

Real-Time RT-PCR (QPCR)

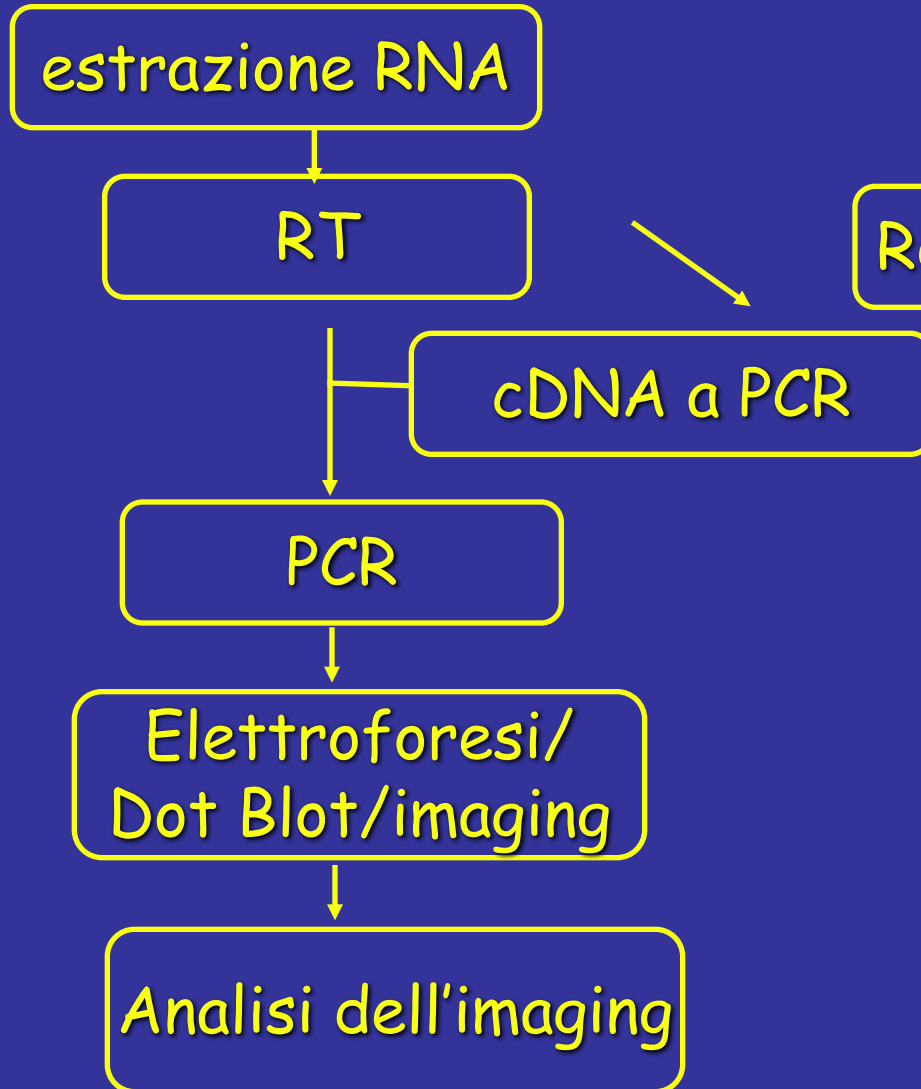
quantitative

Metodi in uso comune per rilevare/quantificare trascritti

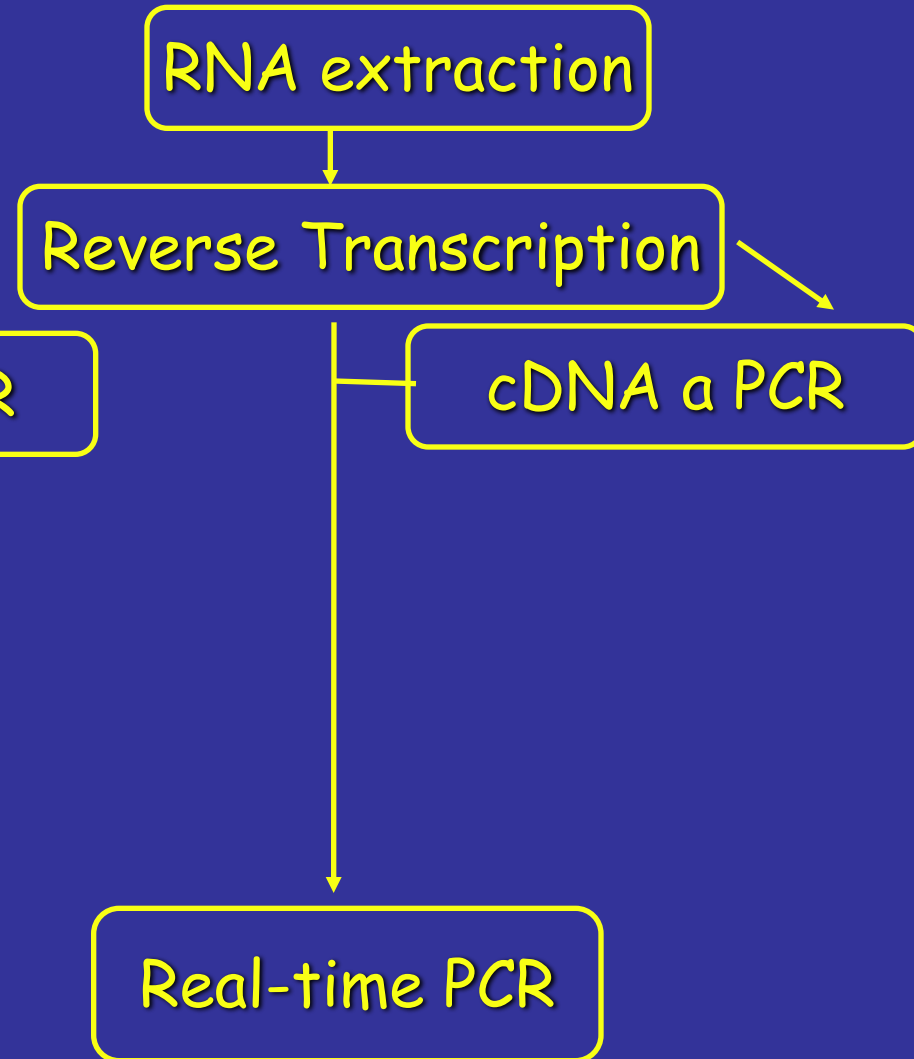
- Northern blotting e ibridazione in situ
- 2. RNase protection assays
- 3. cDNA microarrays
- 4. RT-PCR in end-point o real-time

Quantificazione con RT-PCR

Convenzionale



Real-time

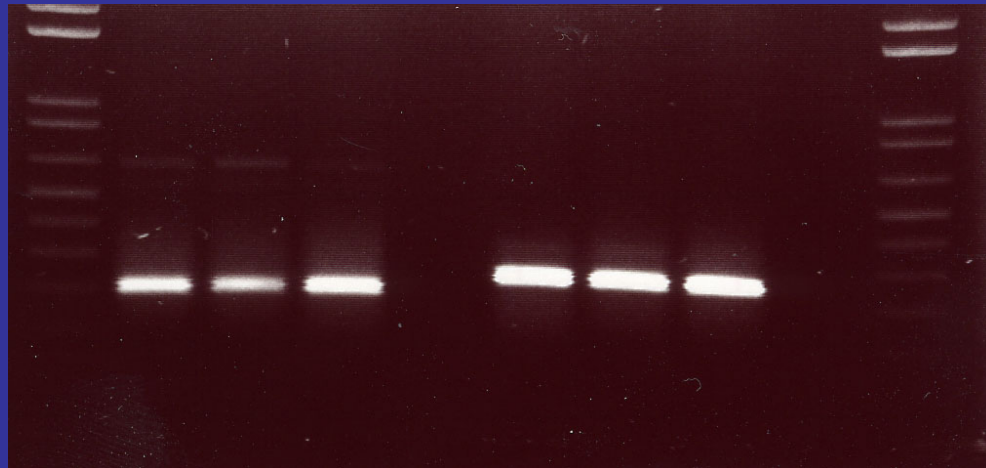


Possibilità per un saggio RT-PCR

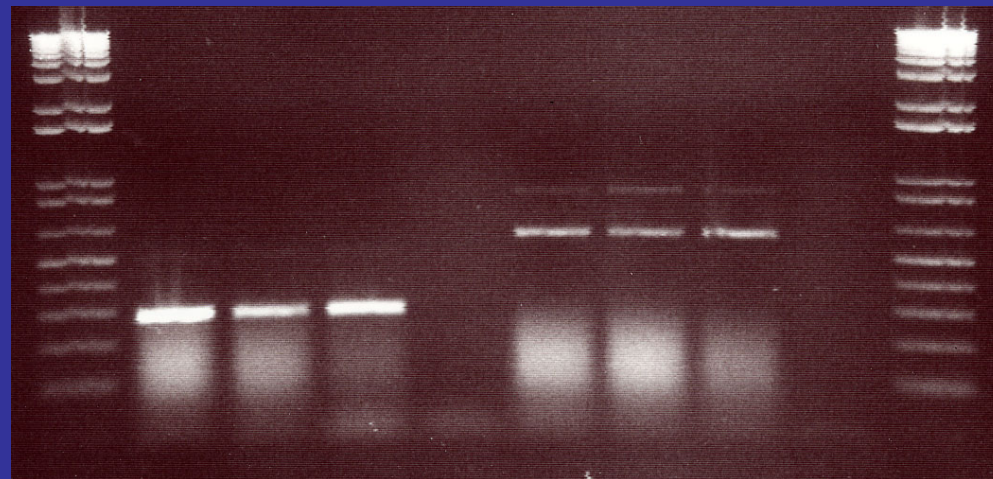
1. Un enzima-1 provetta. *Tth* polymerase attività intrinseca di RT (Roche; uses Mn^{2+})
2. Due enzimi-1 provetta. (Stratagene 1-step QRT-PCR Master Mix; Qiagen QuantiTect Probe RT-PCR Kit)
3. Due enzimi-2 provette. AMV-RT o MMLV-RT H⁻, Taq polymerase. (Stratagene Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix; Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR Kit; ABI SYBR Green PCR Core Reagents)

Specificity with dsDNA dyes depends on RNA preps

Trattamento
con DNase



Senza
DNase



Vantaggi del sistema real-time

- VELOCITA'
- SENSIBILITA'
- VARIABILITA' RIDOTTA
- REAZIONI MULTIPLE
- NON MANIPOLAZIONE DEI
POSTAMPLIFICATI
- POSSIBILITA' DI EFFETTUARE
QUANTIFICAZIONI RELATIVE O
ASSOLUTE

METODI DI QUANTIFICAZIONE

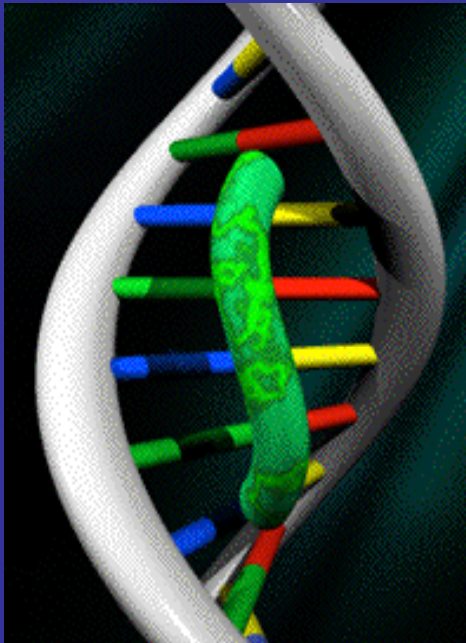
La **quantificazione assoluta** → determina l'esatto numero di copie generalmente riferendo il prodotto di PCR ad una curva di standardizzazione. La **quantificazione relativa** quantifica in relazione ad un controllo. L'analisi quantitativa relativa di espressione genica è più veloce

STRUMENTAZIONE

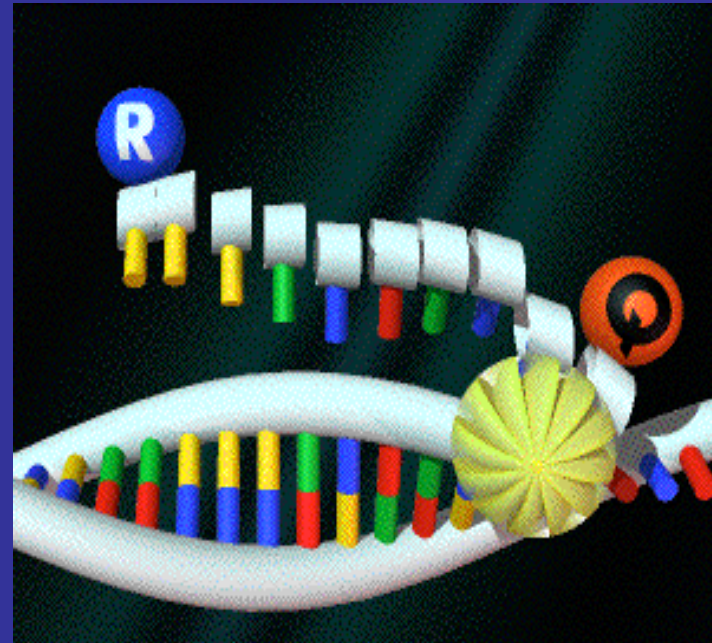
Termocycler interfacciato ad un sistema capace di indurre e leggere la fluorescenza. La stimolazione dell'emissione in fluorescenza viene indotta da un laser. La rilevazione di λ da 500 a 660 nm permette di effettuare analisi in multiplex PCR con l'utilizzo di più fluorofori in un singolo tube.

SISTEMI DI RILEVAZIONE

SYBR Green I



TaqMan



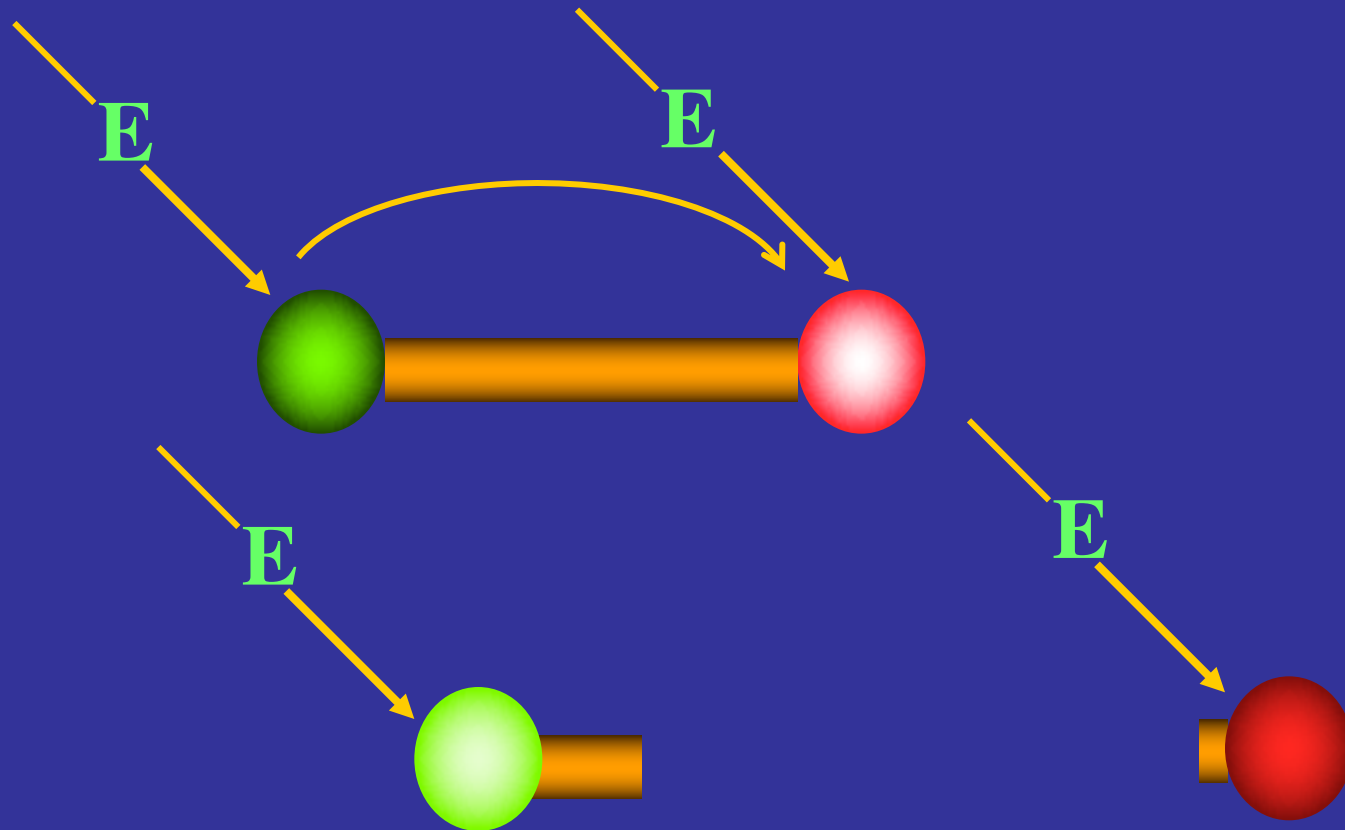
SYBR Green I

è un colorante per DNA che si incorpora nel doppio filamento. Non emette in fluorescenza quando è libero, ma solo quando legato al DNA. Ha il vantaggio di poter essere usato con qualsiasi set di primer → meno costoso. Rivela però anche prodotti aspecifici. L'utilizzo della curva di melting permette di settare il software in modo da far acquisire al sistema solo la fluorescenza relativa a quella curva.

TaqMan

Si usano 3 oligos per la PCR → un primer up, un primer dw e una sonda tutti specifici per il target. La sonda porta in 5' un reporter (colorante fluorescente) e in 3' un quencer (colorante fluorescente). Quando la sonda è intatta il quencer assorbe la fluorescenza del reporter per la loro vicinanza. Quando la Taq polimerasi (con attività 5' di esonucleasi) incontra la sonda, scalza il reporter dal quencer mediante idrolisi. In tal modo il reporter, separato dal quencer cambia la sua emissione → segnale fluorescente. Durante la PCR se nel campione c'è target il probe si annila ad esso. La Taq taglia il probe, permettendo l'emissione fluorescente. L'aumento in fluorescenza viene aumentato ciclo dopo ciclo ed è diretta conseguenza del processo di amplificazione.

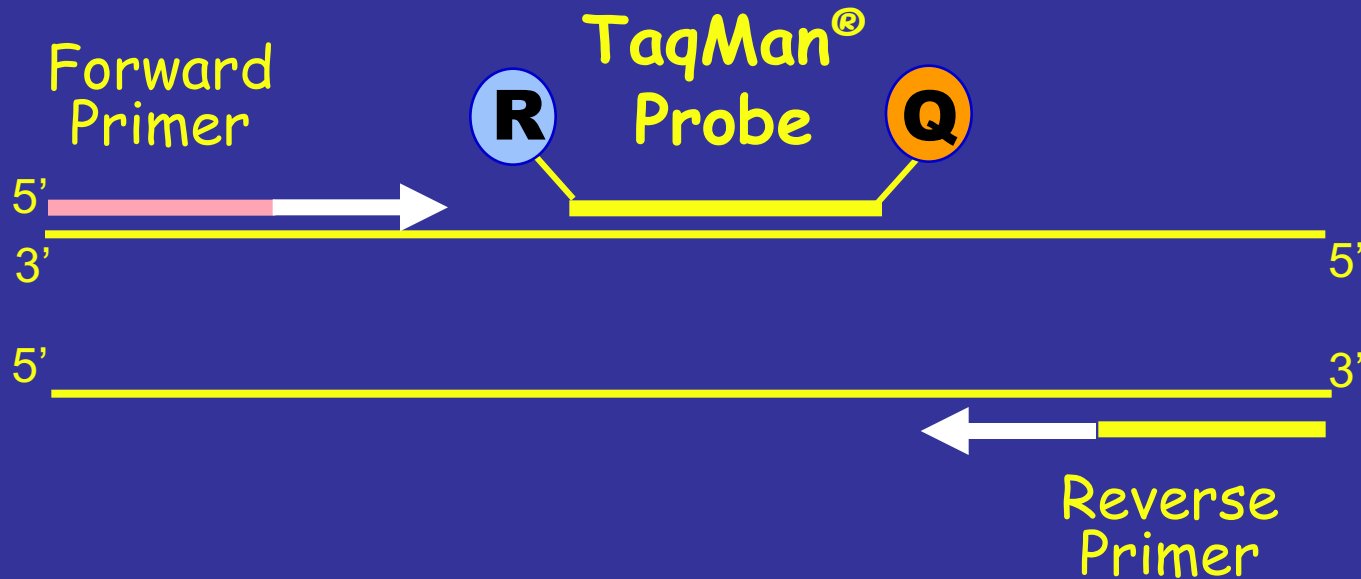
Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)



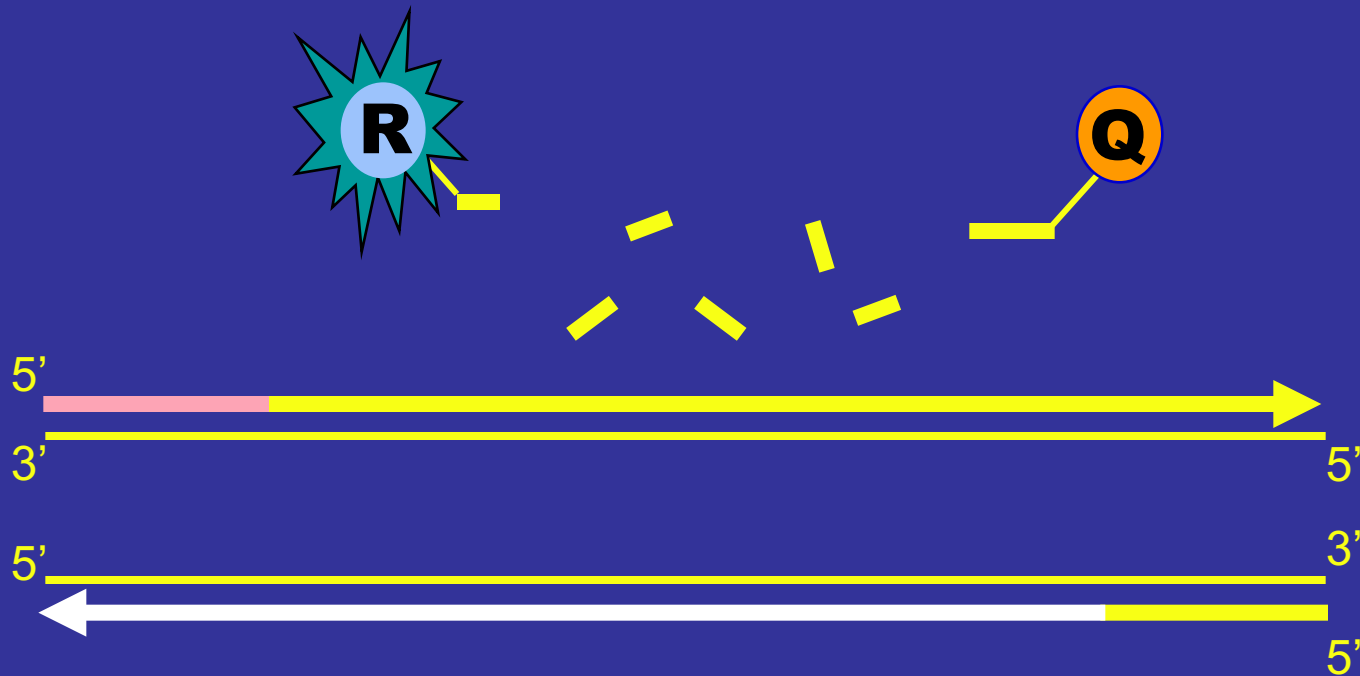
Sonde Taqman sono

sonde di idrolisi

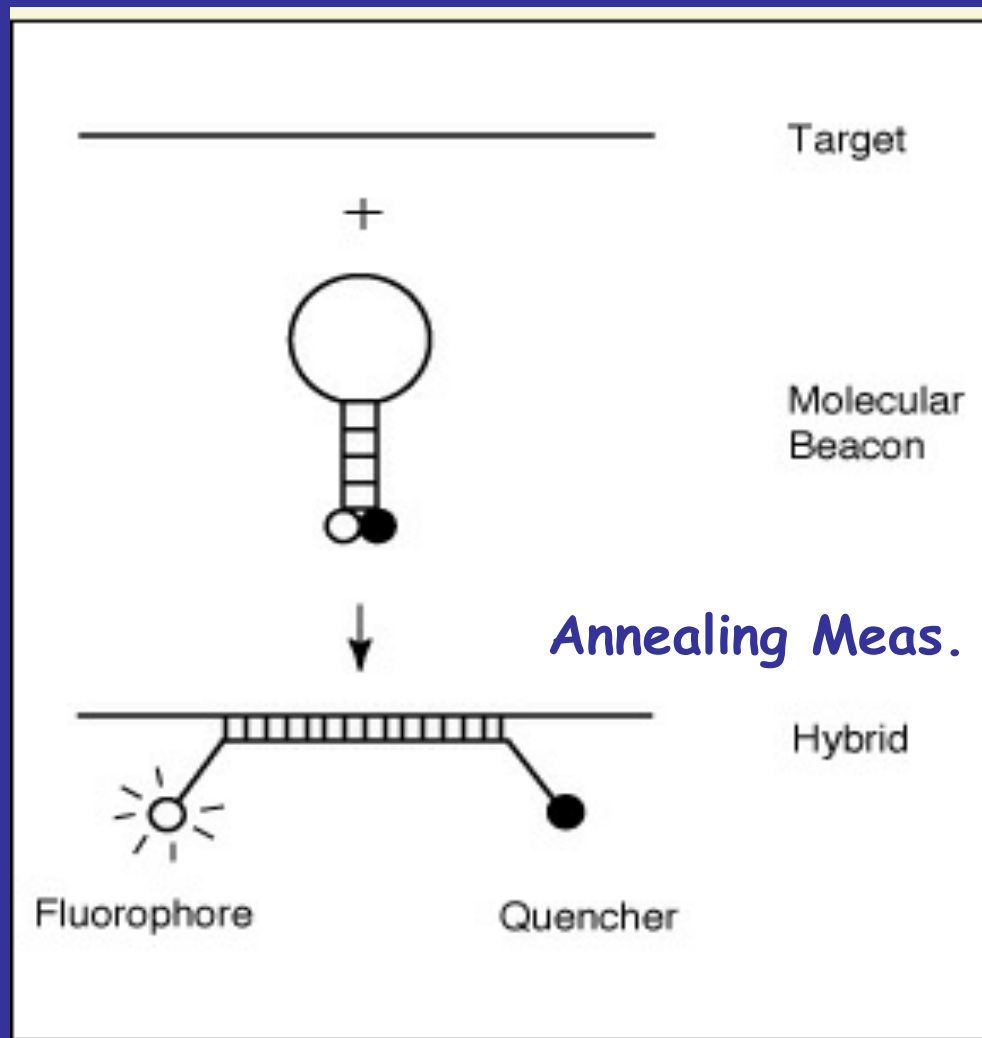
Polimerizzazione



Meccanismo a polimerizzazione avvenuta



Molecular Beacons sono sonde d'ibridazione



Quando scegliere SYBR Green I (intercalante)

1. Saggi in cui non è richiesta specificità
2. Screening generali di trascritti prima di passare al probe specifico
3. Quando la PCR è ottimizzata:
no primer dimers o ampliconi non-specifici
es da DNA genomico.

Quando usare sonde fluorescenti di idrolisi o ibridazione

1. Saggi in cui è richiesta una certa sensibilità
2. Discriminazione allelica
3. Reazioni multiple - quantificazione relativa impiegando un hsg nella stessa provetta
4. Rilevazione di trascritti rari.
5. Rilevazioni di bassi livelli di patogeni.
6. Quantificazione assoluta - Curva Standard
7. Quantificazione relativa con la tecnica di $\Delta\Delta C_T$ - no curva standard

Primer, Probe and Amplicon Design

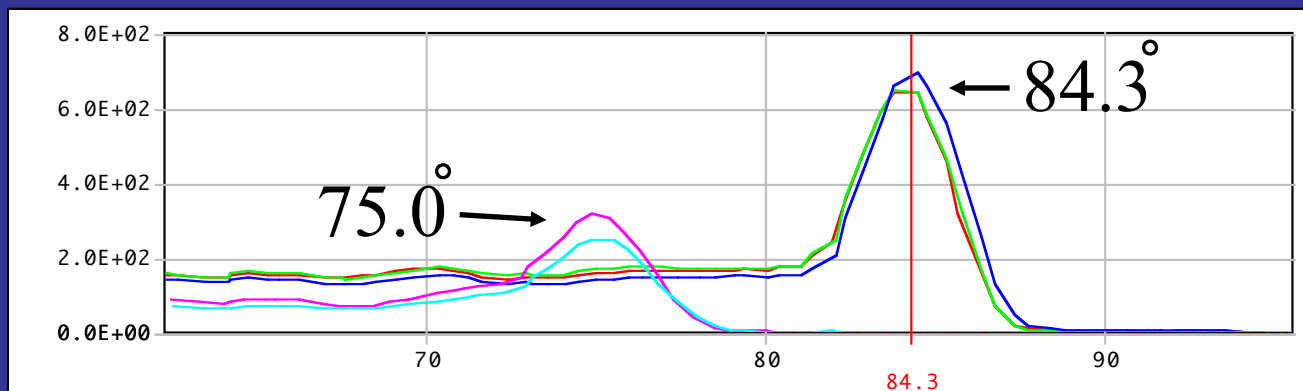
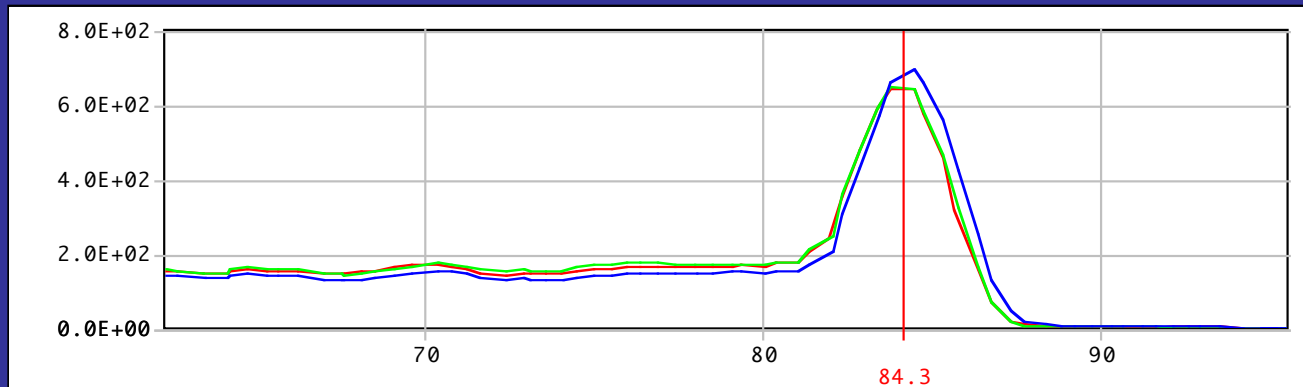
Primer Design

- Amplicon di 50-150 bp; meglio più corti
- 3' meno stabile (GC : Non più di 2 G e C nelle ultime 5 basi). No complementare in 3'.

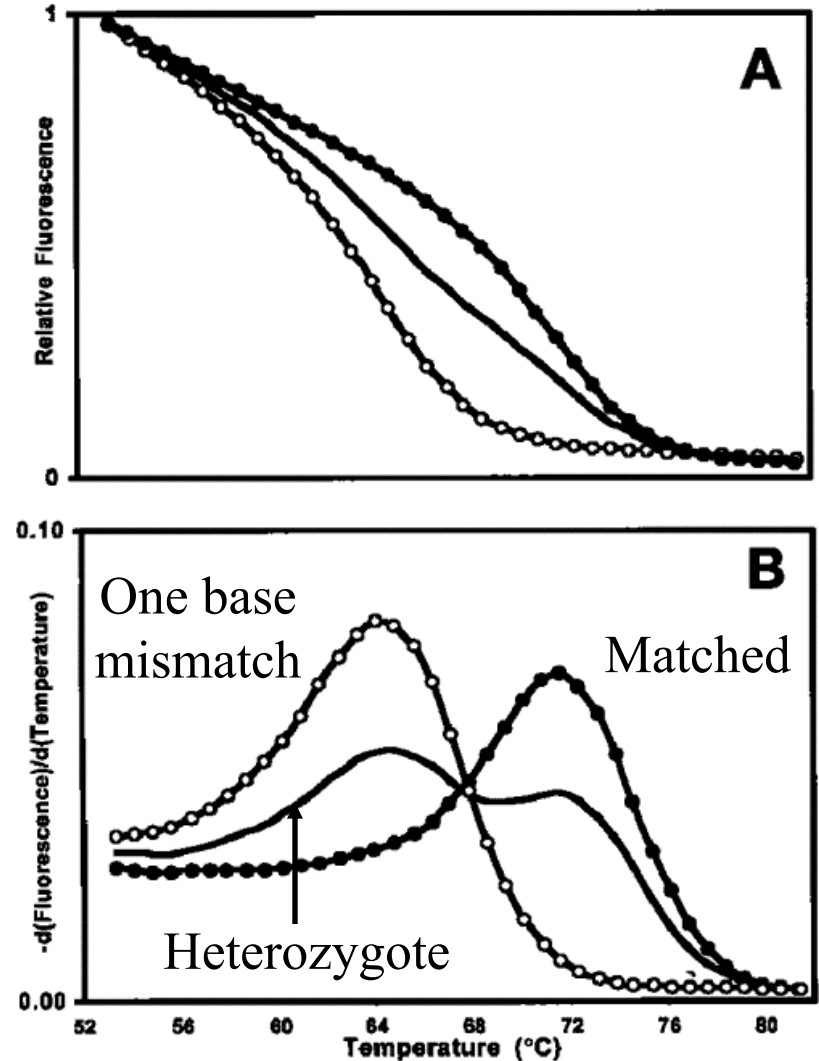
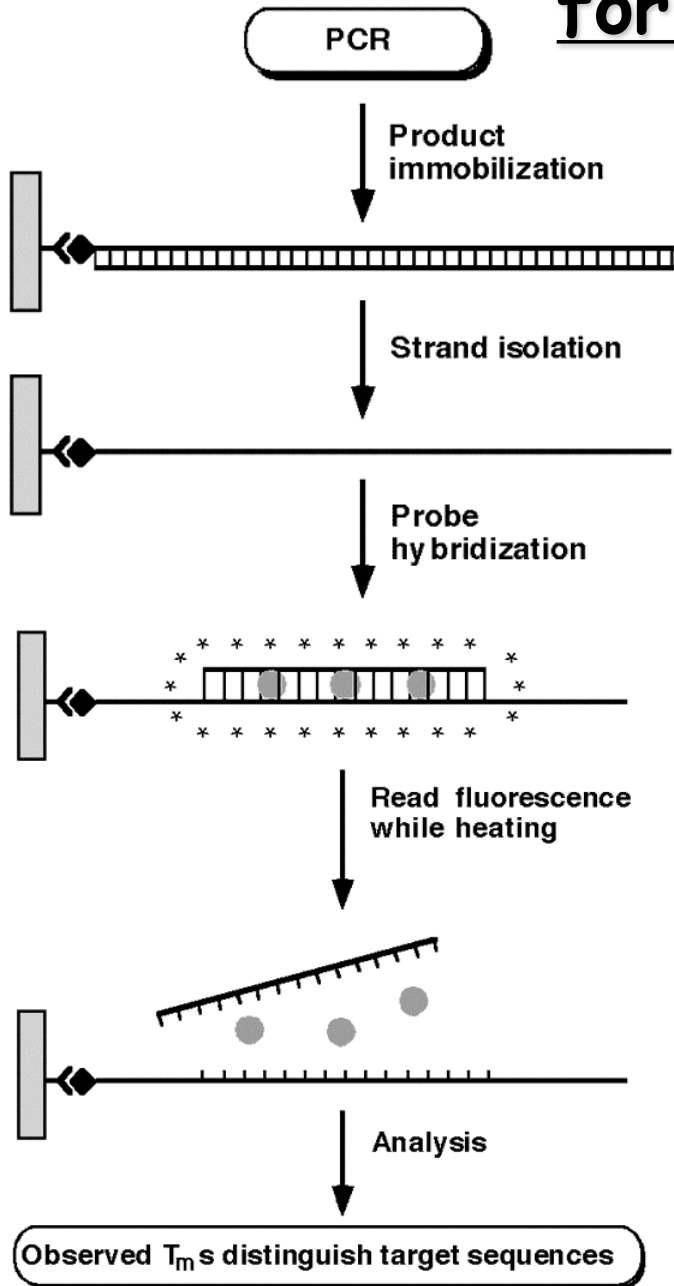
Probe Design

- $T_m \sim 10^\circ C >$ primers ($\sim 68-70^\circ C$)
- No G sul 5' end
- Uso di frammenti con più C che G

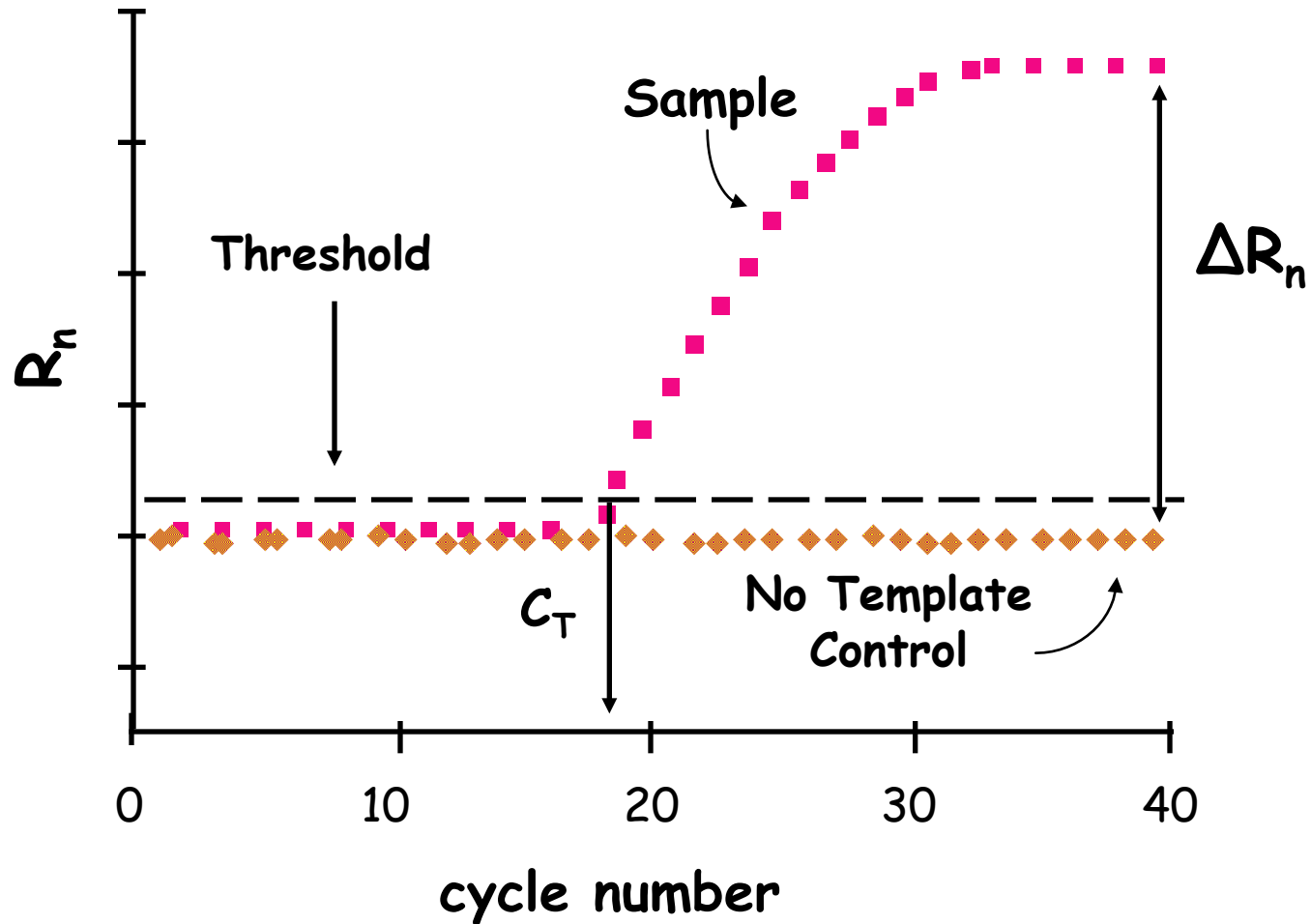
Melting Curve Analysis può dimostrare la specificità della reazione



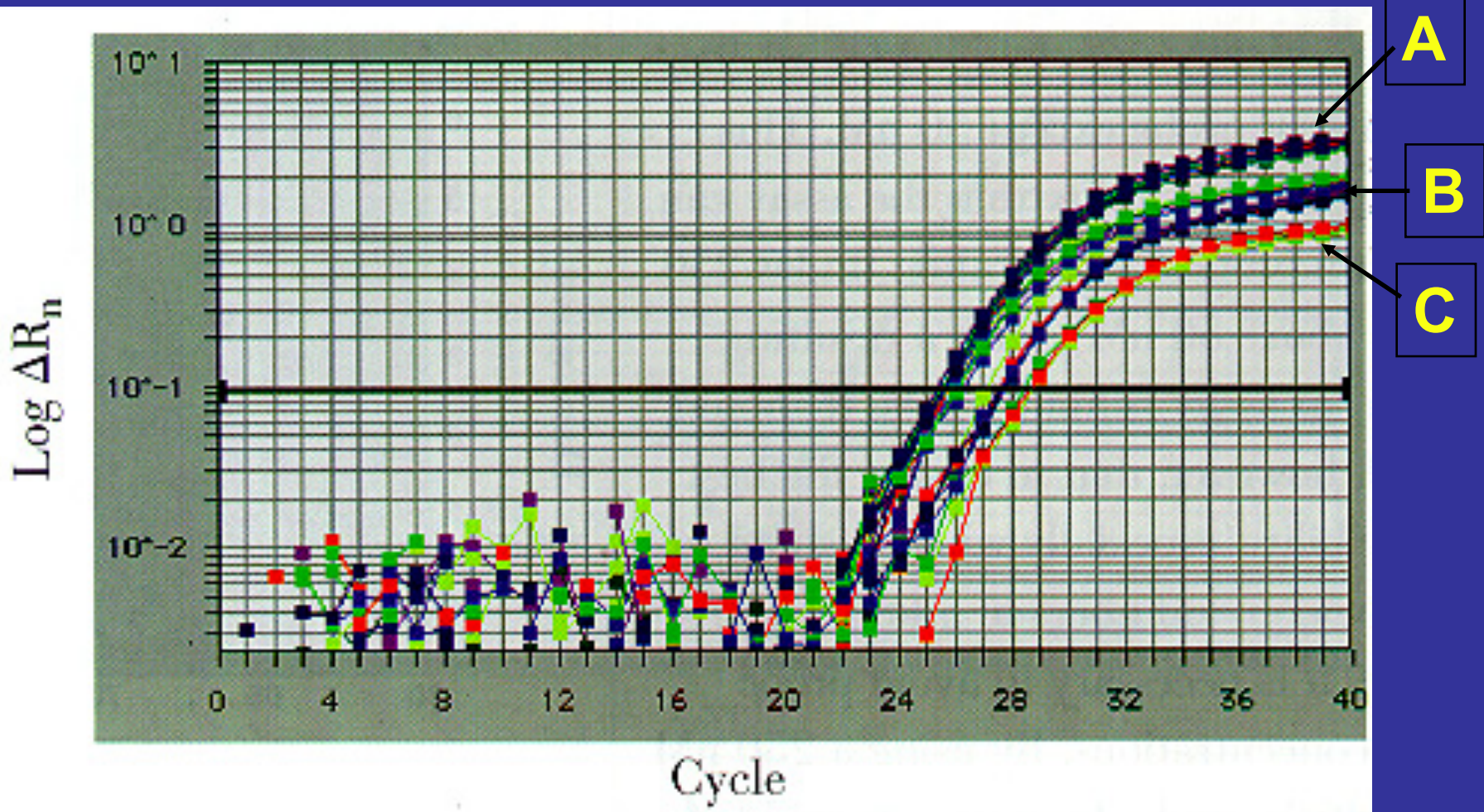
Melting Curve Analysis used in 7700 for SNP Genotyping



Anatomia di un plot di amplificazione



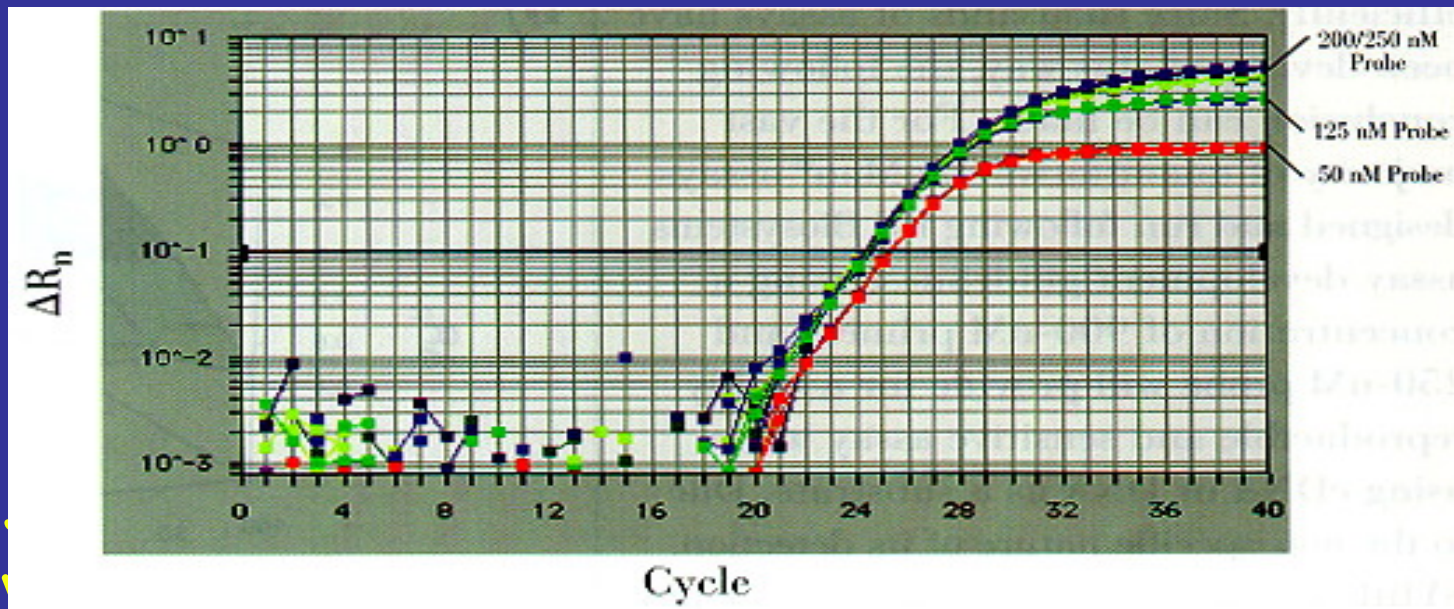
Primer Matrix



- Ricerca del minor C_t con maggior ΔR_n

Probe Titration

- Probe @ 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 & 250nM



Curva di standardizzazione

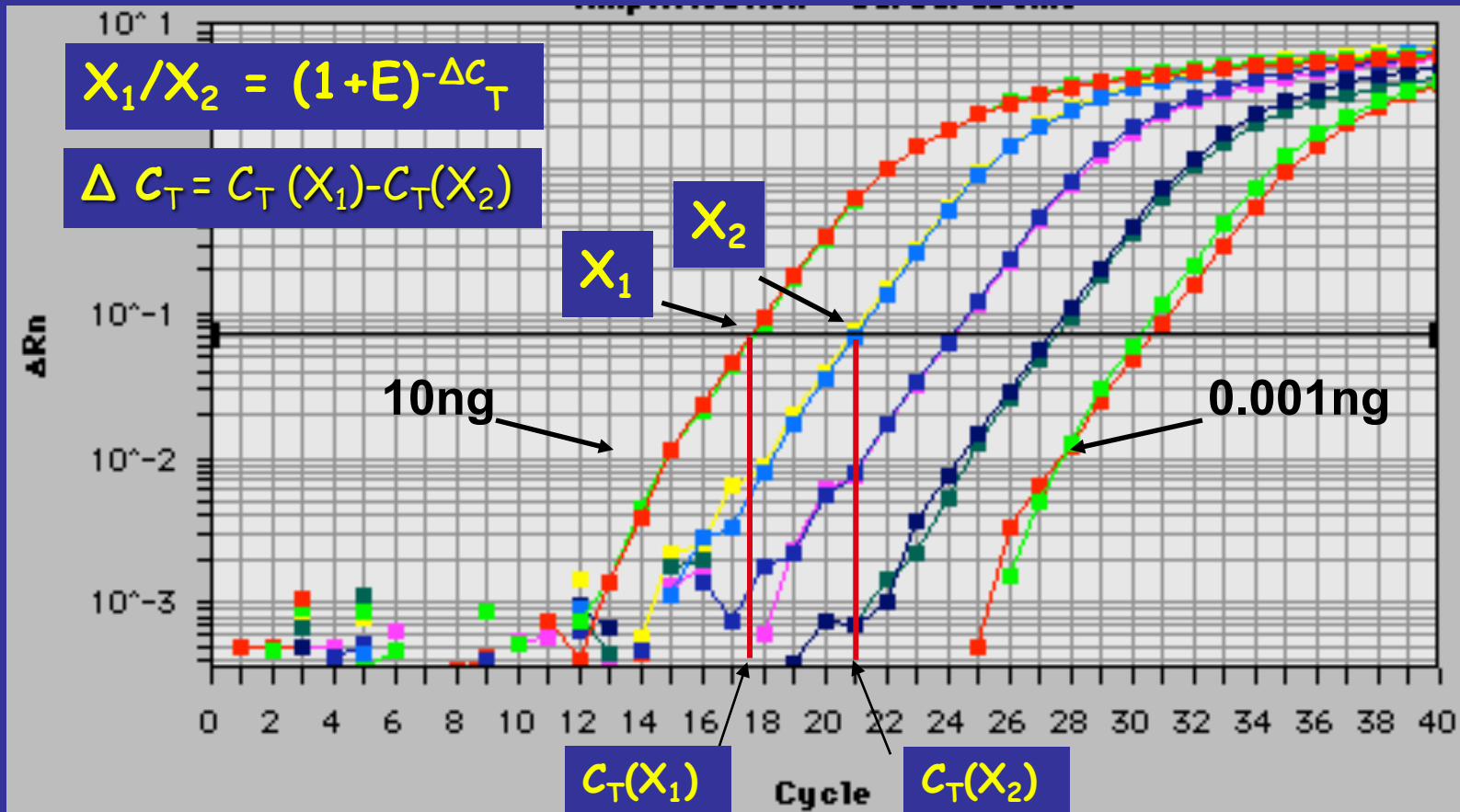
un campione a concentrazione nota viene utilizzato per costruire la curva. La concentrazione dello standard (DNA o RNA) viene valutata allo spettrofotometro a 260 nm, e convertita a numero di copie usando il PM del DNA o RNA (NB stabilità degli standard).

Analisi relativa con l'uso di Ct

Si usano forme aritmetiche per calcolare i livelli di espressione relativa in relazione ad un calibrator che può essere ad esempio un controllo. La quantità di target normalizzata su il livello di espressione housekeeping gene e relativa ad un controllo è data da: $2^{\exp(-\Delta\Delta C_T)}$ dove $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ sample} - \Delta C_T \text{ calibrator}$ e ΔC_T è la C_T del target sottratta da quella dell'housekeeping. L'equazione rappresenta così l'espressione normalizzata del target gene nel campione ignoto relativa all'espressione normalizzata del calibrator. Il metodo è applicabile se l'efficienza della PCR per il target gene è simile a quella dell'housekeeping. Per ogni target deve essere valutata considerando come la $\Delta C_T \text{ sample}$ e la $\Delta C_T \text{ calibrator}$ variano con la diluizione del templatato.

Comparative C_T Method: $\Delta\Delta C_T$

Range dinamico del saggio



- Titolare un template; 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng

Effetto dell'efficienza di amplificazione

Case 1: E = 0.9

$$X_n = 100 (1+0.9)^{30}$$

$$X_n = 2.3 \times 10^{10}$$

$$X_n = X_0(1+E)^n$$

Case 2: E = 0.8

$$X_n = 100 (1+0.8)^{30}$$

$$X_n = 4.6 \times 10^9$$

Risultato: una differenza di 0.1 nell'efficienza di amplificazione genera una differenza di 5 volte nel rapporto finale dei prodotti di PCR dopo 30 cicli.

Comparative C_T Method: $\Delta\Delta C_T$

C_T (Target gene, control) – C_T (Endog. refer. gene, control) = $\Delta C_{T,\text{cont}}$ (Control tissue)

C_T (Target gene, exp.) – C_T (Endog. refer. gene, exp.) = $\Delta C_{T,\text{exp}}$ (Experimental tissue)

$$\Delta C_{T,\text{cont}} - \Delta C_{T,\text{exp}} = \Delta\Delta C_T$$

$$\frac{\text{Target gene exp}}{\text{Target gene calib}} = 2^{-(\text{ave. } \Delta\Delta C_T)}$$

Meglio.....

$$(E_{\text{target gene}})^{\Delta\text{Ct target gene}}$$

Ratio= — — — — — — — — — —

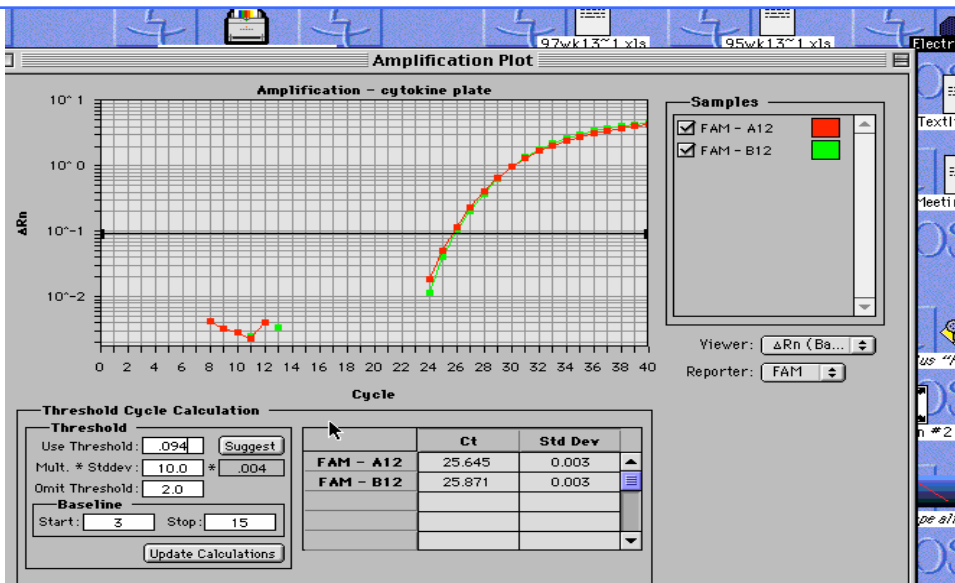
$$(E_{\text{reference}})^{\Delta\text{Ct reference}}$$

Dove:

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

$$\Delta\text{Ct}_{\text{target gene}} = (\text{Ct control} - \text{Ct sample})_{\text{target gene}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{ref gene}} = (\text{Ct control} - \text{Ct sample})_{\text{ref gene}}$$



Target RNA

TNF α in Control tissue

C_T s - 25.645 - A12

25.971 - B12

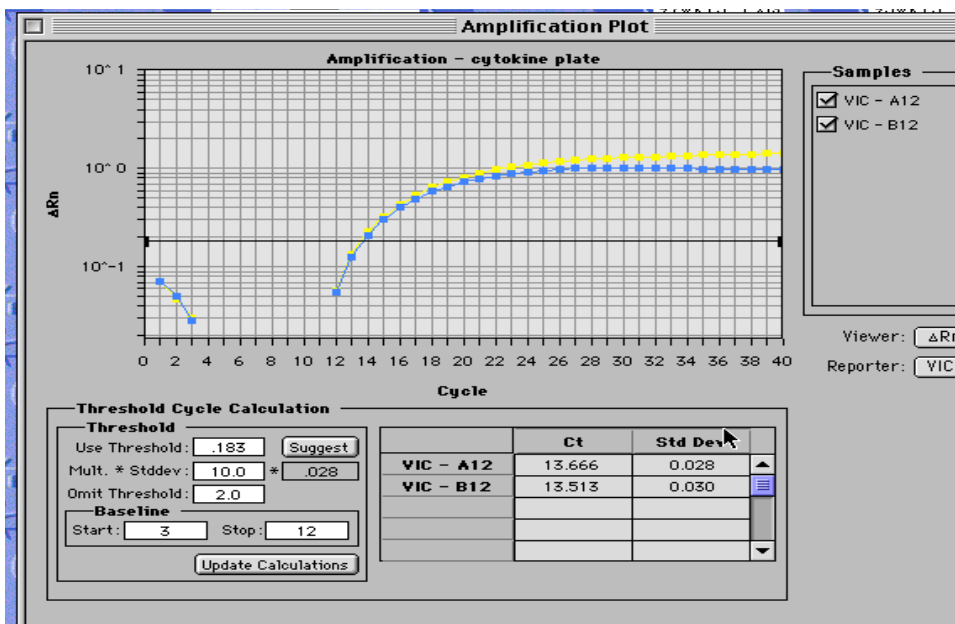
Endogenous reference

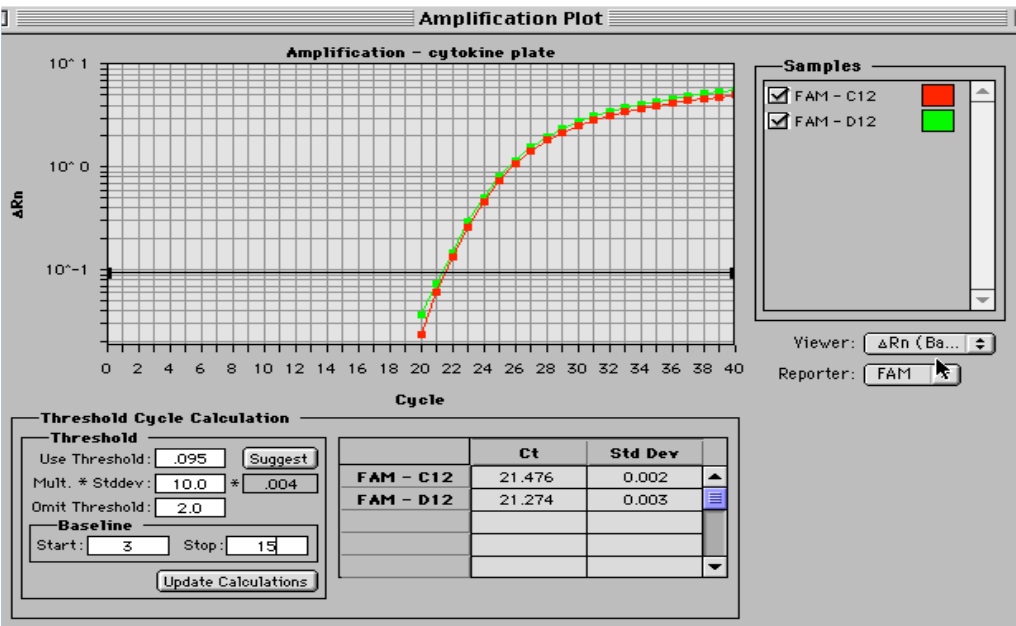
18s rRNA in Control tissue

C_T s - 13.666 - A12

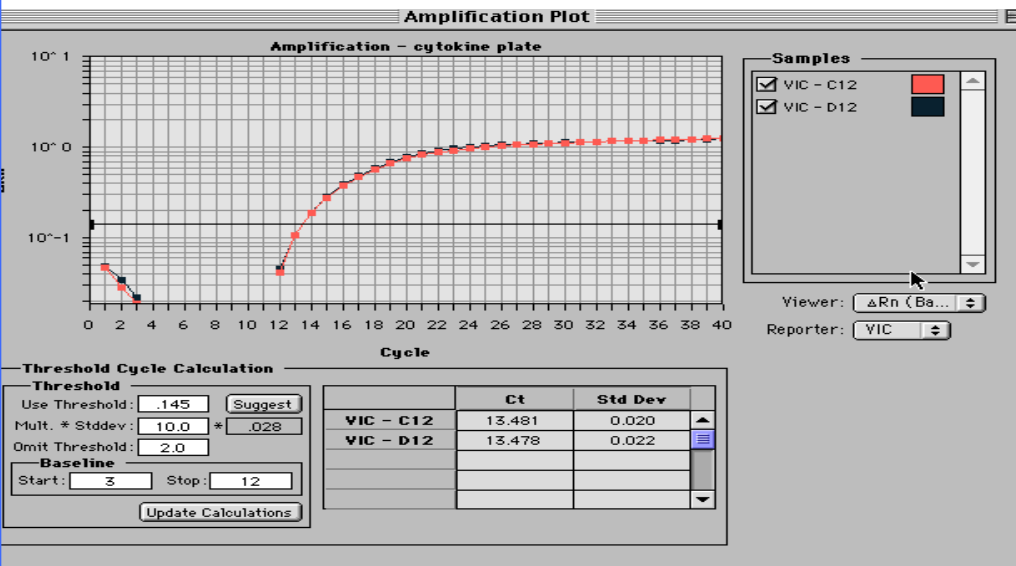
13.513 - B12

Ave ΔC_T Control =
 $C_T(\text{target}) - C_T(\text{end.ref.}) =$
 12.218





Target RNA
 TNF- α Experimental tissue
 $C_{Ts} = 21.476 - C12$
 $21.274 - D12$



Endogenous reference RNA
 18s rRNA Experimental tissue
 $C_{Ts} = 13.481 - C12$
 $13.478 - D12$

Ave. $\Delta C_T(\text{Exper.}) = C_T(\text{target}) - C_T(\text{end.ref.}) = 7.89$

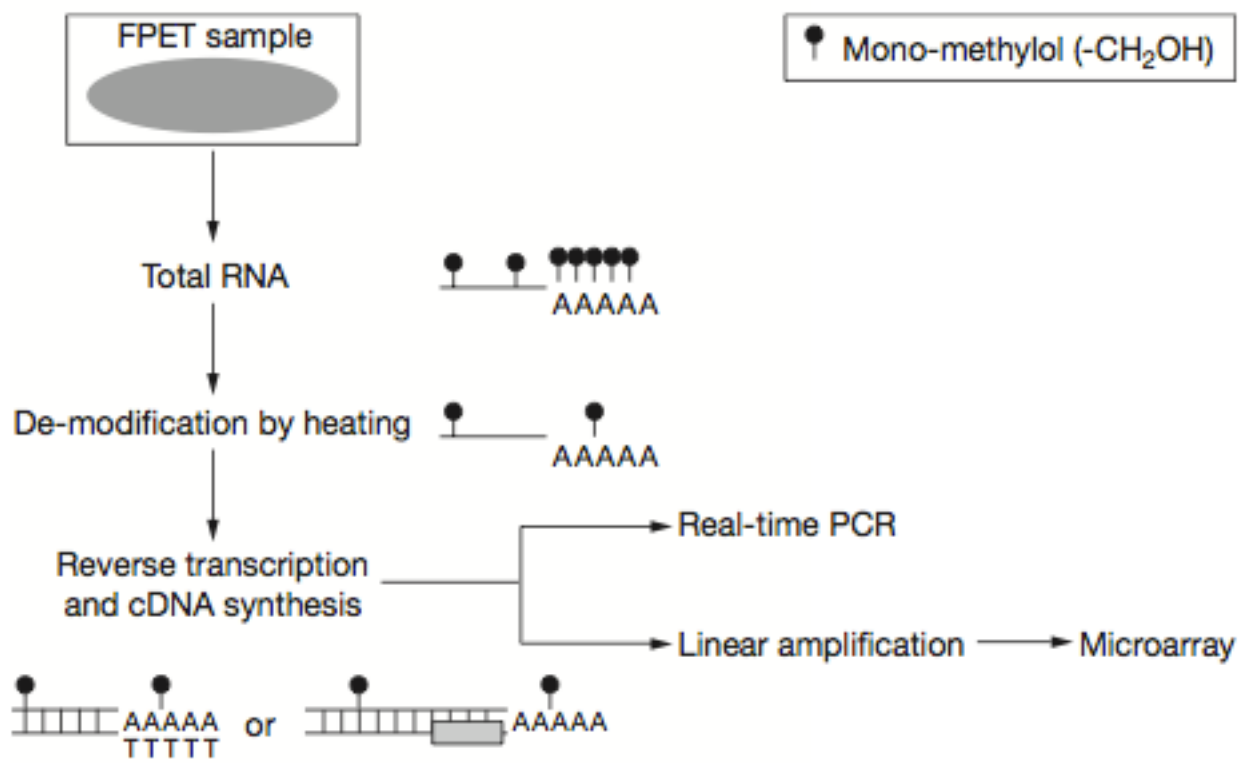
Quantificazione relativa con $\Delta\Delta C_T$

$$\begin{array}{l} \Delta C_T (\text{Controllo}) = 12.218 \\ \Delta C_T (\text{tessuto sperimentale}) = \underline{7.895} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \overline{\Delta\Delta C_T} = \Delta C_T(\text{Cont.}) - \Delta C_T(\text{sper.}) = 4.323 \\ \Delta\Delta C_T = \log_2(\text{Target}_{\text{sper}}/\text{Target}_{\text{cont}}) \end{array}$$

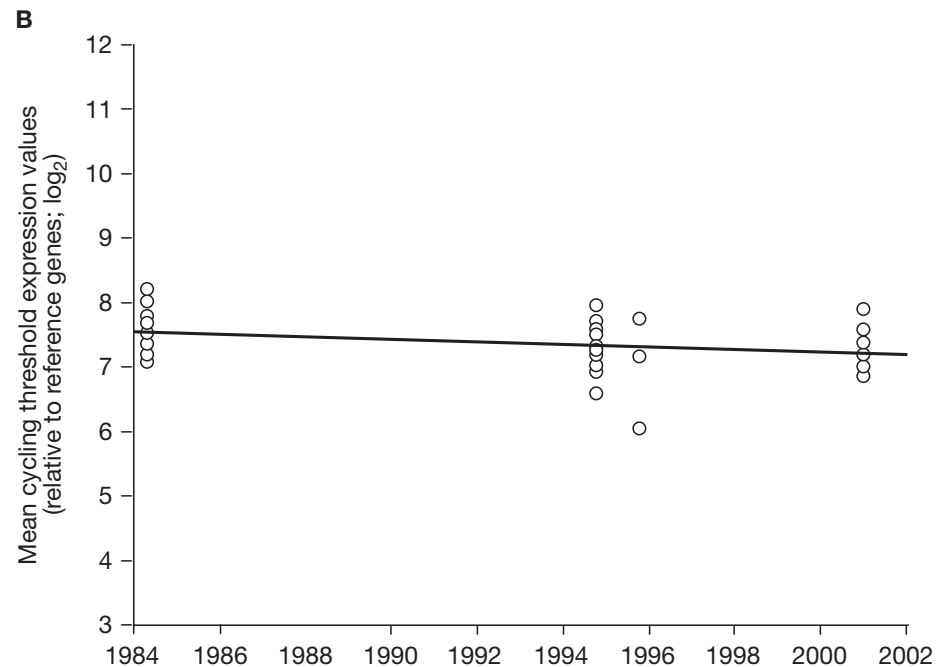
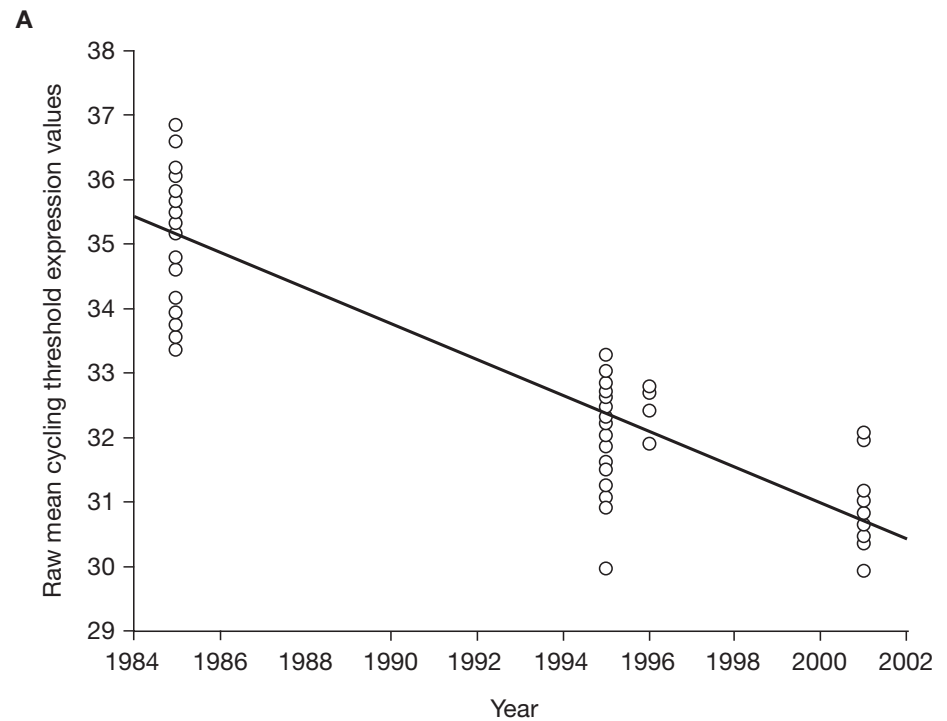
Differenza relativa di espressione di TNF- α in tessuto sperimentale in confronto al controllo
= $2^{\Delta\Delta C_T} = 2^{4.323} = 20\text{-fold increase}$

GENERAL STEPS INVOLVED IN GENE EXPRESSION PROFILING OF FFPE TISSUE



RELATIVE QUANTIFICATION

- ✓ Absolute quantification is not possible in FFPE specimens because the level of degradation varies among different samples.
- ✓ Relative quantification against the expression level of one or more housekeeping genes is the most popular method.

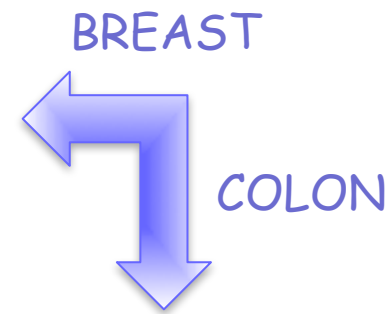
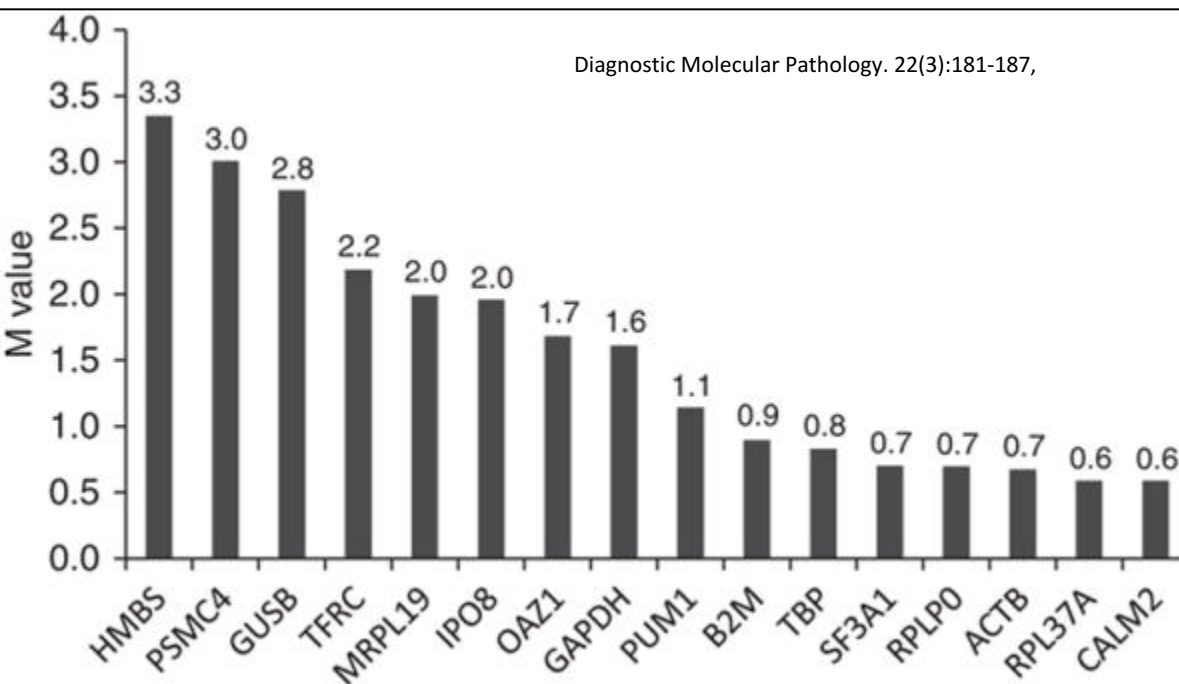


Which reference gene?

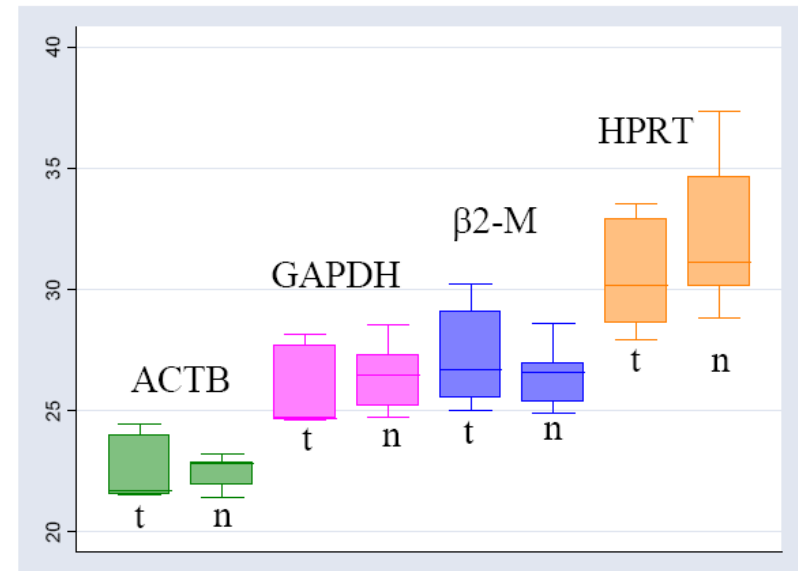
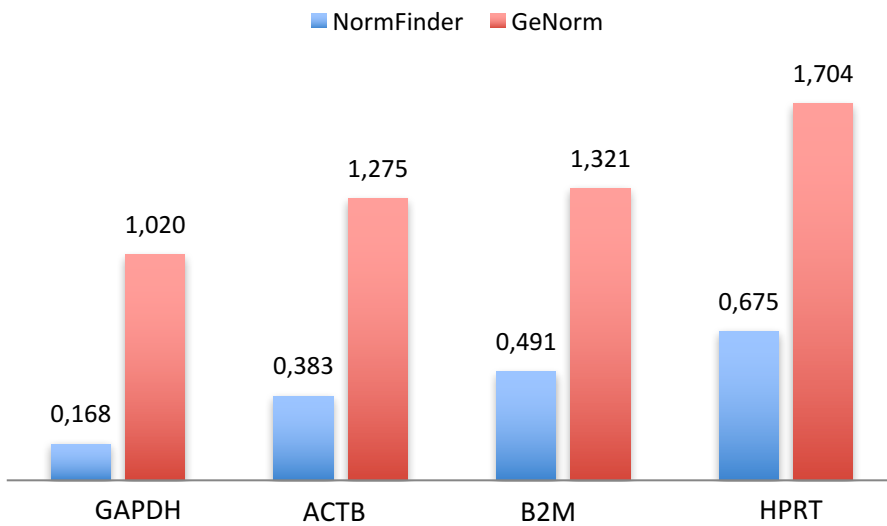
Gene-expression levels from qRT-PCR requires normalization of target genes to reference genes to remove degradation effect.

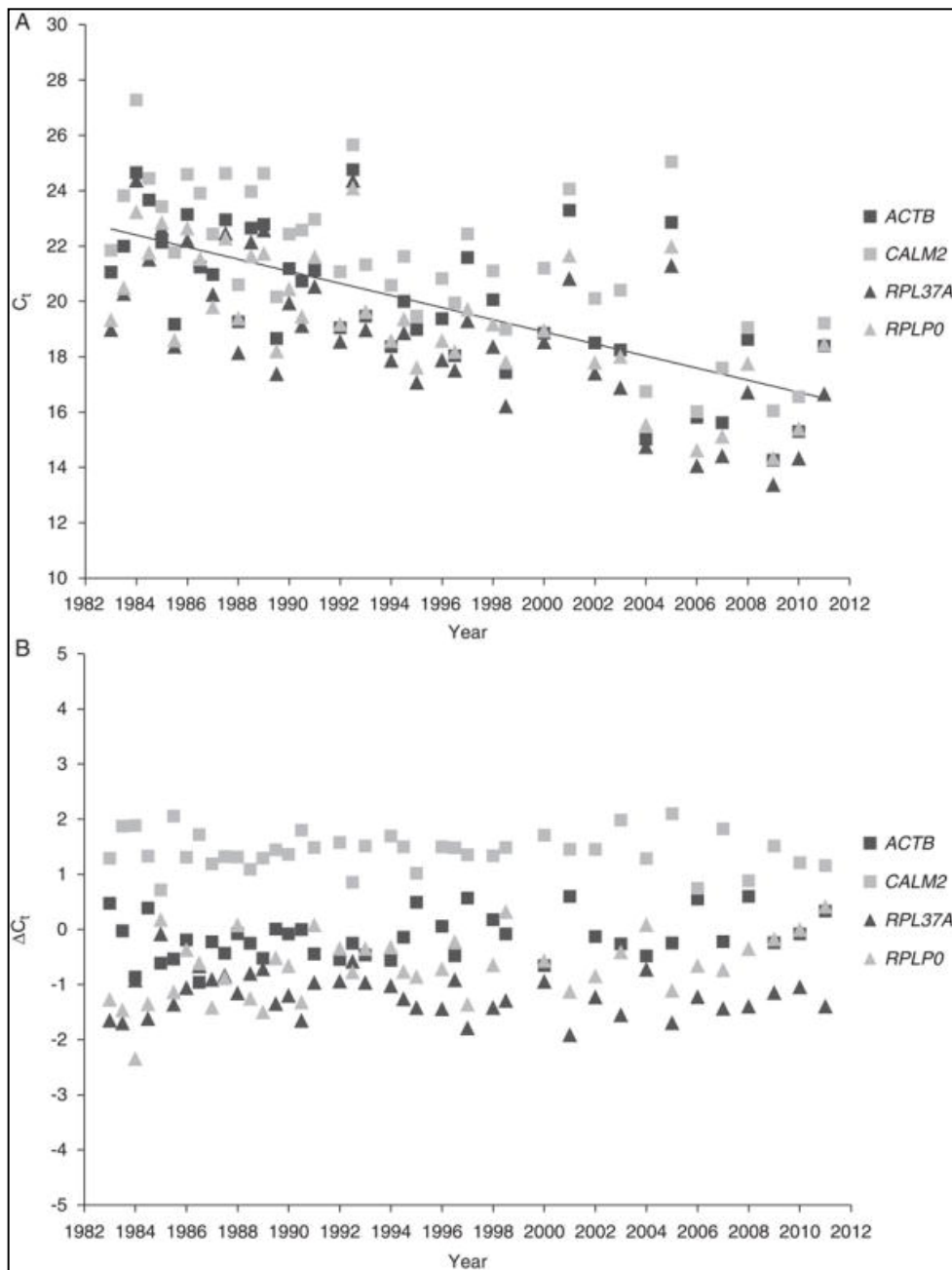
Reference genes are ideally constitutively expressed in every cell, but many genes used for normalization has been shown to vary with tissue type, cellular proliferation, cancer progression, and degradation of nucleic acids.

Genes	Protein Name	Cellular Function
<i>ACTB</i>	Actin, β	Major constituent of the contractile apparatus and cytoskeleton
<i>B2M</i>	β -2-microglobulin	Association with major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain
<i>CALM2</i>	Calmodulin 2 (phosphorylase kinase, Δ)	Phosphorylase kinase
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism
<i>GUSB</i>	Glucuronidase, β	Degradation of glycosaminoglycans
<i>HMBS</i>	Hydroxymethylbilane synthase	Catalyzation of part of the heme biosynthetic pathway
<i>IPO8</i>	Importin 8	Nuclear import of proteins
<i>MRPL19</i>	Mitochondrial ribosomal protein L19	Protein synthesis within the mitochondrion
<i>OAZ1</i>	Ornithine decarboxylase antizyme 1	Regulation of polyamine synthesis
<i>PSMC4</i>	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	Multicatalytic proteinase complex
<i>PUM1</i>	Pumilio homolog 1 (Drosophila)	Translational regulation of embryogenesis, cell development and differentiation
<i>RPL37A</i>	Ribosomal protein L37a	Component of the 60S subunit of the ribosomes that catalyze protein synthesis
<i>RPLP0</i>	Ribosomal protein, large, P0	Component of the 60S subunit of the ribosomes that catalyze protein synthesis
<i>SF3A1</i>	Splicing factor 3a, subunit 1, 120 kDa	Belongs to the SURP protein family that are thought to mediate RNA binding
<i>TBP</i>	TATA box binding protein	General transcription factor
<i>TFRC</i>	Transferrin receptor (p90, CD71)	Carrier protein for transferrin



Expression stability values (M values by GeNorm) arranged after decreasing values. Lower values indicate higher stability.





Reference genes should be selected for each specific study cohort and specific organ and/or disease