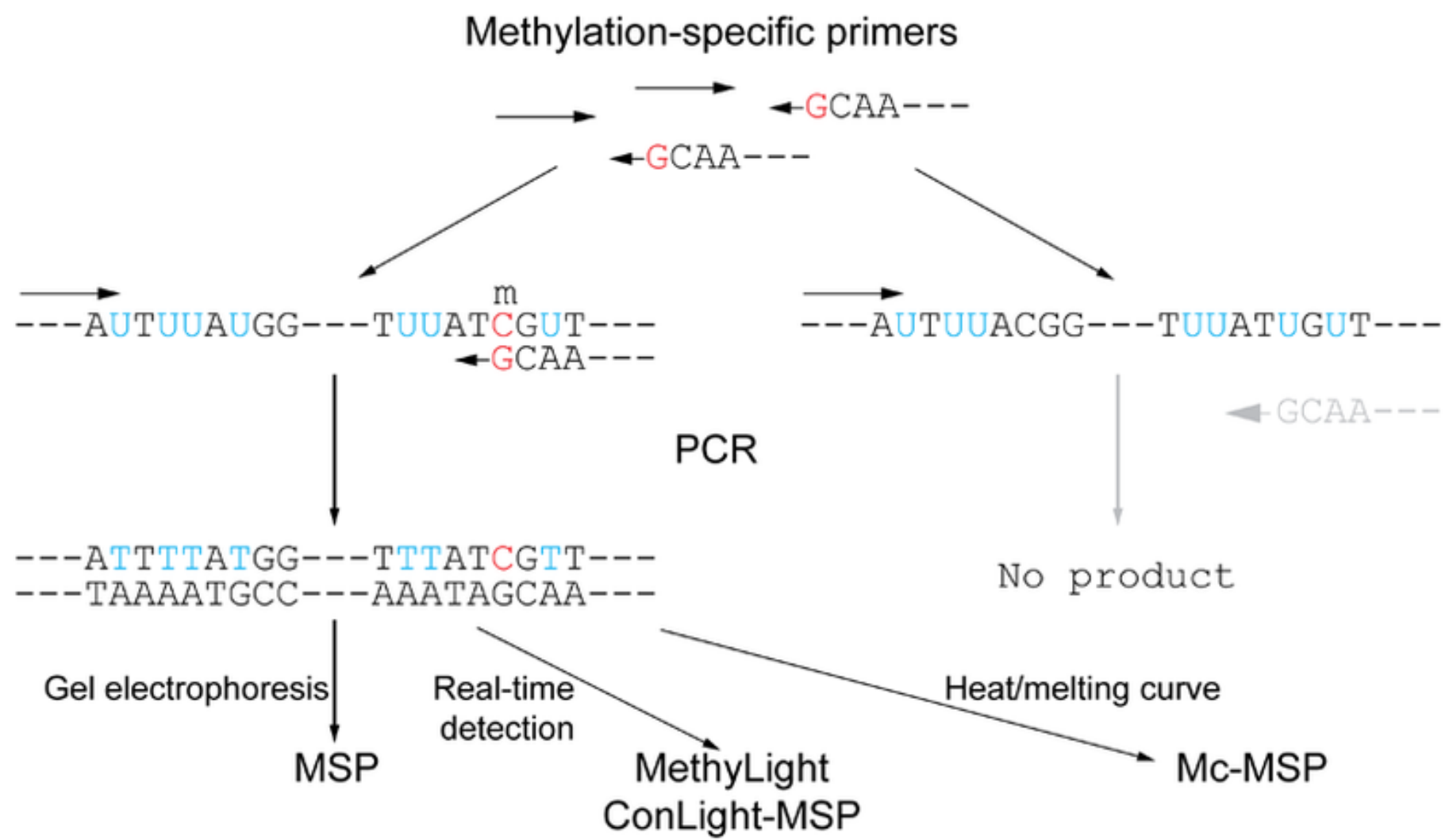
Analizy Met-DNA



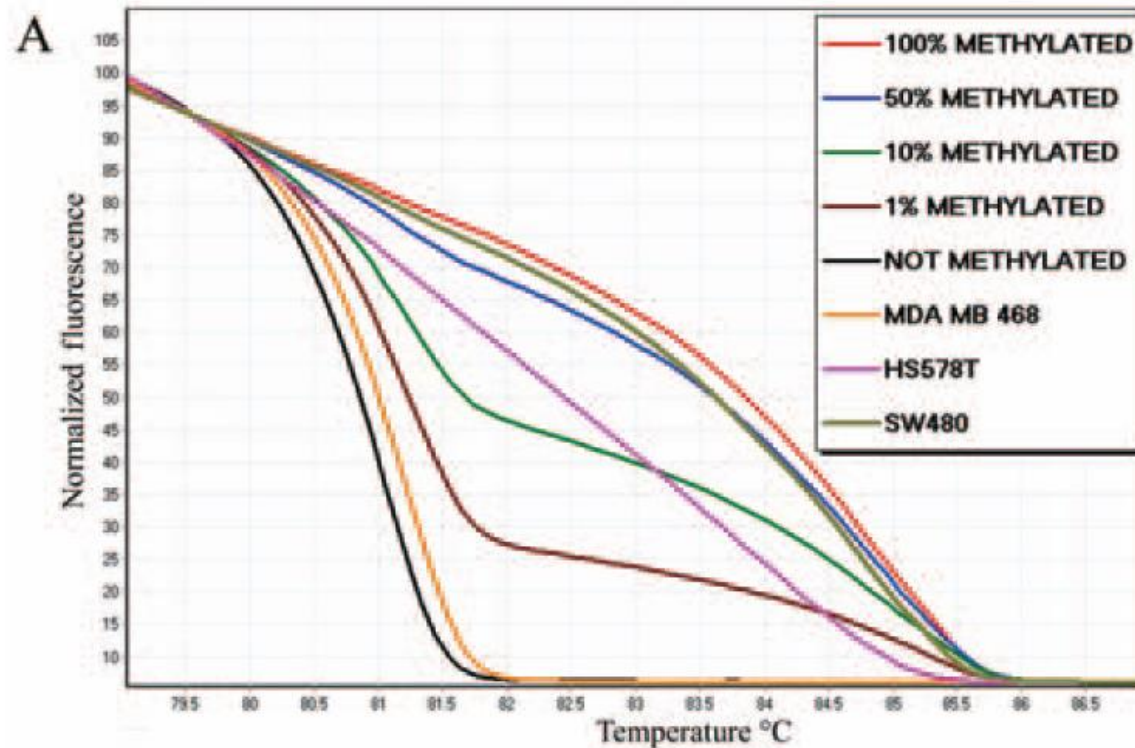
Za: Wikipedia, Bisulfite sequencing



Analizy Met-DNA



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



Published online 8 February 2007

Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 6 e41
doi:10.1093/nar/gkm013

Methylation-sensitive high-resolution melting

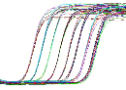
Tomasz K Wojdacz^{1,2}, Alexander Dobrovic² & Lise Lotte Hansen¹

¹Institute of Human Genetics, University of Aarhus, The Bartholin Building, Wilhelm Meyers Allé, Bygn. 1242, DK-8000 Aarhus C, Denmark. ²Department of Pathology, Peter MacCallum Cancer Centre, Locked Bag 1, A'Becket Street, Victoria 8006, Australia. Correspondence should be addressed to T.K.W. (wojdacz@humgen.au.dk).

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^{1,3,*}

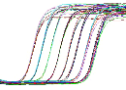
NATURE PROTOCOLS | VOL.3 NO.12 | 2008 | 1903



Suplement 3 – wykorzystanie RT-qPCR w diagnostyce zakażeń koronawirusem SARS-CoV-2

Zapraszam do obejrzenia wykładu:

<https://www.youtube.com/watch?v=SNvGQJIcQfQ>



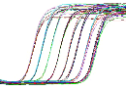
Suplement 4 –

standaryzacja,

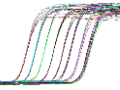
projektowanie układu

doświadczenia

i optymalizacja reakcji



Standaryzacja

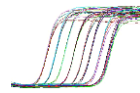


Wybór genu referencyjnego

NIE ISTNIEJE „DOSKONAŁY” GEN REFERENCYJNY!!!

- Równa ilość kopii RNA we wszystkich komórkach
- Ekspresjonowany we wszystkich komórkach
- Ekspresjonowany 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,

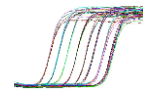


Analiza statystyczna wariacji wartości Ct dla genów referencyjnych

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

						
Change Data	GAPD	ACTB	HPRT1	UBC	YHWAZ	Normalisation
FIB1	0,516257	0,499303	0,402906	0,447207	0,572560	0,5020
FIB2	0,287796	0,238713	0,313899	0,221805	0,351638	0,2787
FIB3	0,160974	0,262108	0,147588	0,177935	0,306647	0,2024
FIB4	0,462392	0,151078	0,284928	0,372176	0,221805	0,2774
FIB5	0,694914	0,678860	0,765572	0,572560	0,851906	0,7066
FIB6	0,001146	0,000160	0,000765	0,000377	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	0,169808	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	0,0159
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	0,6320
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	0,983443	0,8858
FIB18	0,514536	0,504330	0,533786	0,590028	0,467047	0,5204
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	

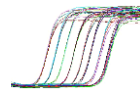
Vandesompele et al., Genome Biology, 2002,



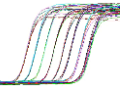
Wybór genu referencyjnego

Ewentaulanie...

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

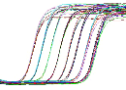


Projektowanie układu doświadczenia



Akumulacja błędu

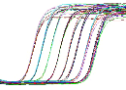
$$SD_{mRNA}^2 = SD_{RT}^2 + SD_{QPCR}^2$$



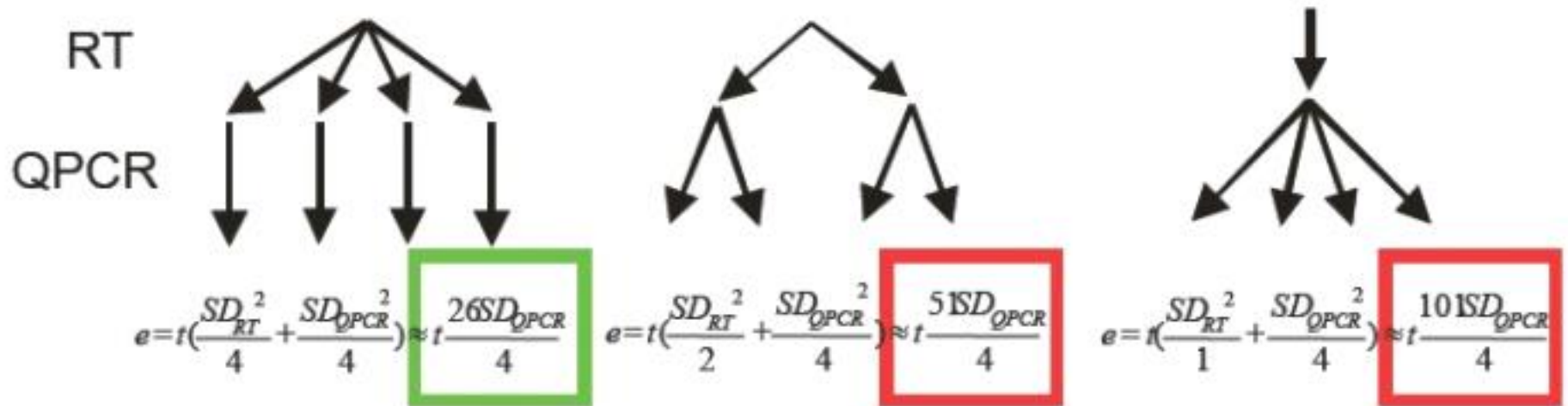
2 schematy układu doświadczeń

- Metoda „maksymalizacji prób”: jak najwięcej różnych prób analizowanych w podczas jednego uruchomienia urządzenia. Czyli różne geny analizowane w różnych reakcjach (preferowana w rutynowej pracy badawczej – wiele warunków hodowli, wiele mutantów, itp.).
- Metoda „maksymalizacji genów”: jak najwięcej różnych par starterów podczas jednego uruchomienia urządzenia (preferowana w komercyjnych zestawach diagnostycznych: jeden pacjent – jedna płytka z reakcjami dla wielu genów)
- Bez względu na wybór metody należy stosować IRC

Hellemans et al., Genome Biology, 2007,

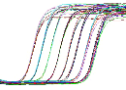


Ile powtórzeń biologicznych, RT, qPCR?

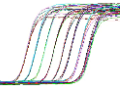


Ref: Ståhlberg *et.al.* Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification Clin Chem 2004;50:3

TATAA Biocenter

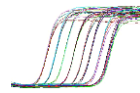


Optymalizacja reakcji qPCR

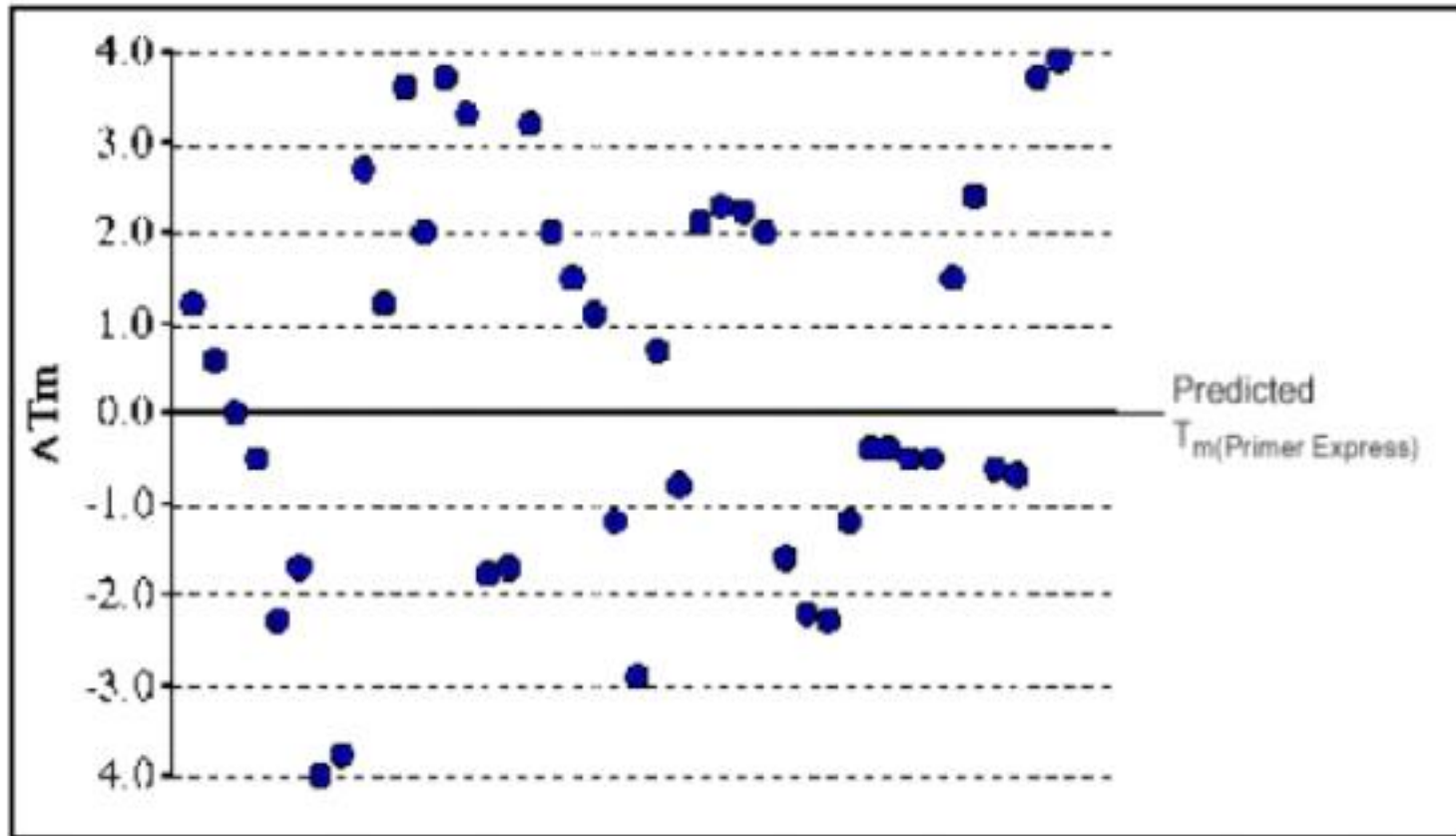


Optymalizacja reakcji qPCR

- Optymalizacja warunków reakcji: stężeń 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

