

RT-PCR

⇒ Oligo dT:
si appaia ai
poyAmRNA:
Evita la
digestione con
DNAsi? In un
unica reazione
trascrive tutto.
No per RNA
degradati, non
trascrive il
ribosomiale

? RT-priming

⇒ Esameri random
Risultati
riproducibili e
attendibili.
Necessita il
trattamento con
DNAsi, converte
tutto l'RNA in
cDNA.

⇒ Primer specifico
Sintetizza solo lo
specifico RNA, ma
richiede tante
reazioni quanti
targets. E`
sicuramente il
metodo più
specifico e
sensibile.

I tre metodi differiscono sia per resa che per varietà e specificità dei prodotti

Retrotrascrizione

NB: la T_m di RPA e oligo dT è ben al di sotto della T di esercizio delle trascrittasi.

RPA → attaccano l'RT in diversi punti lungo il trascritto producendo più di un cDNA per singolo target originale.

Il metodo è quindi per definizione non specifico ma ha una > resa nella sintesi di cDNA. È utile per trascritti con significativa struttura secondaria.

La maggior parte del cDNA da RNA totale deriva per lo più dal ribosomiale ⇒ problemi se il trascritto è poco presente, perché potrebbe non esser attaccato dai RPA e quindi l'amplificazione non esser quantitativa.

EFFETTO MONTE CARLO

È un limite nell'amplificazione con la PCR per piccole quantità di campione a causa della differenza nell'efficienza della reazione tra templati individuali nella popolazione di cDNA.

Ogni campione ha una certa P di essere amplificato o perso, se il campione viene diluito sotto una certa soglia si avranno grosse variazioni nell'amplificazione.

L'effetto Monte Carlo dipende dalla [campioni]: $<$ è l'abbondanza del template $<$ è la p che la sua vera quantità venga riflessa nel prodotto finale.

cDNA poco presenti possono soffrire più probabilmente dell'effetto Monte Carlo in quanto la P di incontrare i primers è minore.

Possibilità analitiche

⇒ 2 steps-prima RT e poi mastermix per PCR

⇒ In uno step-direttamente nel termocycler con un preciclo di 1 ora circa per la RT

NOTE

- ☞ Il sistema in 2 steps presenta resa > del 1 step.
- ☞ 1 step evita contaminazioni
- ☞ ∃ DNA polimerasi che funzionano anche da RT e possono lavorare anche a 60° C, ma non utilizzabili con RPA e oligo dT.

RT-PCR

? Enzima

⇒ AMV: da Avian myeloblastosis virus. Ottima con primer specifico, non consigliata per gli altri priming.

⇒ MMLV: da Molony murine leukemia virus. Buono per oligo dT e random primers.

Combinazioni:

Primer specifico + AMV → sia per tessuti freschi che FFPET

Oligo dT + Moloney → solo fresco

RPA + Moloney → fresco, modificato anche per FFPET

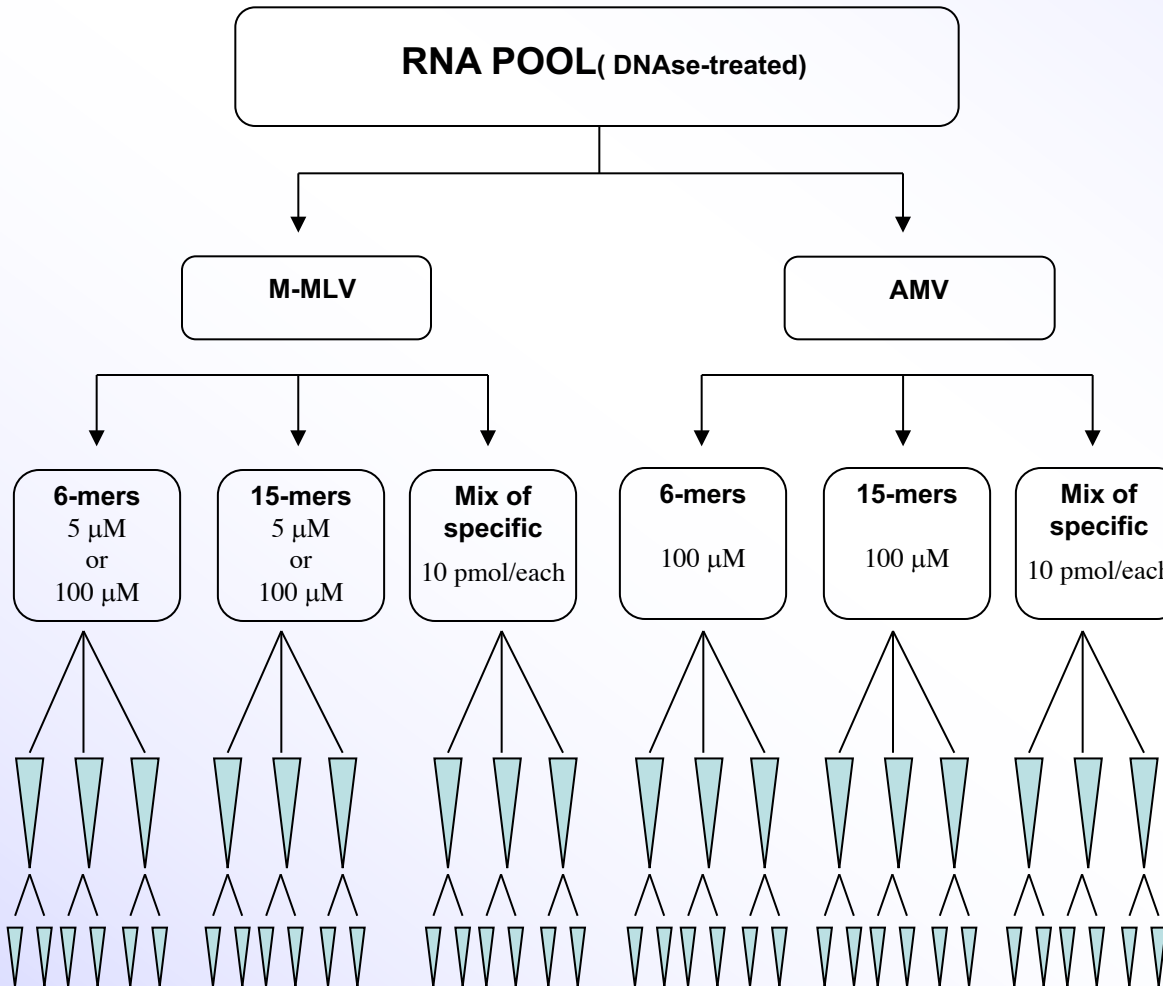
⇒ In materiale fissato e incluso- RPA

- ☞ Stimolare al massimo l'appaiamento con gli esameri (frammenti corti non tendono ad appaiare)
- ☞ Elevate concentrazioni di Mg (7.5 mM)
- ☞ Maggior concentrazione di RPA (0.1 ÷ 3.85 nmoli) ed enzima (250 unità)
- ☞ Denaturazione RNA 10' 65° C-4° C
- ☞ Pre appaiamento con il sistema di RT a 25° C
- ☞ Reazione T= 37° C, t=45-60 min Vf =20 µl
- ☞ Inattivazione dell'enzima 15' 70° C.

⇒ FFPET- AMV

- ☞ Buffer AMV1x, dNTPs 1mM finale, 15 pmoli primer antisense, 4 unità Rnasina, AMV RT 2.5 unità. Vf =10 µl, T= 42° C, t=45-60 min
- ☞ Per la PCR al sistema vengono aggiunte 15 pmoli di primer sense, PCR buffer senza Mg in modo che la conc finale sia 1 mM o 1,5 mM.
- ☞ La conc finale dei dNTPs sarà 0.2 mM se il Vf=50µl

Design



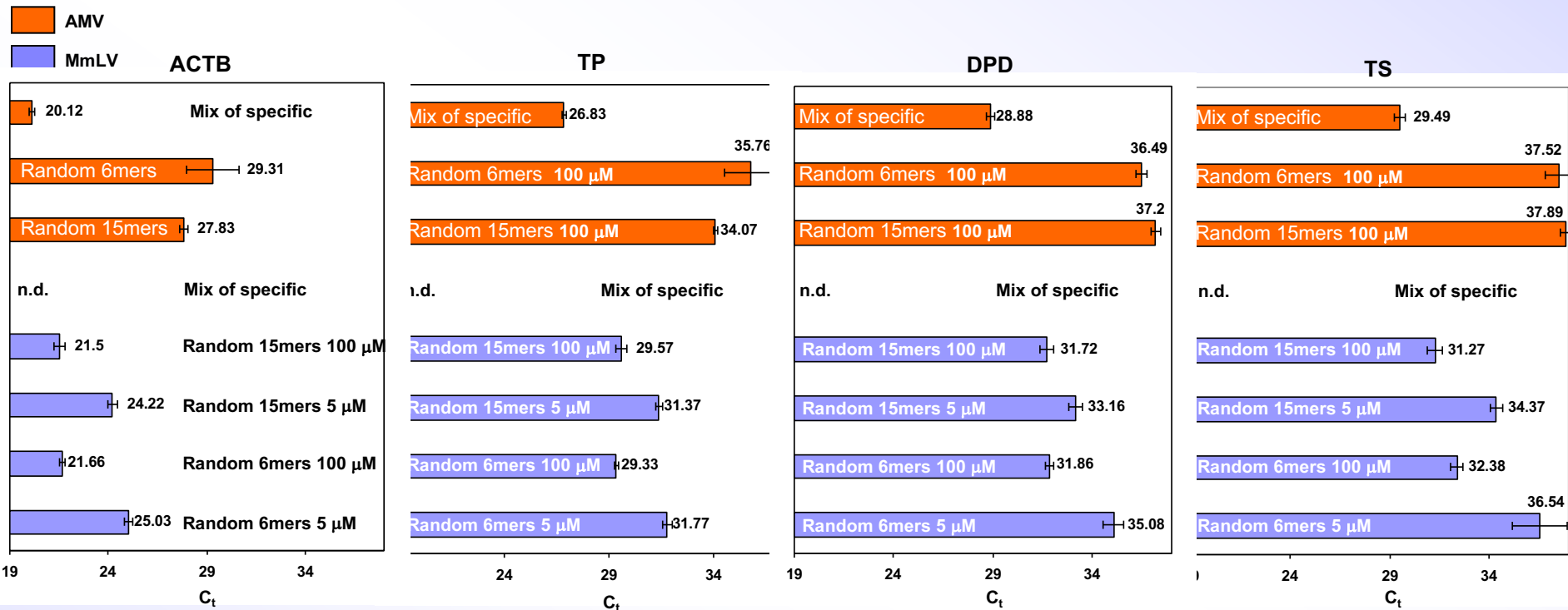
Targets:

Thymidylate synthase (TS)
Thymidine phosphorylase (TP)
Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)
β-actin (ACTB)

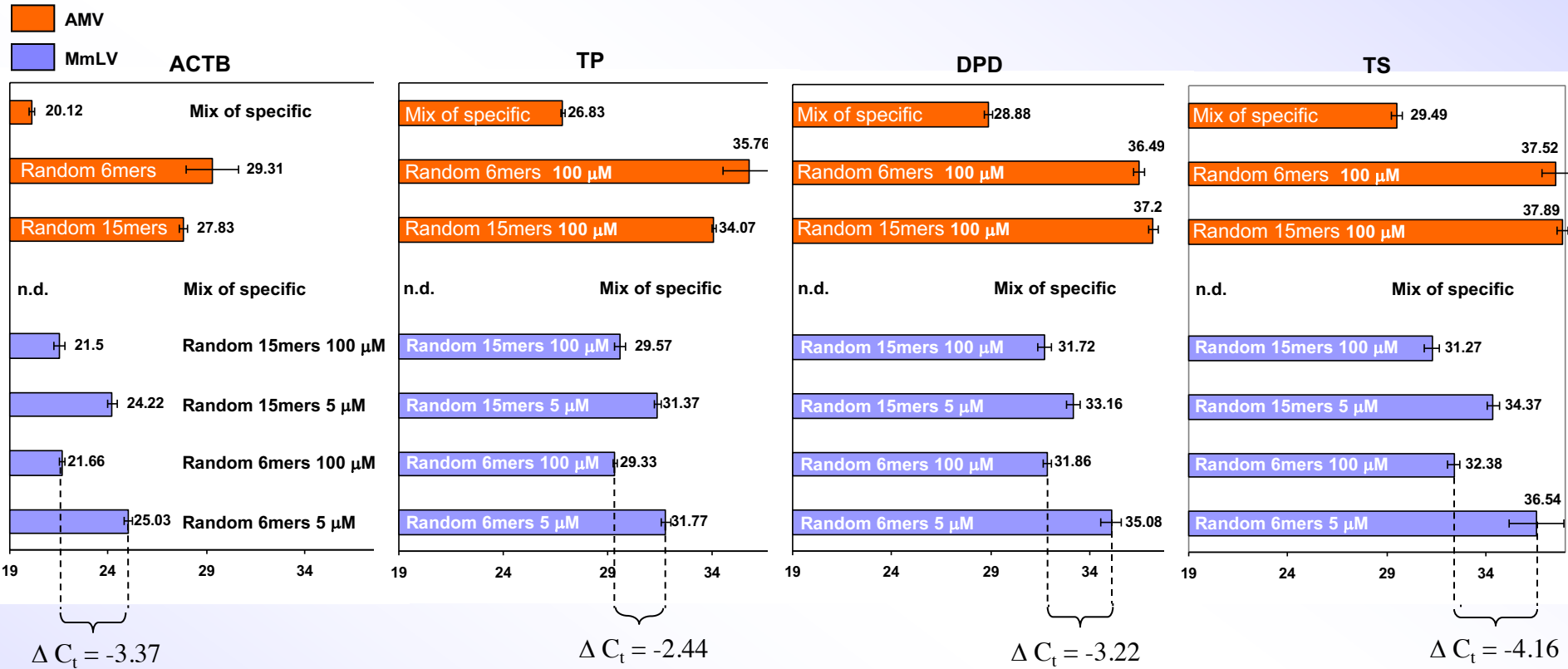
3 RT replicates

2 real time PCR replicates

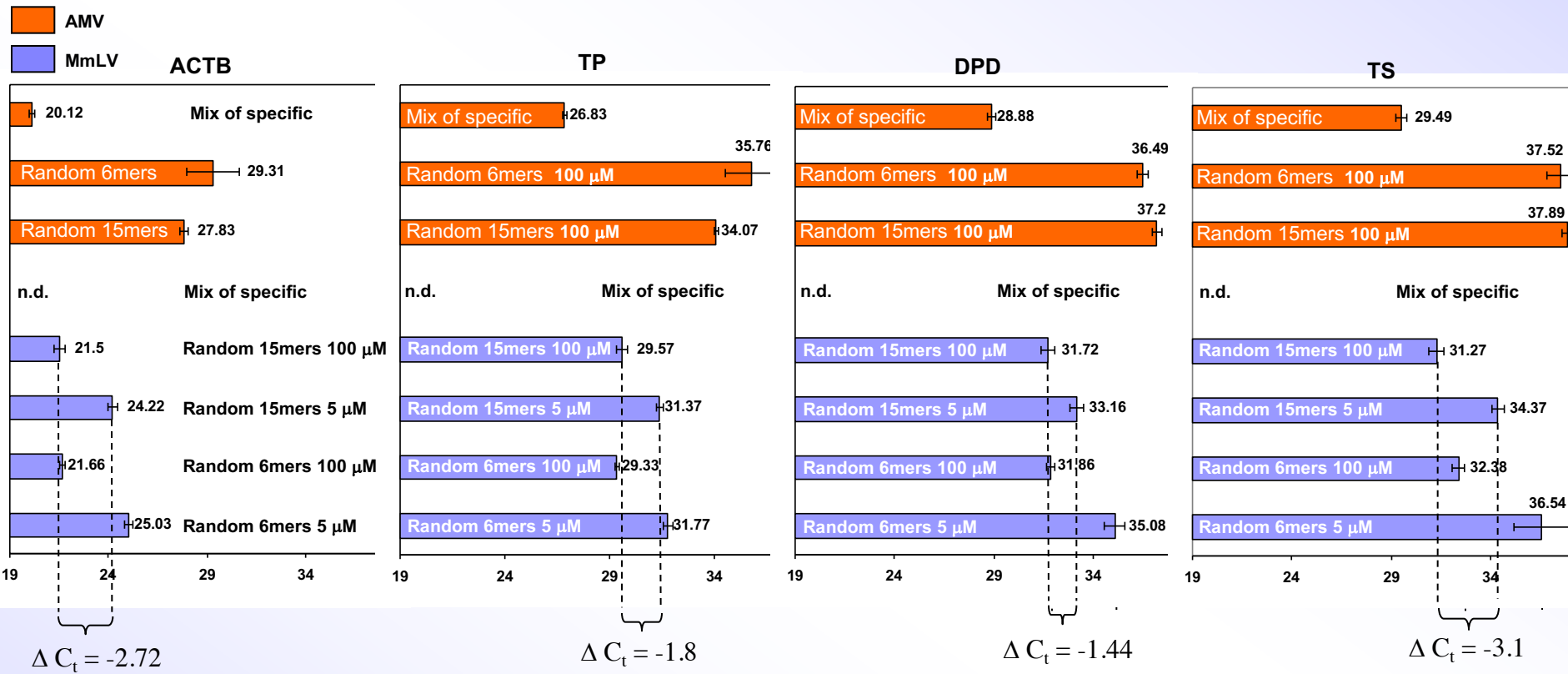
Yield of the reverse transcription



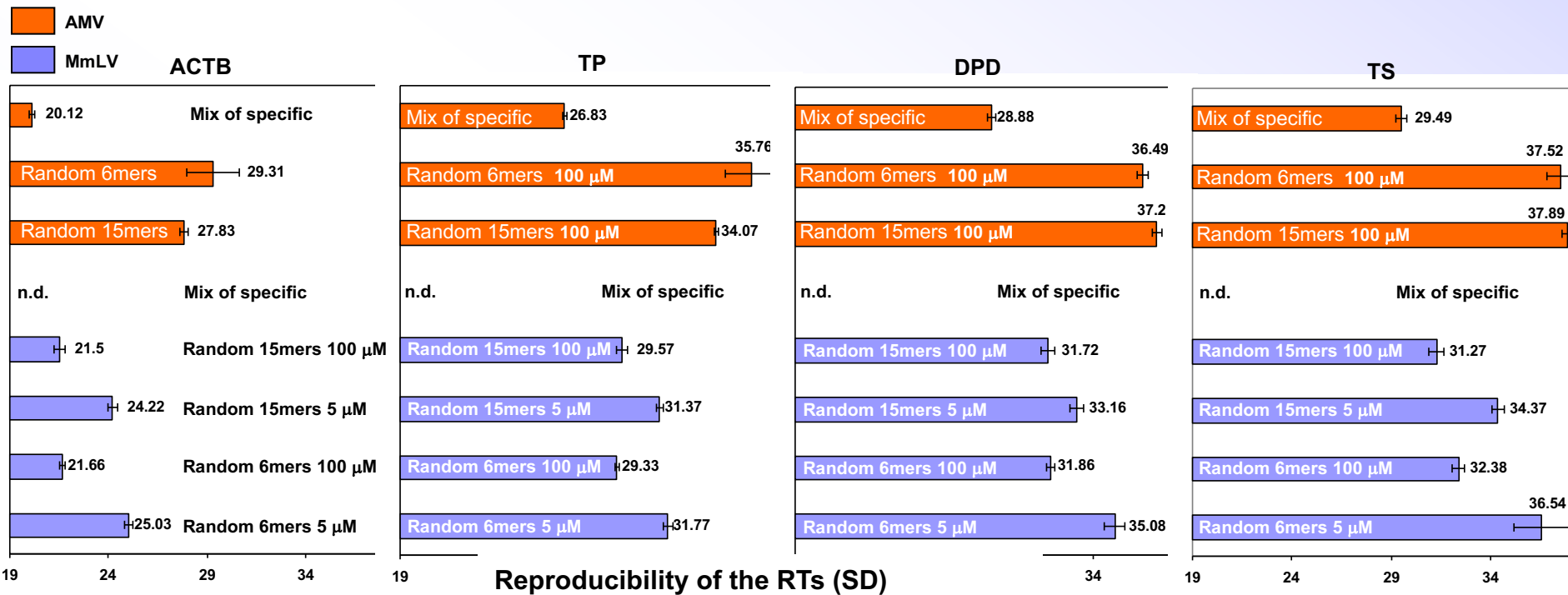
Yield of the reverse transcription



Yield of the reverse transcription



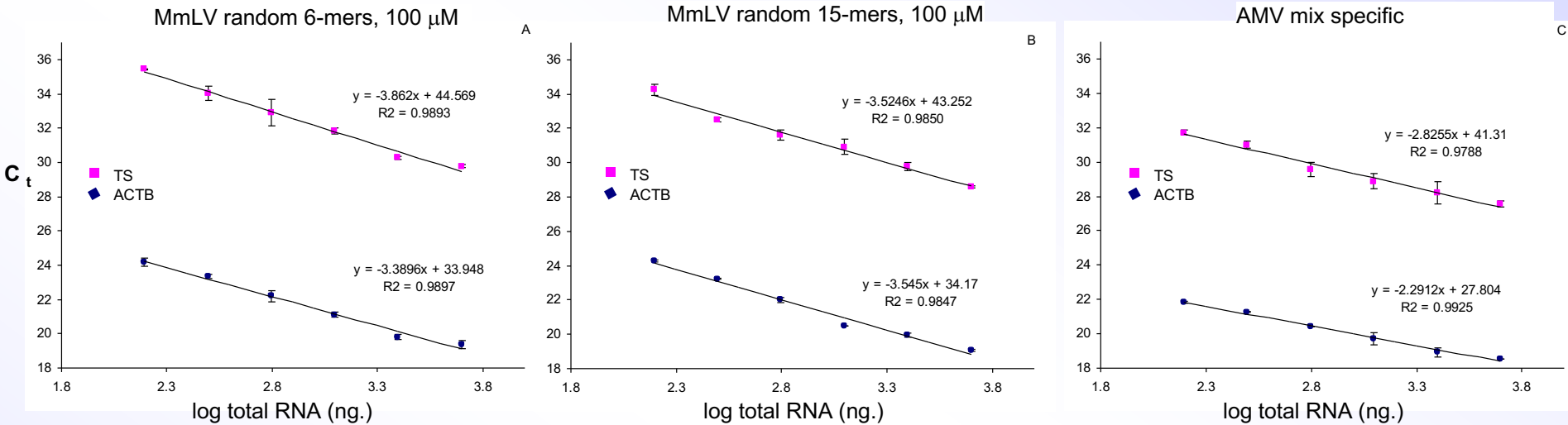
Yield of the reverse transcription



Reproducibility of the RTs (SD)

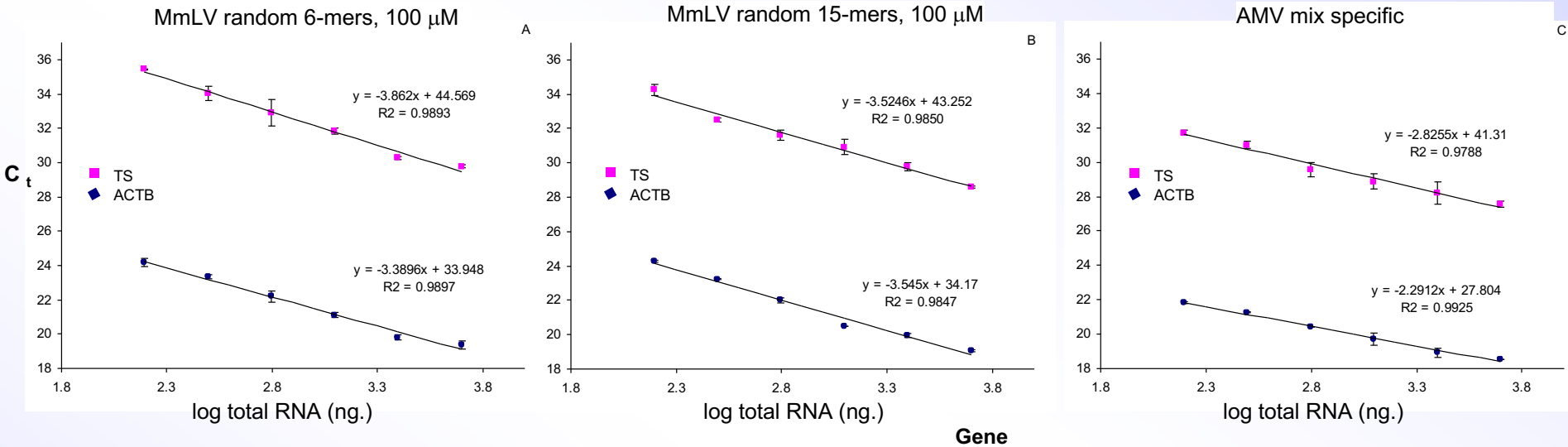
	ACTB	TP	DPD	TS
AMV + mix specific	0.17	0.09	0.19	0.27
AMV + 100 μM 6mers	1.36	1.24	0.26	0.68
AMV + 100 μM 15mers	0.48	0.20	0.25	0.28
MmLV + mix specific	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MmLV + 100 μM 15mers	0.22	0.18	0.33	0.32
MmLV + 5 μM 15mers	0.29	0.28	0.35	0.38
MmLV + 100 μM 6mers	0.17	0.11	0.21	0.30
MmLV + 5 μM 6mers	0.24	0.21	0.50	1.40

Linearity of the reverse transcription



		Gene			
		TS	TP	DPD	ACTB
MMLV + 5 μM 6mers	Slope	-4.225	-2.587	-4.276	-3.032
	Efficiency (%)	72.45	143.54	71.34	113.71
	R^2	0.9827	0.9287	0.9834	0.9581
MMLV + 100 μM 6mers	Slope	-3.862	-3.568	-3.482	-3.390
	Efficiency (%)	81.52	90.67	93.72	97.25
	R^2	0.9893	0.9701	0.9662	0.9897
MMLV + 5 μM 15mers	Slope	-3.151	-2.513	-3.213	-3.152
	Efficiency (%)	107.68	149.97	104.77	107.61
	R^2	0.9899	0.9741	0.9849	0.9791
MMLV + 100 μM 15mers	Slope	-3.525	-3.073	-3.736	-3.545
	Efficiency (%)	92.19	111.51	85.21	91.47
	R^2	0.9850	0.9750	0.9902	0.9847
AMV + mix specific	Slope	-2.826	-2.746	-2.267	-2.291
	Efficiency (%)	125.90	131.27	176.19	173.18
	R^2	0.9788	0.9877	0.9767	0.9925

Linearity of the reverse transcription



		Gene			
		TS	TP	DPD	ACTB
MMLV + 5 μM 6mers	Slope	-4.225	-2.587	-4.276	-3.032
	R^2	0.9827	0.9287	0.9834	0.9581
MMLV + 100 μM 6mers	Slope	-3.862	-3.568	-3.482	-3.390
	R^2	0.9893	0.9701	0.9662	0.9897
MMLV + 5 μM 15mers	Slope	-3.151	-2.513	-3.213	-3.152
	R^2	0.9899	0.9741	0.9849	0.9791
MMLV + 100 μM 15mers	Slope	-3.525	-3.073	-3.736	-3.545
	R^2	0.9850	0.9750	0.9902	0.9847
AMV + mix specific	Slope	-2.826	-2.746	-2.267	-2.291
	R^2	0.9788	0.9877	0.9767	0.9925

Efficiency of the real time-PCR

Comparison of C_t values and reaction efficiencies of cDNA amplification.

Criteria for inclusion: $C_t < 39$, $SD < 0.5$ and $R^2 > 0.98$

Method	cDNA dilution in PCR mix							E%
	1:10	1:40	1:160	1:640	1:2560	1:10240		
6-MERS M-MLV	TS	30.79 (0.01)	32.65 (0.04)	34.79 (0.33)	37.89 (0.42)	-	-	84
	TP	27.56 (0.04)	29.22 (0.04)	31.70 (0.05)	33.63 (0.15)	35.24 (0.35)	37.67 (0.40)	98
	DPD	28.97 (0.29)	30.82 (0.12)	32.71 (0.27)	34.99 (0.43)	-	-	100
	ACTB	20.43 (0.25)	21.30 (0.16)	23.20 (0.06)	25.43 (0.14)	27.76 (0.18)	30.09 (0.22)	100
15-MERS M-MLV	TS	29.37 (0.21)	30.61 (0.07)	33.34 (0.01)	35.98 (0.23)	-	-	85
	TP	28.30 (0.16)	29.54 (0.05)	31.64 (0.08)	33.38 (0.40)	35.96 (0.45)	38.02 (0.49)	100
	DPD	29.24 (0.14)	30.31 (0.14)	32.49 (0.31)	35.34 (0.48)	-	-	97
	ACTB	20.60 (0.13)	21.85 (0.17)	23.74 (0.21)	25.59 (0.11)	27.76 (0.19)	30.36 (0.20)	100
Mix of specific AMV	TS	-	29.88 (0.48)	31.66 (0.04)	34.17 (0.43)	35.80 (0.45)	38.60 (0.47)	91
	TP	-	26.76 (0.05)	28.86 (0.08)	31.01 (0.30)	33.45 (0.40)	36.26 (0.40)	80
	DPD	-	27.96 (0.08)	30.54 (0.18)	32.65 (0.28)	35.28 (0.35)	36.48 (0.48)	86
	ACTB	18.44 (0.04)	19.95 (0.14)	21.84 (0.05)	24.22 (0.23)	26.42 (0.02)	28.98 (0.11)	92

Analisi quantitative: l'RNA deve essere:

⇒ di buona qualità
per avere
adeguate analisi
quantitative

⇒ Valutazione e
riduzione degli
inibenti

⇒ libero da DNA,
soprattutto se il
target è senza
introne

⇒ libero da
nucleasi per lunghi
periodi di
conservazione

NOTE

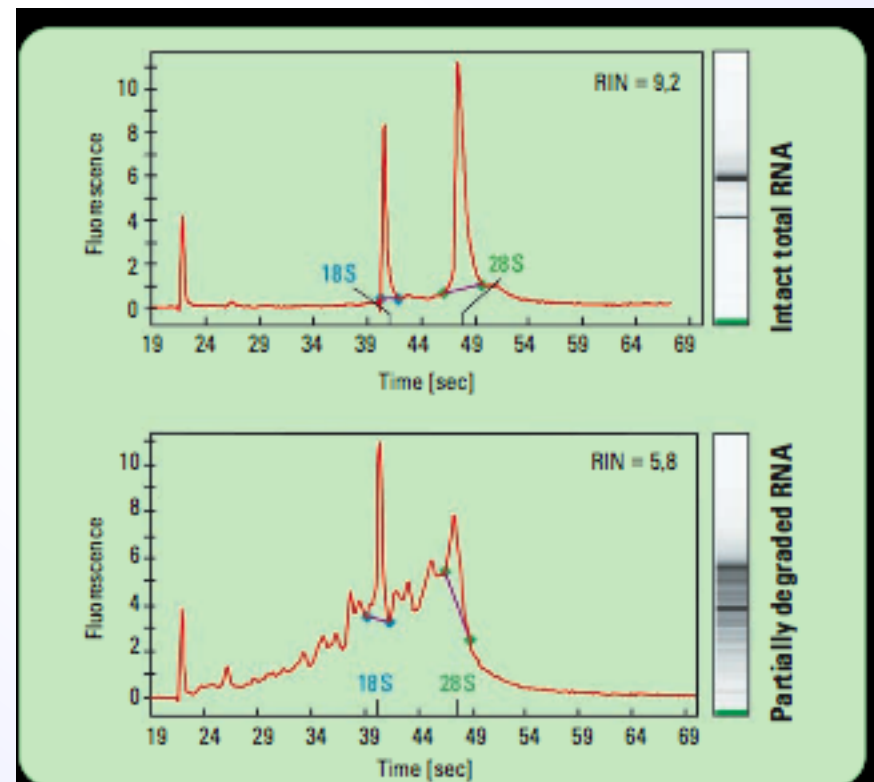
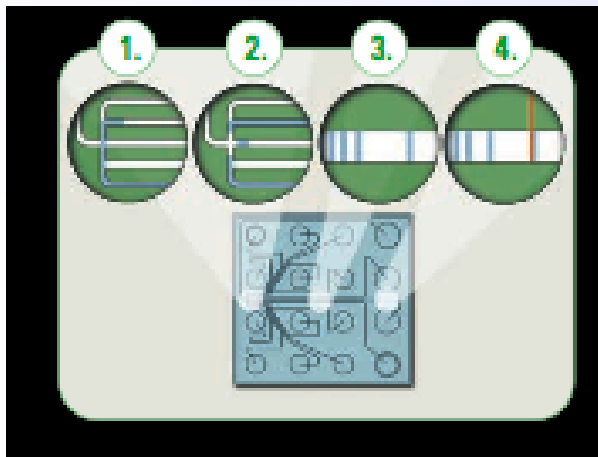
- ☞ Ci sono numerosi inibitori della RT-PCR nel sangue e tessuti.
- ☞ La presenza di inibenti può essere valutata su diluizioni successive del template (andamento non lineare della Ct)
- ☞ Analisi di un amplicone sicuramente assente (es di piante per analisi in umano). La presenza dell'amplicone è nella master mix. Se nei ≠ campioni la Ct non resta costante, ma presenta valori superiori ⇒ inibenti

Controllo di qualità dell'RNA

1. Valutazione delle bande ribosomiali del 18S e 28S con un sistema di elettroforesi capillare-(Agilent RNA LabChip). Il sistema confronta l'area dei picchi in confronto a 6 RNA di riferimento. RIN = 10 RNA intatto, RIN= 4 non c'è evidenza dei ribosomiali. Saggio 3'-5' con il GAPDH: la reazione è fatta impiegando oligodT per l'RT. Si fa una multiplex PCR per quantificare 3 ampliconi (saggi specifici). I 3 frammenti di amplificazione sono tutti per il GAPDH, ma uno è vicino al 5', il secondo è posizionato al centro e il terzo verso il terminale 3' dell'RNA. La progressione dell'RT verso il 5' è in relazione alla qualità dell'RNA. Un rapporto di Ct 3':5'=1 indica elevata integrità, mentre un rapporto >5 indica degradazione.



1. The sample moves through the microchannels from the sample well.
 2. The sample is injected into the separation channel.
 3. Sample components are electrophoretically separated.
 4. Components are detected by their fluorescence and translated into gel-like images (bands) and electropherograms (peaks).
- 1.1. 1.2. 3. 4.



4
RNase degradation of RNA samples is a common reason for failed downstream experiments. The Agilent 2100 bioanalyzer provides RNA quality control results in both gel-like image as well as electrophoretic data making it easy to detect even small degradation effects. In addition an RNA Integrity Number (RIN) is provided for each total RNA sample allowing standardization.