

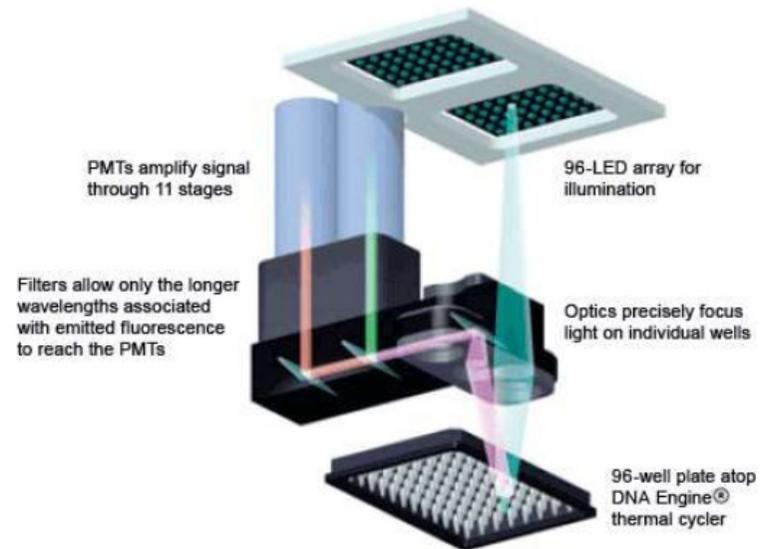
## Real-Time PCR: applicazioni

- **Quantificazione dell'espressione genica**
- **Genotyping**
- **Polimorfismi**
- **Quantificazione virale (i.e. HIV)**
- **DNA mitocondriale**
- **Controllo di qualità e validazione dei saggi**
- **Analisi batteriologiche (ALIMENTI, ETC..)**
- **Controllo degli OGM**
- **miRNAs**

## Come lavora la Real-Time PCR



### Instrumentation of real time PCR :



# La PCR Real-Time

- Le tecnologie **Real-Time** comprendono sistemi di amplificazione PCR in grado di ottenere simultaneamente nella stessa provetta sia il processo di **amplificazione** sia quello di **rivelazione** dell'amplificato.
  - Si avvalgono di particolari strumenti che uniscono un **termociclatore** ad un **fluorimetro** e che permettono di monitorare in tempo reale la quantità di prodotto che si sta formando nella fase esponenziale di amplificazione e di ottenere così stime della concentrazione del DNA bersaglio di partenza (PCR quantitativa)
- La rivelazione del DNA amplificato avviene tramite l'utilizzo di particolari sonde specifiche per i frammenti da amplificare che generano segnali fluorescenti.

## PCR Convenzionale vs. PCR Real-Time

### VANTAGGI:

- QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS
- **SENSIBILE (10 – 10<sup>10</sup> copie di stampo; 3pg di DNA)**
- ACCURATA
- VELOCE (no gels)
- SICURA (no EtBr)
- Facile determinazione e comparazione campioni
- Analisi simultanea di molti campioni (96 wellsplate)
- Si presta all'analisi di DNA degradato o incluso, o fissato

### SVANTAGGI:

- Sensibilita' (**RISCHIO** di contaminazioni-falsi positivi)
- **VARIABLE EFFICIENZA** di amplificazione a seconda della sequenza
- Richiede conoscenza di base delle sequenze da amplificare e messa a punto per coppie di oligonucleotidi di innesco (primers)
- Può sintetizzare frammenti relativamente corti

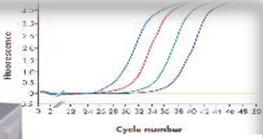
# Real-Time PCR:

- **COMPONENTI DELLA REAZIONE:**
  - • DNA target
  - • DNA polimerasi
  - • Due oligonucleotidi
  - • dNTPs
  - • Probe fluorescente

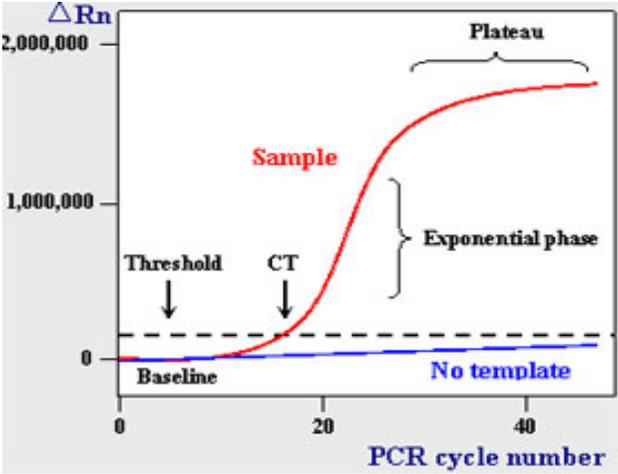
# Analisi PCR quantitativa

# Real time PCR

impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione PCR. La misurazione della fluorescenza dà in tempo reale la quantità dello specifico prodotto di PCR



Termociclature con detector per fluorocromi e software per analisi dati



**Linea di base (baseline):** valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di un amplificato

**Linea soglia (Threshold):** scelta dall'operatore in modo da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale

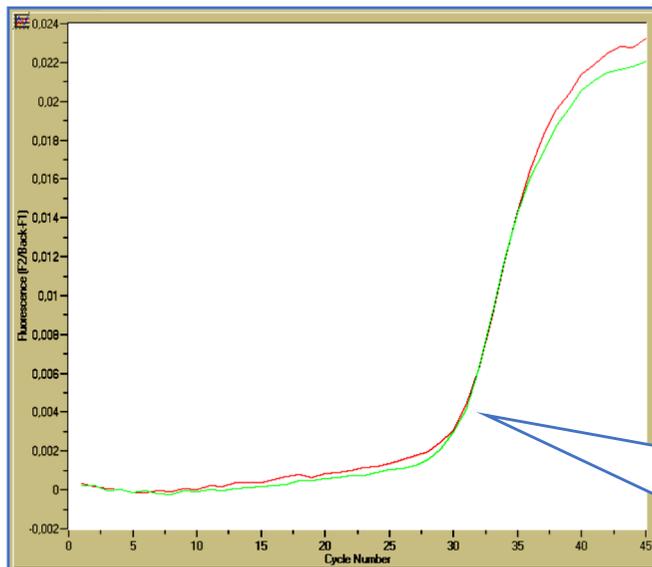
**Ciclo soglia:** E' il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della Threshold

# Real-Time PCR

misura in tempo reale la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione

## PCR Convenzionale vs. PCR Real-Time

Misura di fluorescenza: riflette quantità di amplificato prodotto in ogni ciclo



**END-POINT**  
rilevazione  
Tradizionale  
(semiquantitativa)

**TIME-COURSE**  
Rilevazione  
Real-Time PCR  
(qualitativa e  
quantitativa)

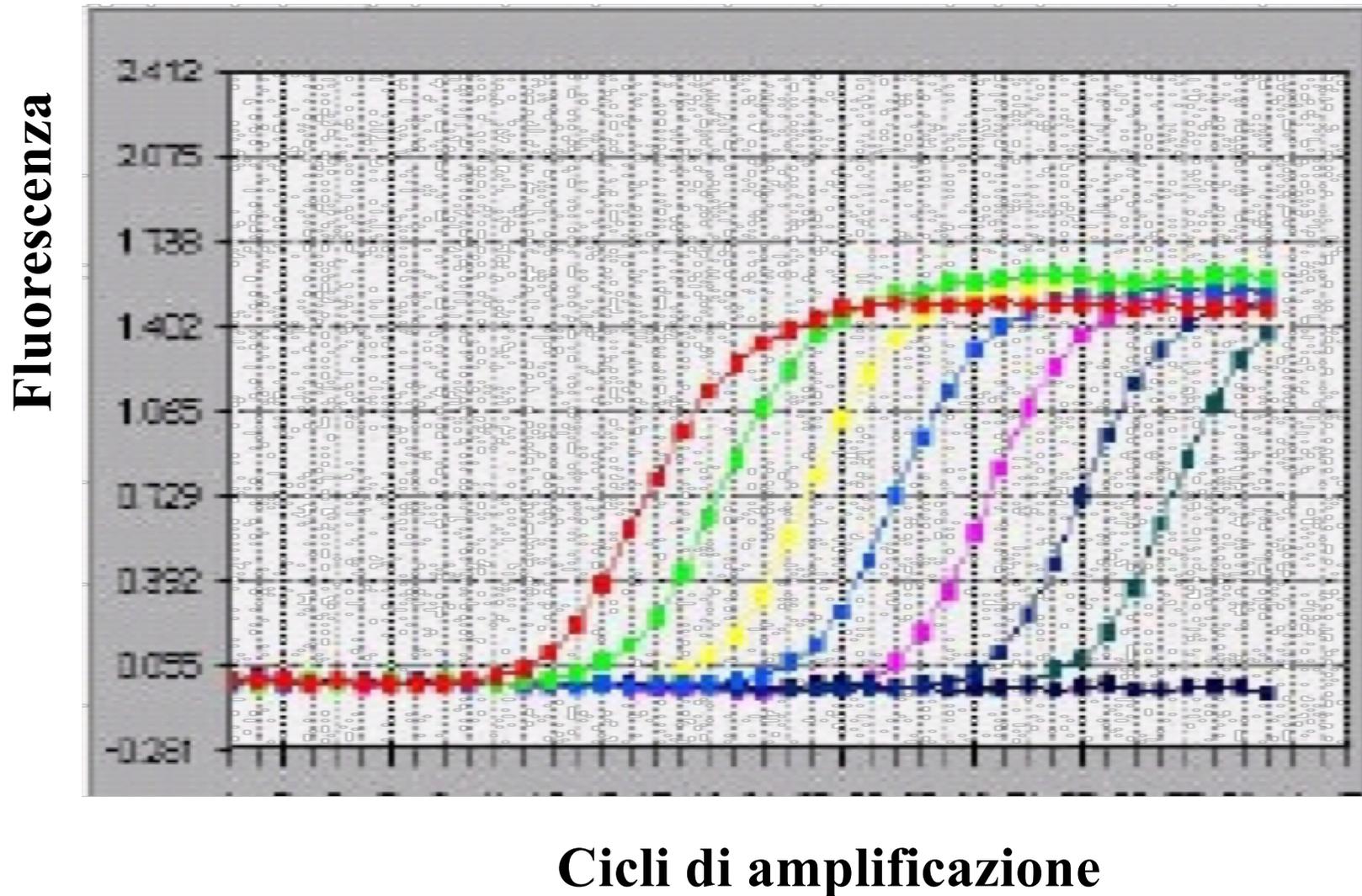
5 10 15 20 25 30 45



Agarose  
Gel

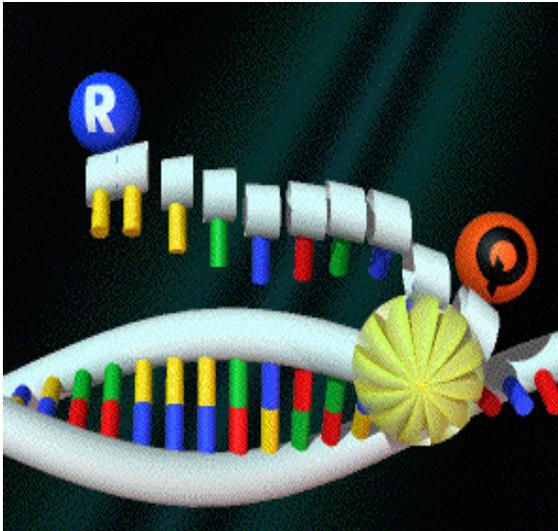
Conventional PCR

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui CT(=Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di DNA stampo iniziale

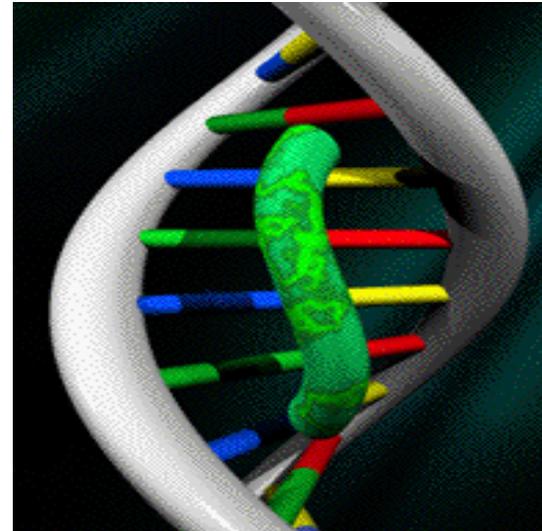


# Real-time PCR

TaqMan<sup>®</sup> probe  
based



SYBR<sup>®</sup> Green dye  
based

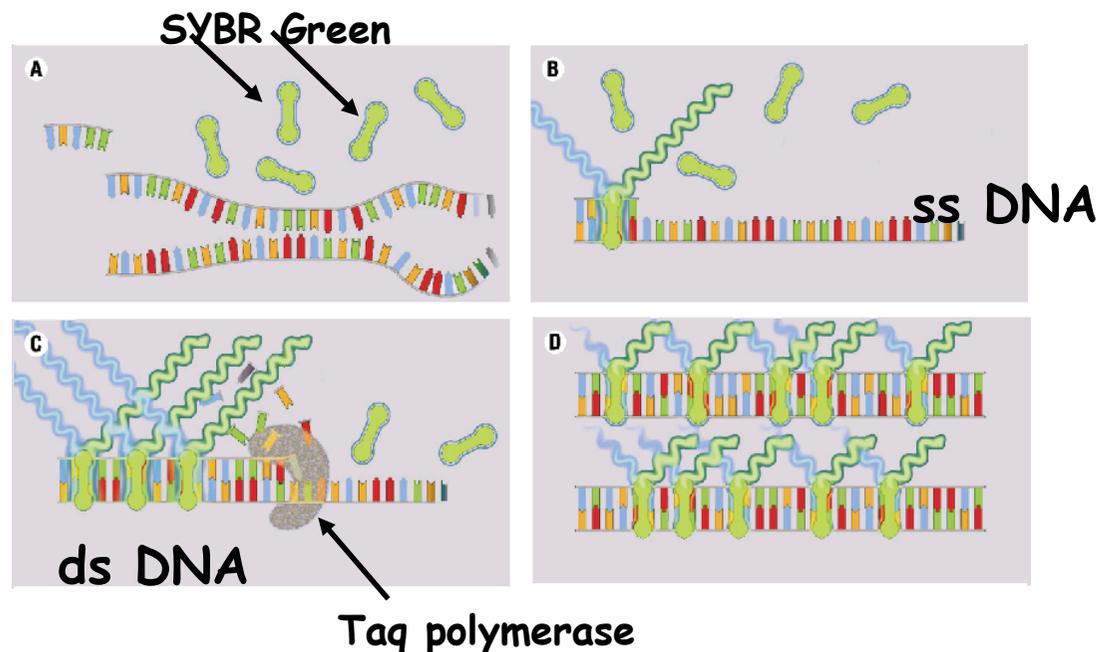


# SYBR Green

Il SYBR Green si lega al DNA a doppio filamento, nel solco minore, in modo non dipendente dalla sequenza. (si lega ai dimeri di primer, si lega ai prodotti di amplificazione aspecifici)

Il legame al dsDNA determina una forte emissione di fluorescenza (eccitazione 488 nm, emissione 520-530 nm), proporzionale alla quantità di amplificato.

- Denaturazione: nessuna fluorescenza
- Annealing: si sviluppa fluorescenza
- Estensione: aumenta fluorescenza con l'accumulo dell' amplificato
- Lettura della fluorescenza (Plate Read): in fase di annealing o, di solito, in fase di estensione.



SYBR Green 1



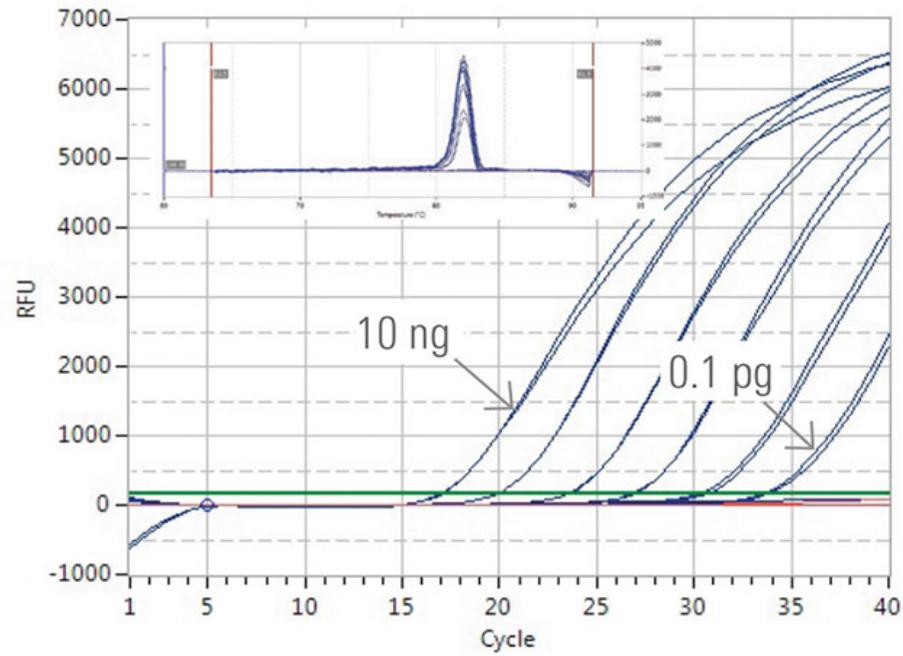
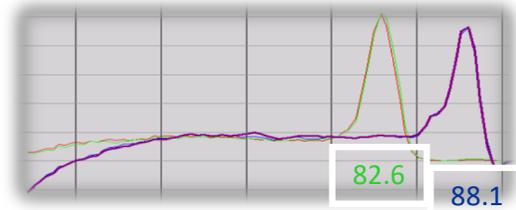
metodica semplice, non costosa  
MA aspecifica

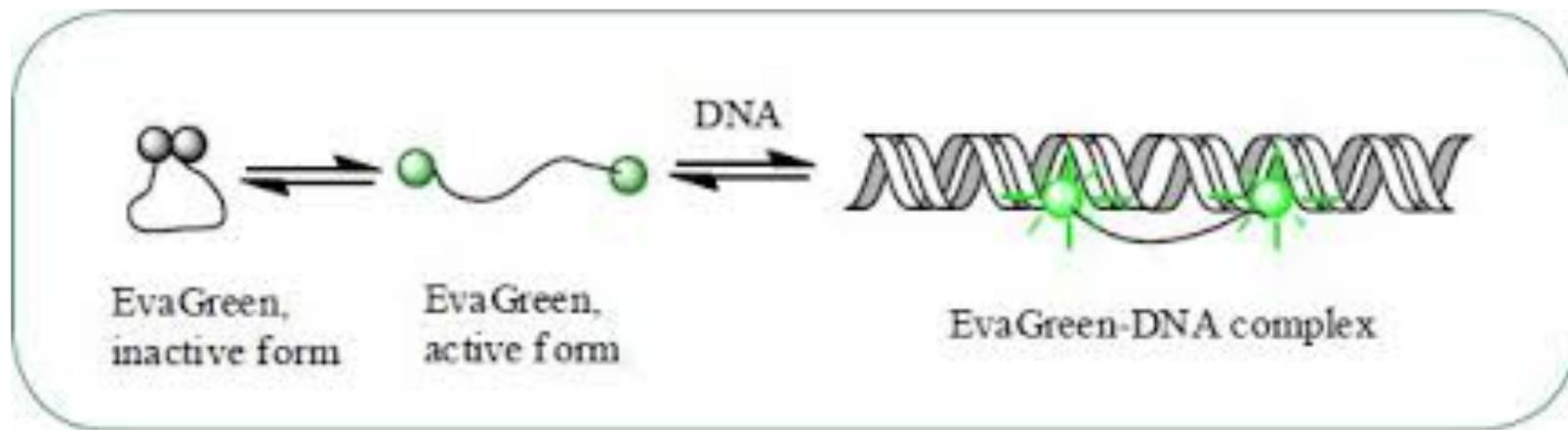


Analisi della curva di melting



melting peak





# Eva Green

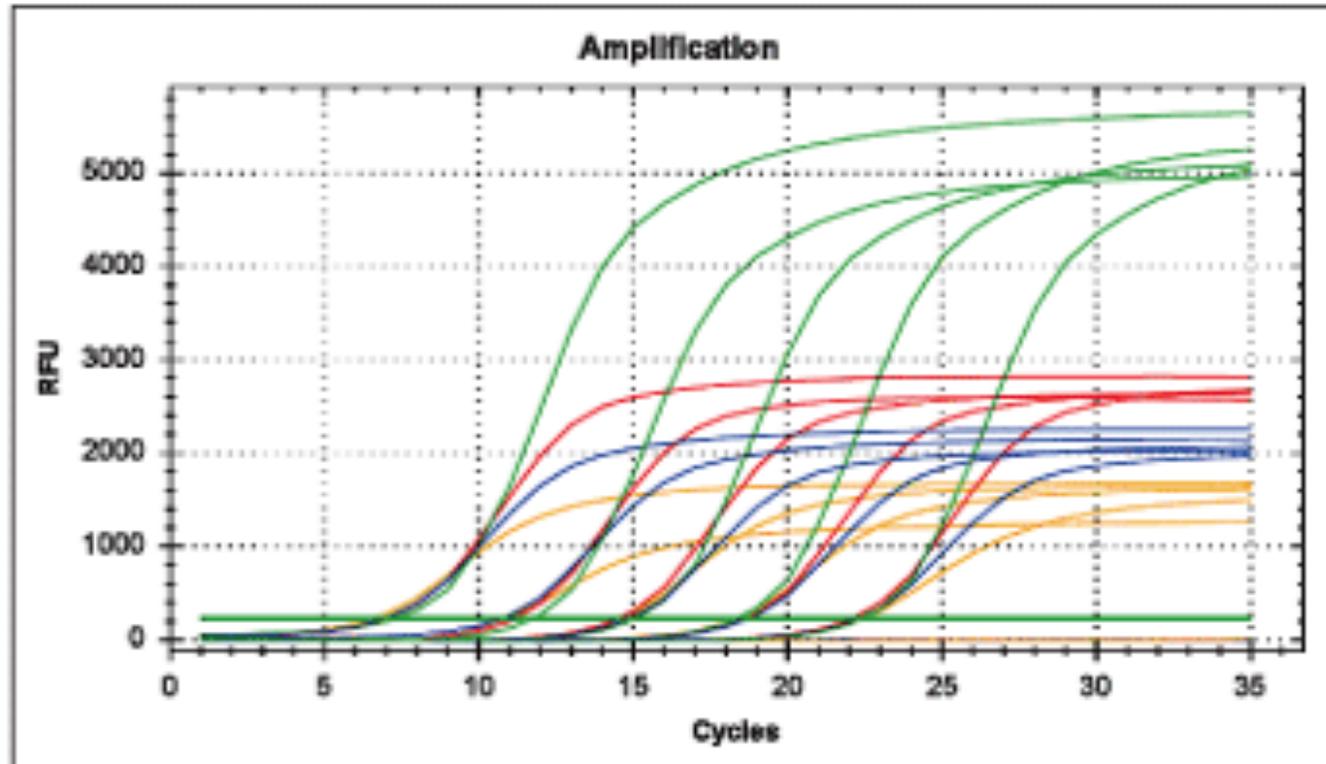


Fig 1. Comparison test results of WizPure™ qPCR Master (SYBR), WizPure™ qPCR Master (EVA) and competitor's SYBR green I Real-time-PCR kit using human beta-actin gene by CFX96 system (Bio-Rad).

Green : WizPure™ qPCR Master (EVA)

Red : WizPure™ qPCR Master (SYBR)

Blue : Roche's SYBR green kit

Orange : Bio-Rad's SYBR green kit

Esistono diversi tipi di sonde:

- Dual-labeled (come le sonde TaqMan)
- Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Molecular beacons
- Scorpion probes

# Sonda TaqMan



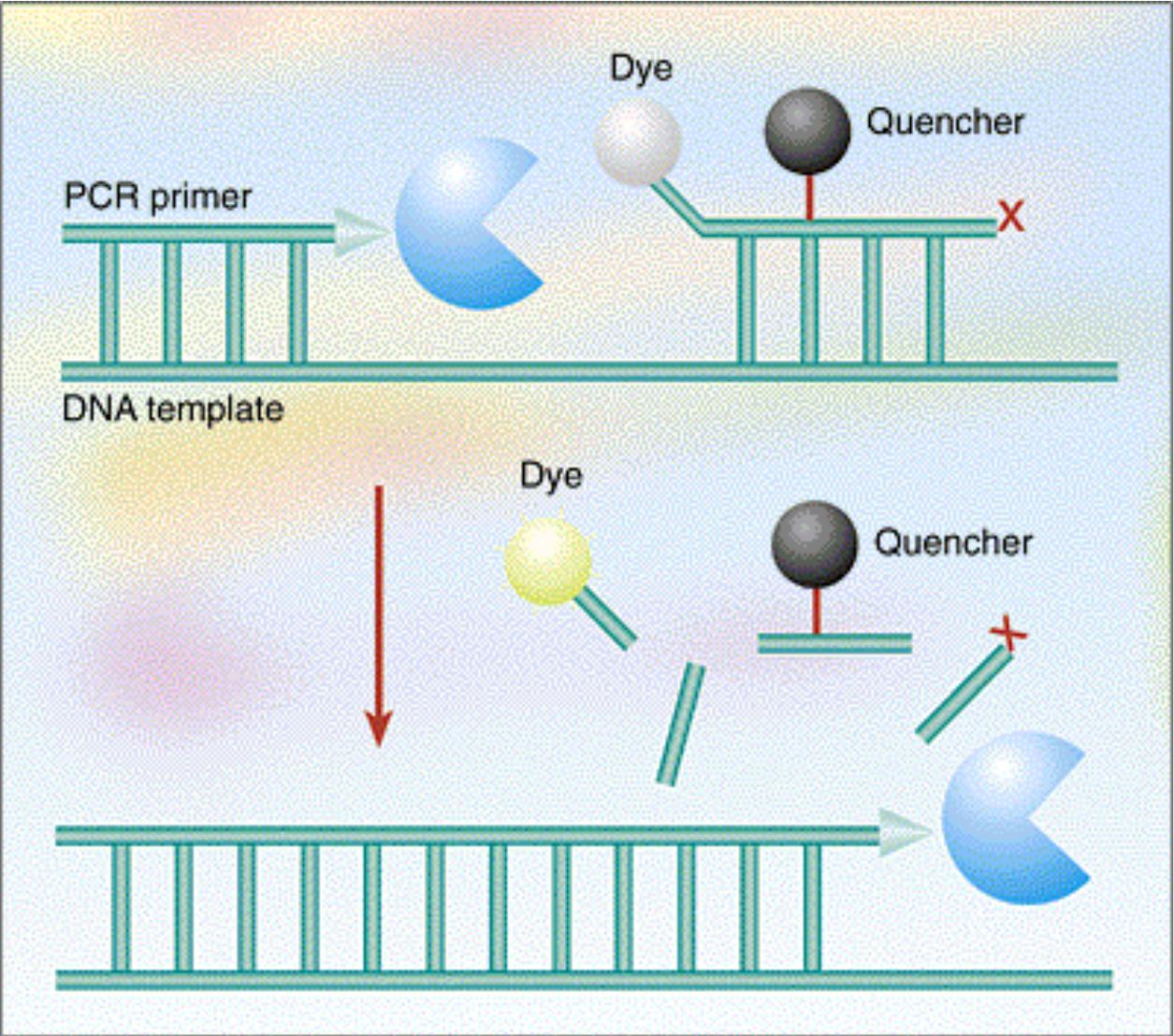
- Sonda oligonucleotidica complementare alla sequenza target, interna ai primers di PCR.
- La sonda è marcata con un fluoroforo ad una estremità ed un quencher all'altra

**5' REPORTER (R):** fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza

**3' QUENCHER (Q):** fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del reporter

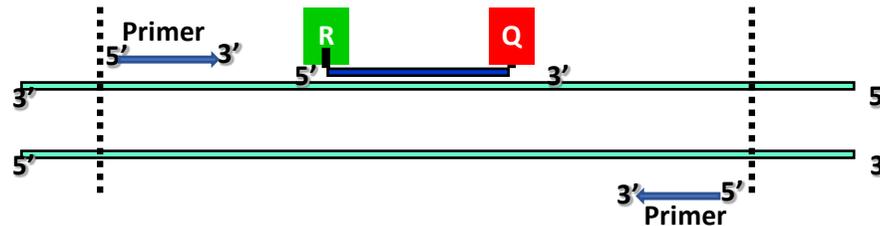
Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q

La distanza tra fluoroforo e quencher è tale da bloccare l'emissione di fluorescenza.



# Sonde TaqMan

La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare ad un tratto della sequenza bersaglio da amplificare:  
è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR



R

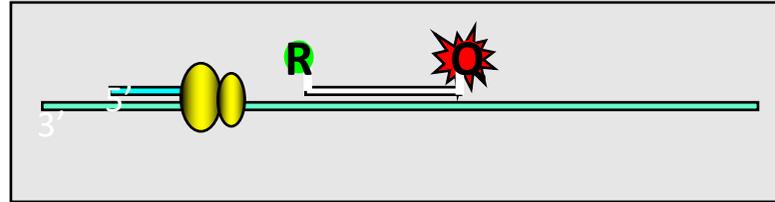
REPORTER: fluorocromo ad **alta** energia che **emette** fluorescenza

Q

fluorocromo a **bassa** energia che **spegne** la fluorescenza del reporter

Si libera 1 molecola di reporter per ogni copia di DNA duplicata

Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q



### Fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan<sup>®</sup> chemistry)

**Forward primer**

probe R Q

1. Polymerisation

**Reverse primer**

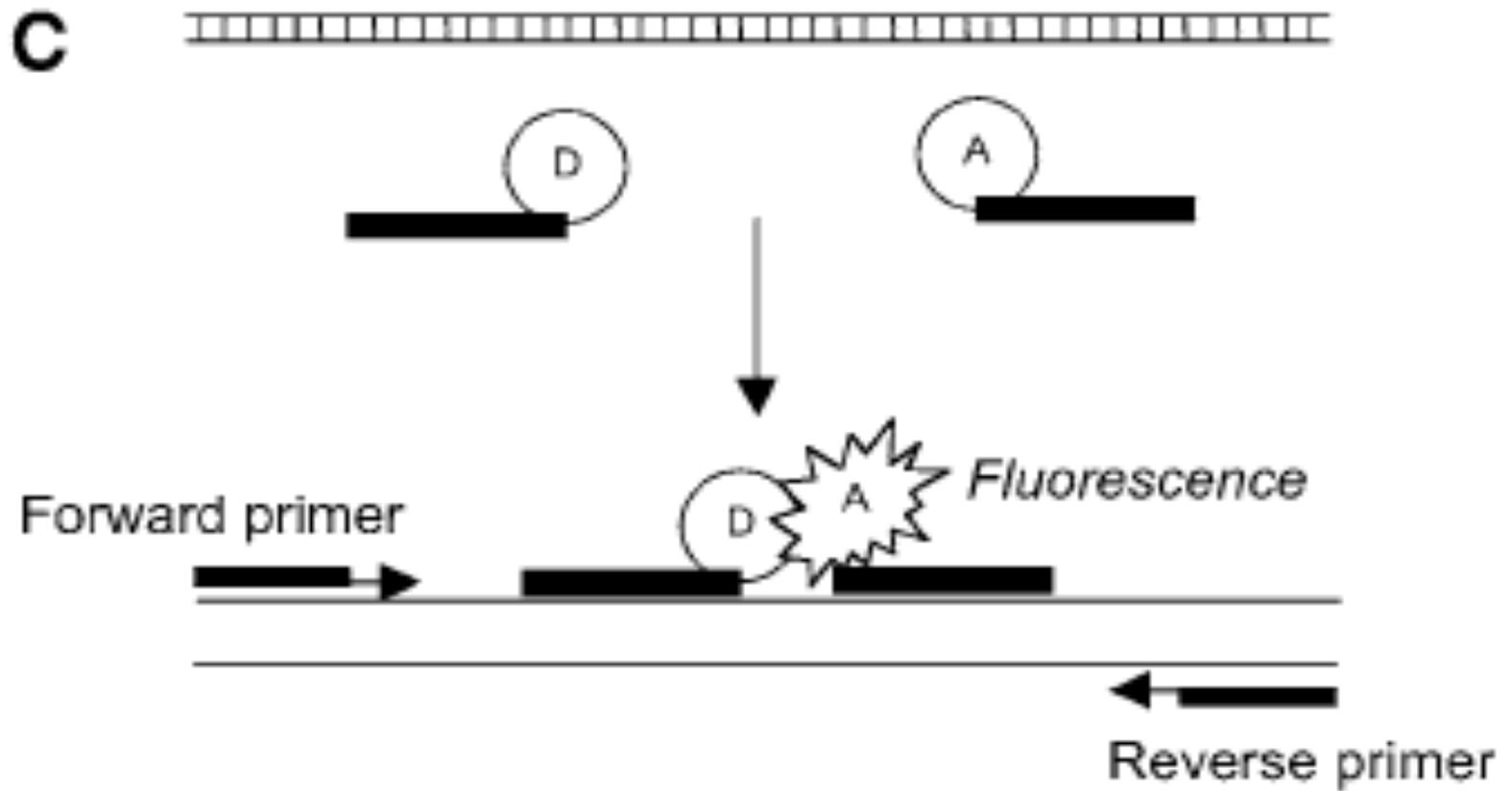
2. Strand displacement

3. Cleavage

4. Polymerisation completed

R = Reporter  
Q = Quencher

# FRET Probe



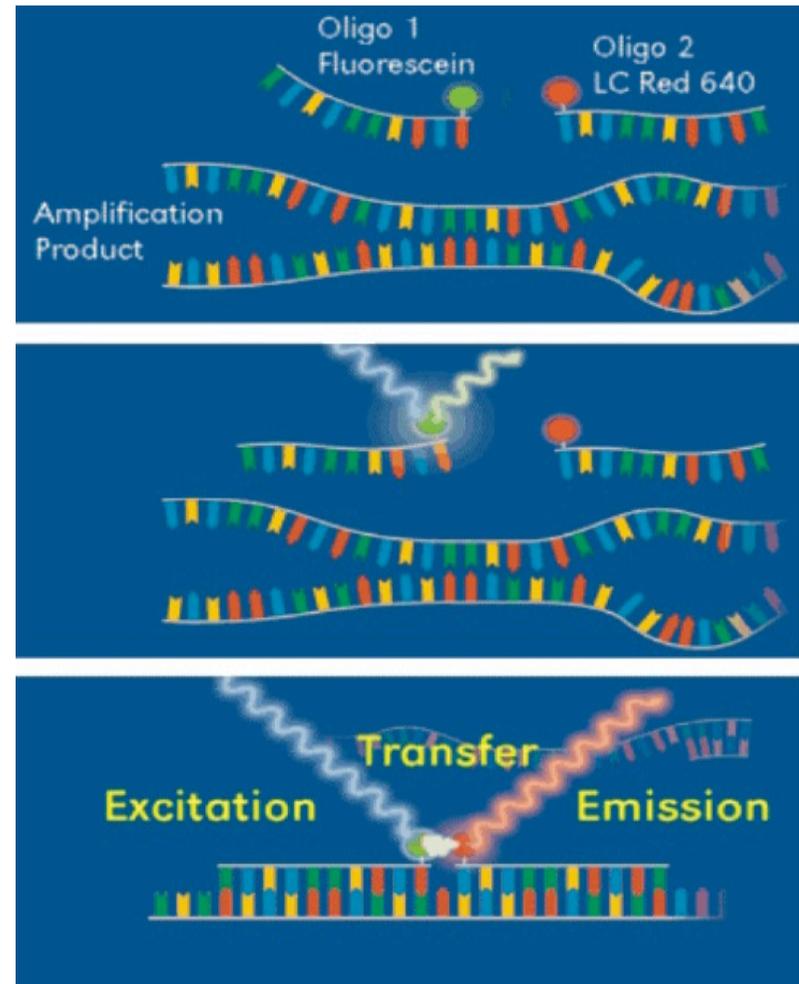
## Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Simili alle sonde TaqMan perché si legano al DNA bersaglio e vengono idrolizzate.

A differenza ci sono però **due sonde** ognuna marcata con un solo fluorocromo (**accettore e donatore**)

Quando le sonde non sono legate alle sequenze bersaglio il segnale fluorescente proveniente dall'accettore non è rilevato

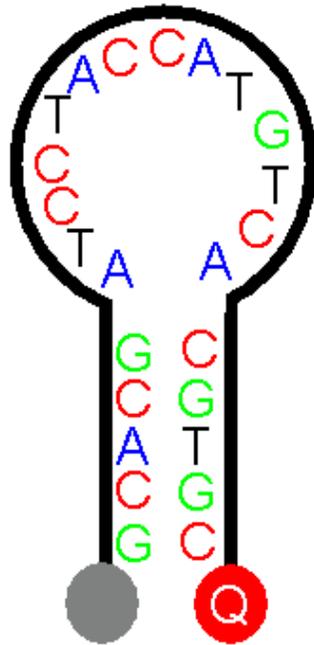
Durante lo step di annealing PCR, entrambe le sonde FRET ibridizzano alle sequenze bersaglio: ciò avvicina il fluoroforo donatore all'accettore e c'è il trasferimento di energia tra i due fluorofori e la produzione di un segnale fluorescente da parte dell'accettore che viene rilevato



# Molecular Beacons

- Sonda oligonucleotidica a forma di forcina
- L' oligo ha un fluoroforo ad una estremità ed un quencher all' altra

Loop



Stem

Fluorophore

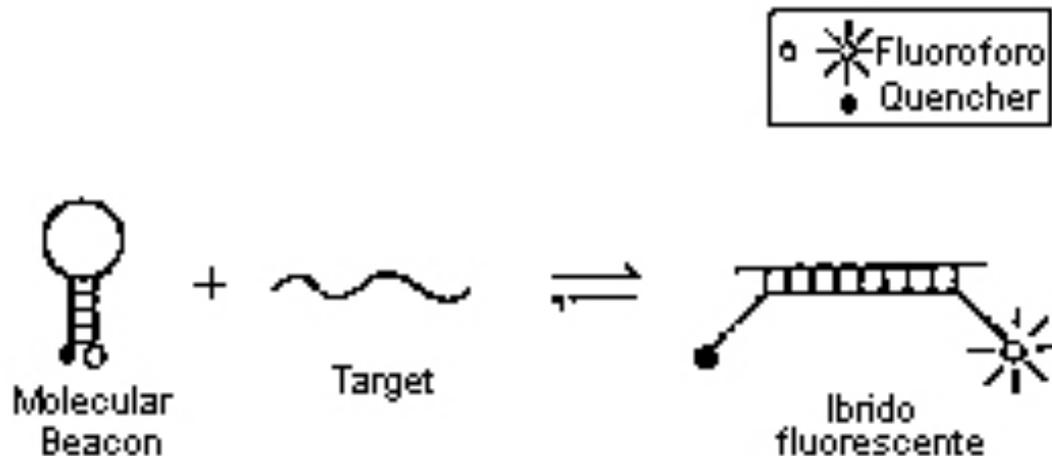
Quencher

Il *loop* è complementare alla sequenza bersaglio, interna ai primers di PCR

Lo *stem* è costituito dalle estremità complementari tra loro

In assenza della sequenza bersaglio, la sonda rimane chiusa e il quencher blocca l' emissione del vicino fluoroforo.

# Molecular Beacons: come funzionano

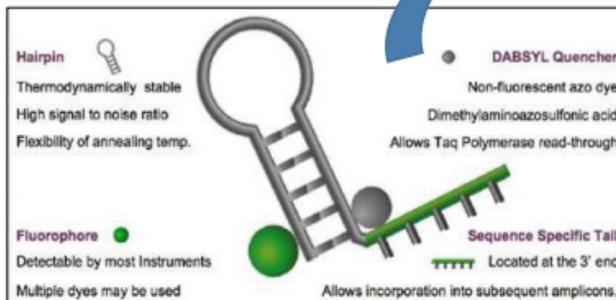


- Denaturazione: fluorescenza non specifica dovuta a denaturazione della sonda
- Annealing: si sviluppa fluorescenza solo se la sonda ibrida con il target specifico
- Estensione: la sonda si dissocia dal target
- Lettura della fluorescenza (Plate Read): in fase di annealing

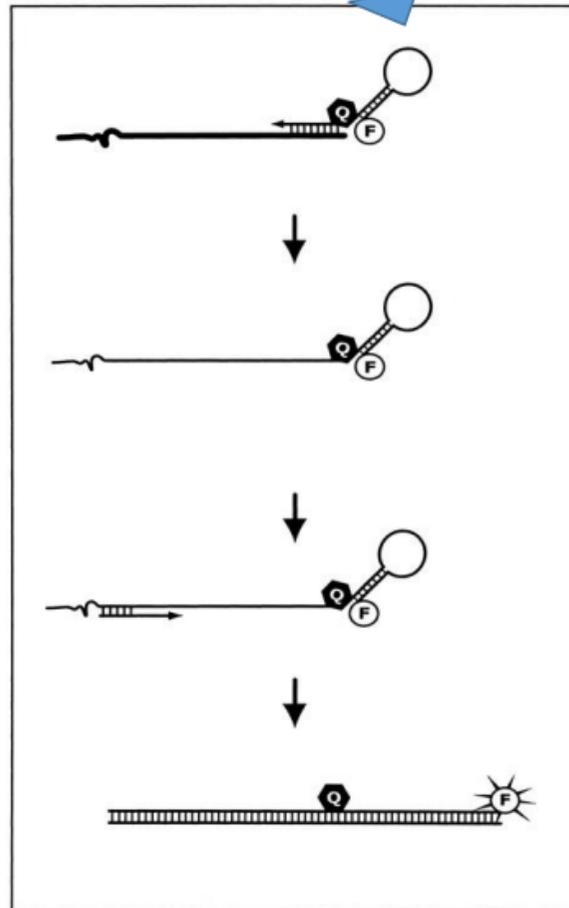
Se la sonda è disegnata correttamente, è sufficiente il mismatch di una sola base per impedire l'ibridazione con il target.

**A differenza delle sonde TaqMan, le molecular beacons non vengono distrutte durante la reazione di amplificazione per cui possono reibridizzarsi durante il successivo ciclo**

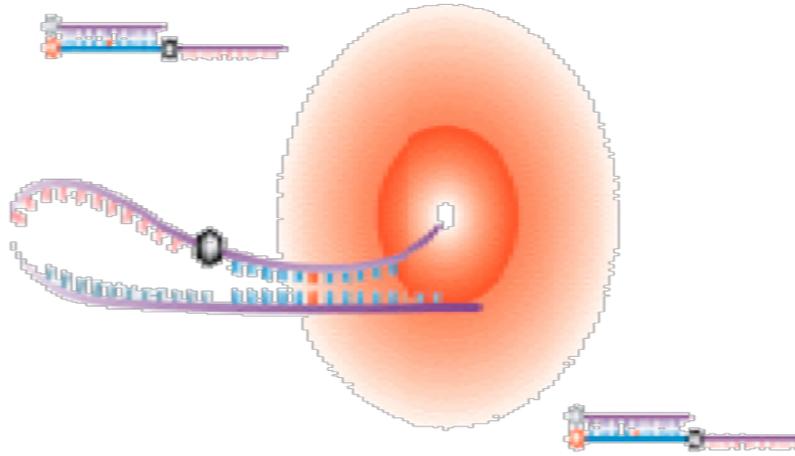
## FRET probe (Fluorescence Resonance Energy Transfer): sunrise primers



**Sunrise primers** are similar to Molecular Beacons and Scorpions primer probes, **which combine in the same molecule both the PCR primer and detection mechanism**



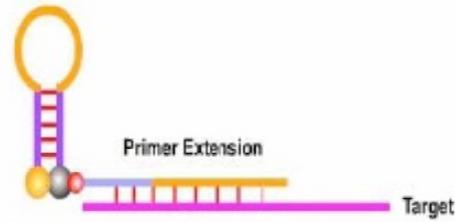
1. The Sunrise primer-probes have reporter dyes attached to 3' end of the stem and quenchers attached to the 5' end of the stem
2. These probes consist of a dual-labeled (reporter and quencher fluorophores) hairpin loop on the 5' end, with the 3' end acting as the PCR primer. When unbound, the hairpin is intact, causing reporter quenching via FRET
3. They are self-complementary and dissociate through the synthesis of the complementary strand.
4. Upon integration into the newly formed PCR product, the reporter and quencher are held far enough apart to allow reporter emission



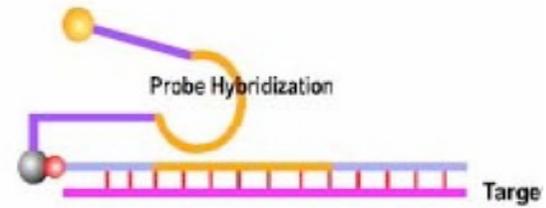
La **sonda Scorpion** è un primer con l'estremità 5' legata ad una molecola simile ad una sonda Molecular Beacons. Durante la PCR, il primer Scorpions™ viene esteso e la sequenza specifica della sonda che forma l'ansa è in grado di legare la sequenza complementare che si trova all'interno dello stesso filamento di DNA. Come una sonda Molecular Beacons, l'ibridazione apre l'ansa e allontana il reporter dal quencher e si ha emissione di fluorescenza misurabile.



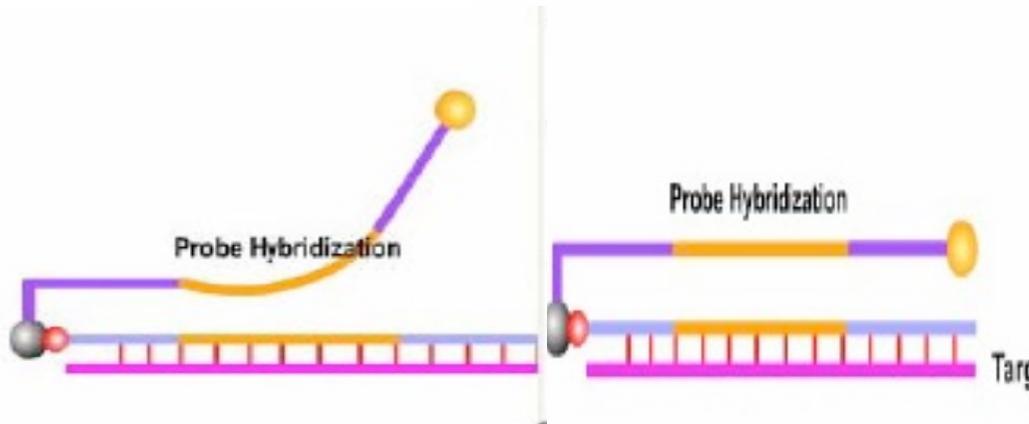
Scorpion Primer



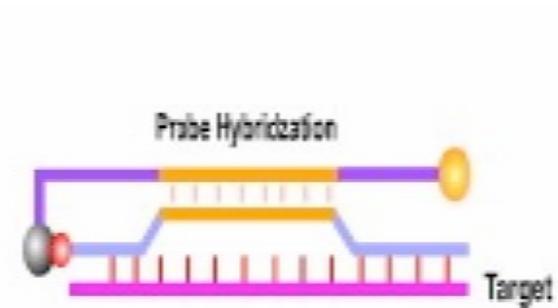
Scorpion Primer



Scorpion Primer



Scorpion Primer

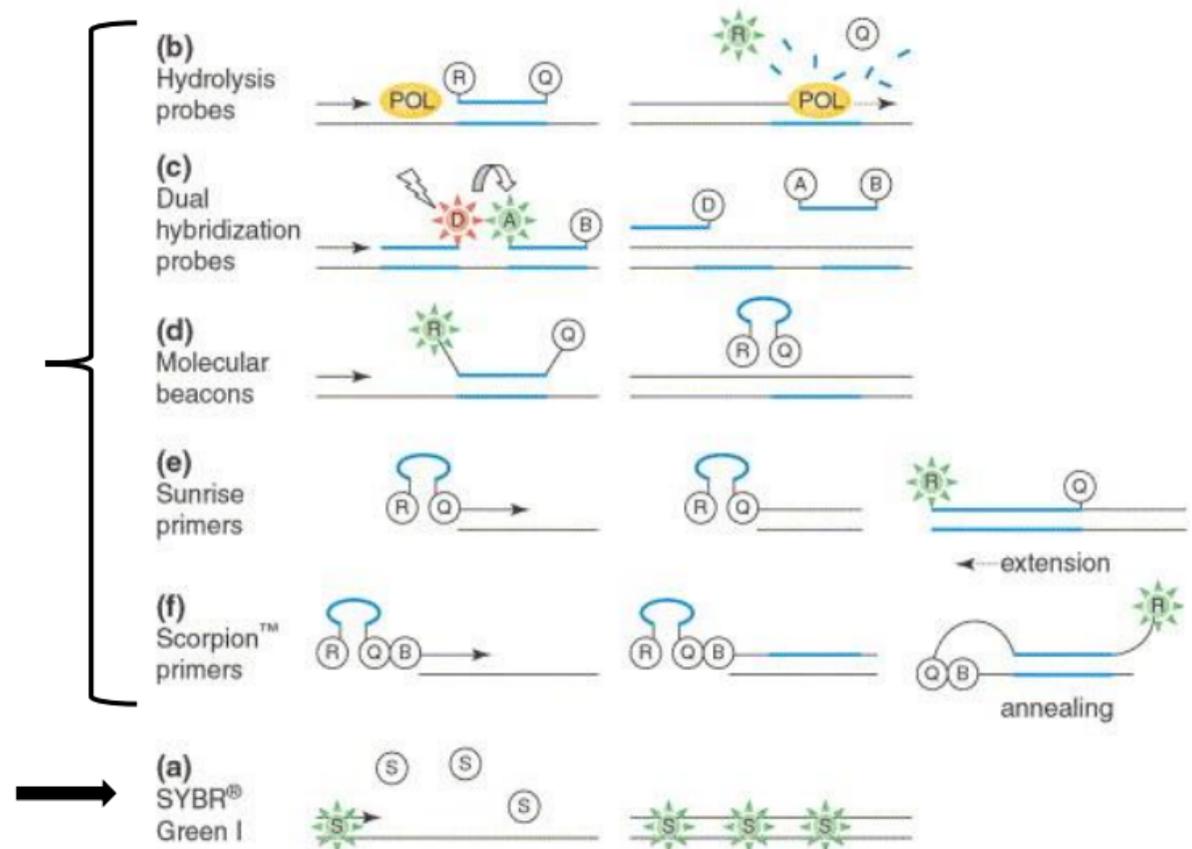


Scorpion Primer

## Fluorescent molecules used in quantitative real time PCR

**1. Utilizzo di sonde oligonucleotidiche marcate con molecole fluorescenti e leganti specifiche sequenze di DNA bersaglio**

**2. Utilizzo di molecole fluorescenti che si intercalano in modo aspecifico tra le basi di DNA negli amplificati della reazione di PCR**



## ➤ ANDAMENTO ESPONENZIALE

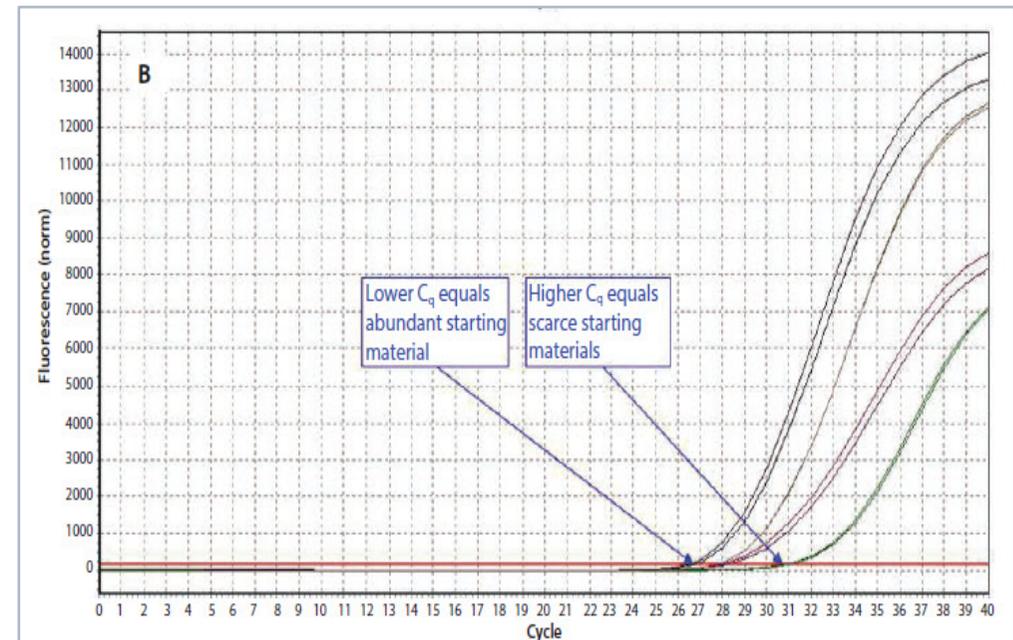
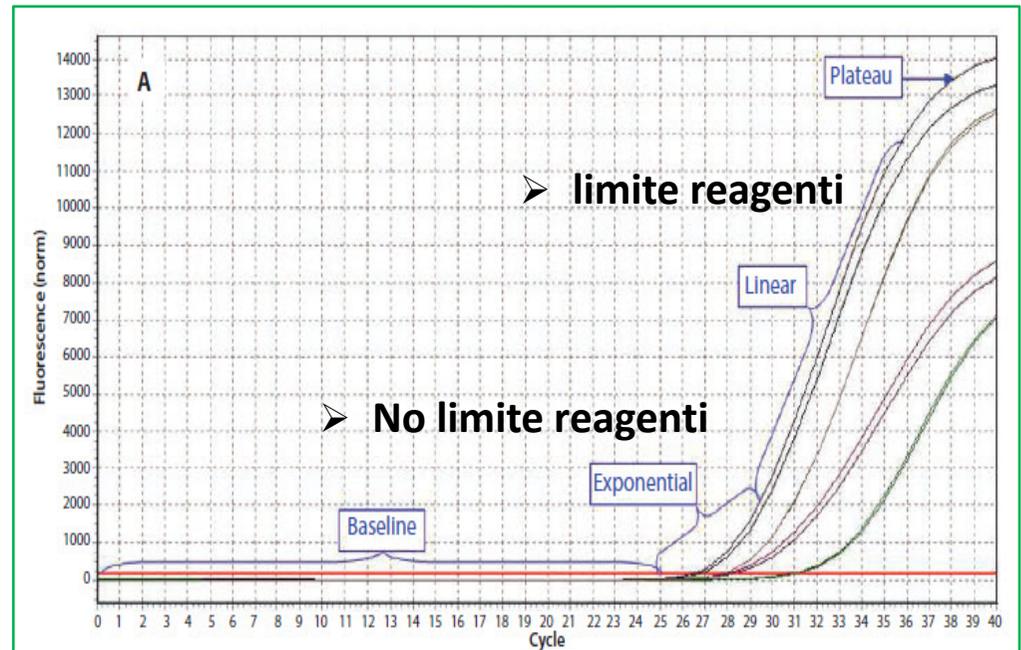
During the exponential phase of PCR, the amount of PCR product is proportional to the amount of starting template that was initially added. Therefore, the **exponential phase** of PCR is analyzed to **quantitate the initial template concentration**. The commonly used method is called the **cycle threshold method (Ct method)**.

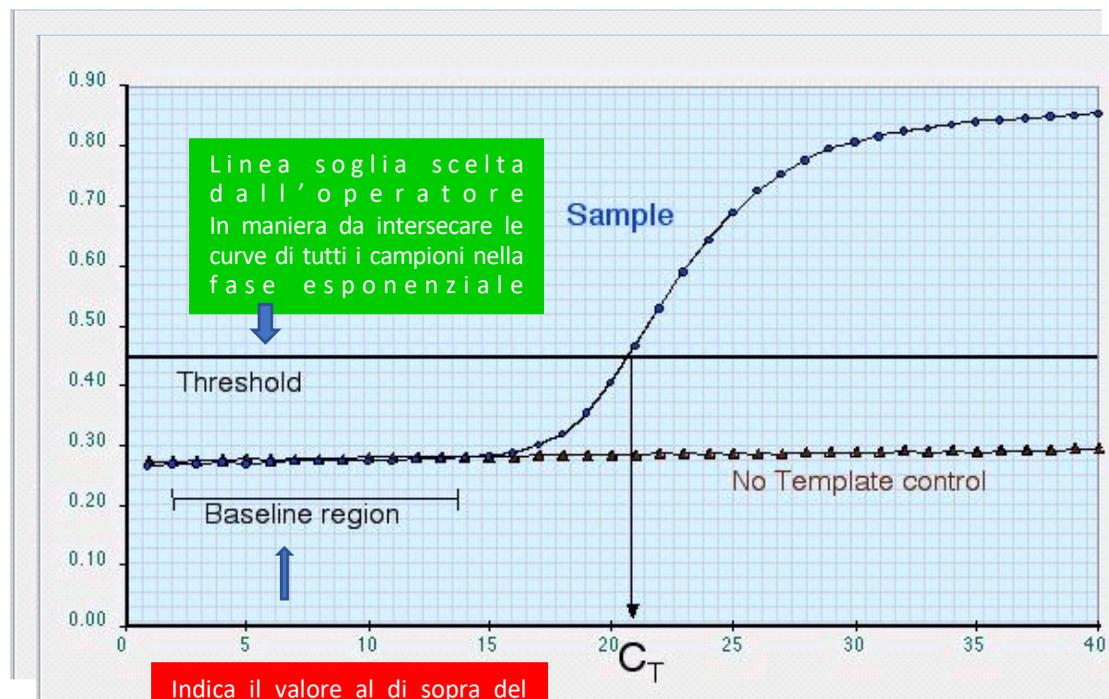
➤ La quantità DI AMPLIFICATO RADDOPPIA IN OGNI CICLO

$$Y = N(1+E)^n$$

Y = resa di amplificazione  
N = numero di molecole di DNA di partenza  
E = **efficienza di reazione**  
n = numero di cicli di amplificazione

➤ La quantità iniziale di DNA è inversamente proporzionale al numero di cicli necessario per la rivelazione (Ciclo soglia, Ct)

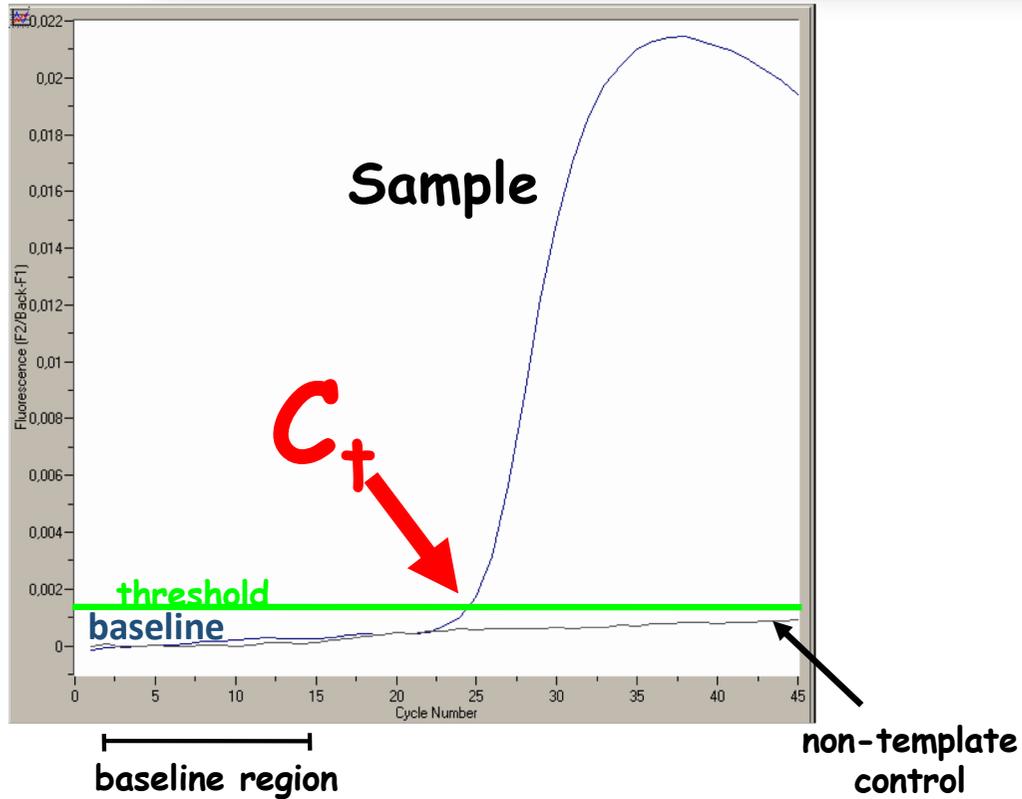




Indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di un amplificato

E' il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della Threshold

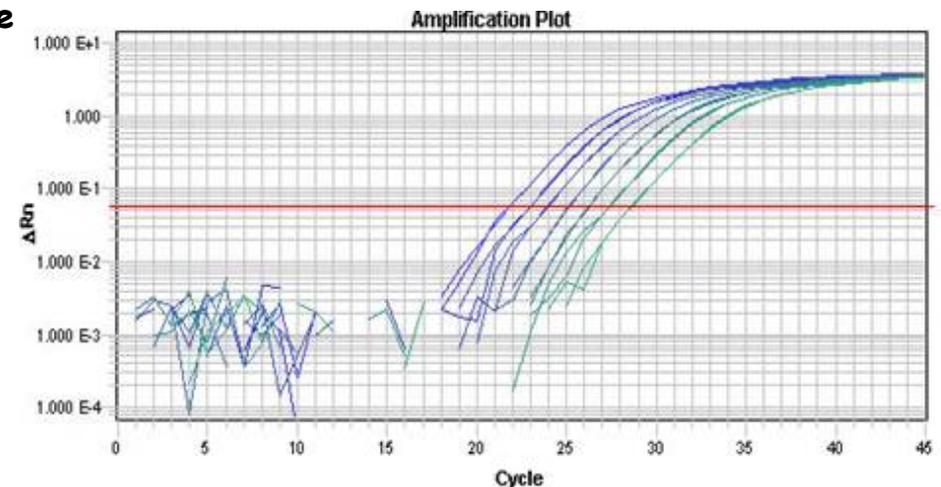
**Amplification curve:** plot tra numero di cicli e fluorescenza rilevata (proporzionale alla quantità di amplificato prodotto)



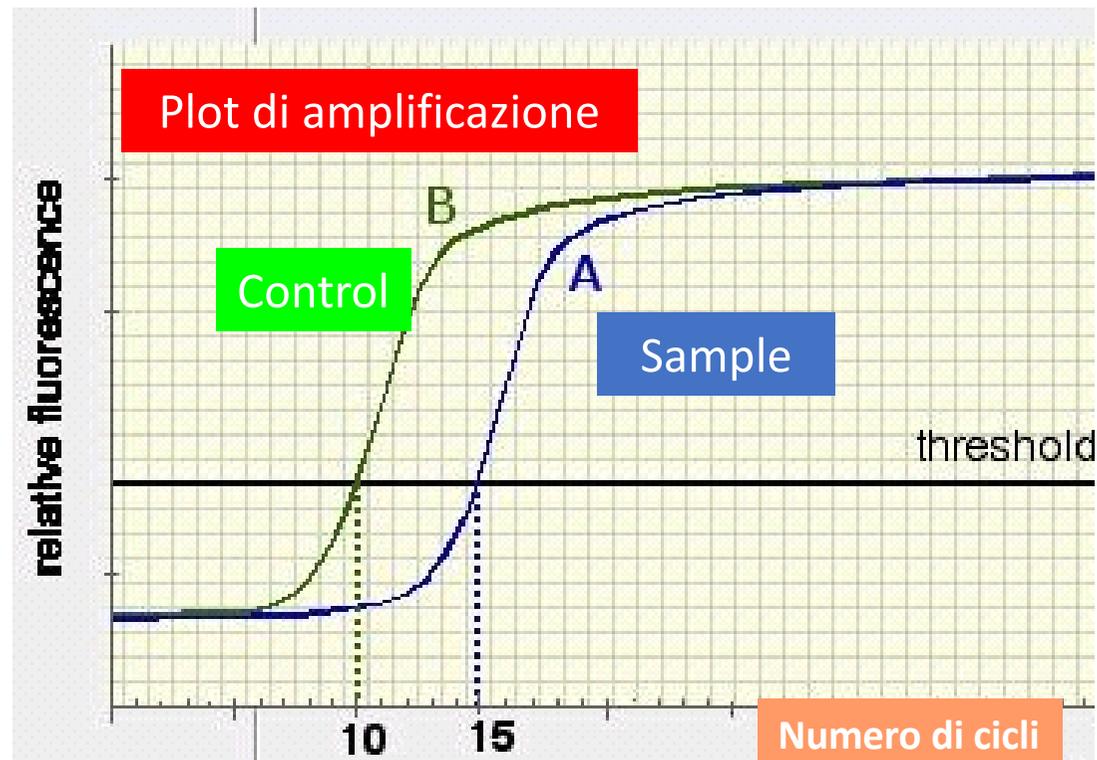
**C<sub>t</sub> = threshold cycle:** è il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della Threshold

**Threshold :** linea soglia scelta dall'operatore in modo da intersecare tutte le curve dei campioni in fase esponenziale

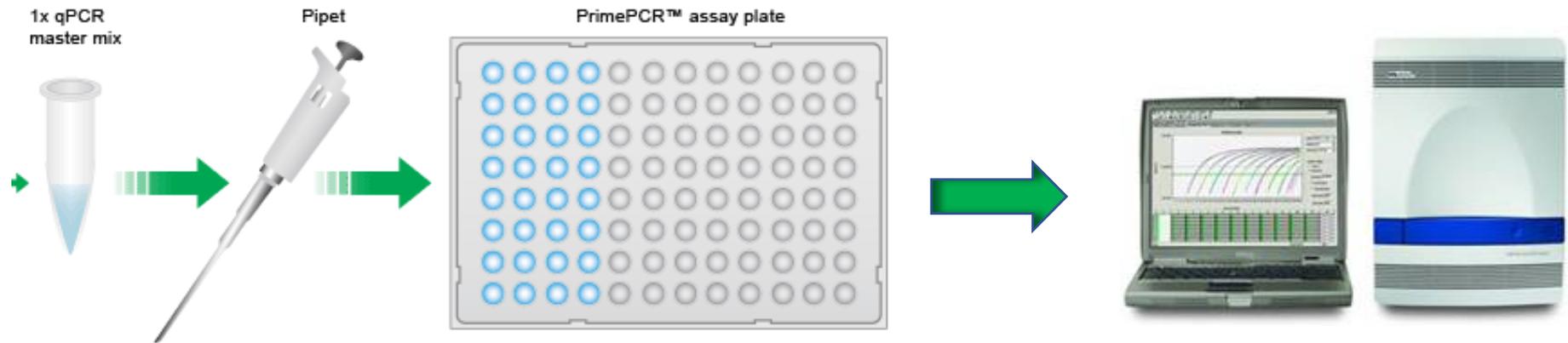
**Baseline region:** valore al di sopra del quale inizia l'accumulo dell'amplificato



# Quantitativa relativa



$$\Delta C_T$$

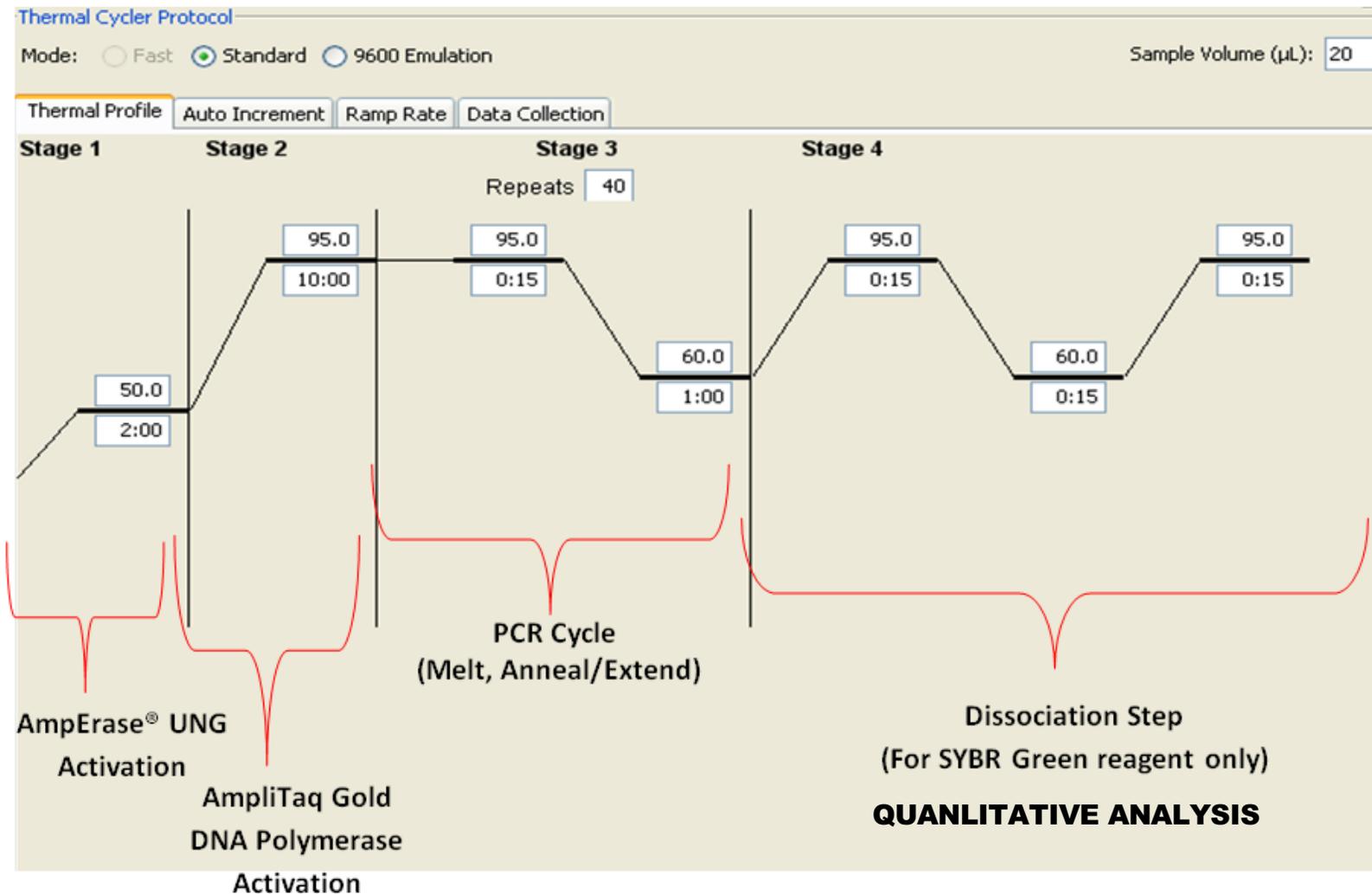


- PRIMER SET
- SYBR green
- TAQman chemistry: sonde
- 1 step/2 steps

- Samples: target gene
- Reference gene
- Standard curve
- Positive control (calibrator)
- Negative control cDNA
- NTC (bianco)

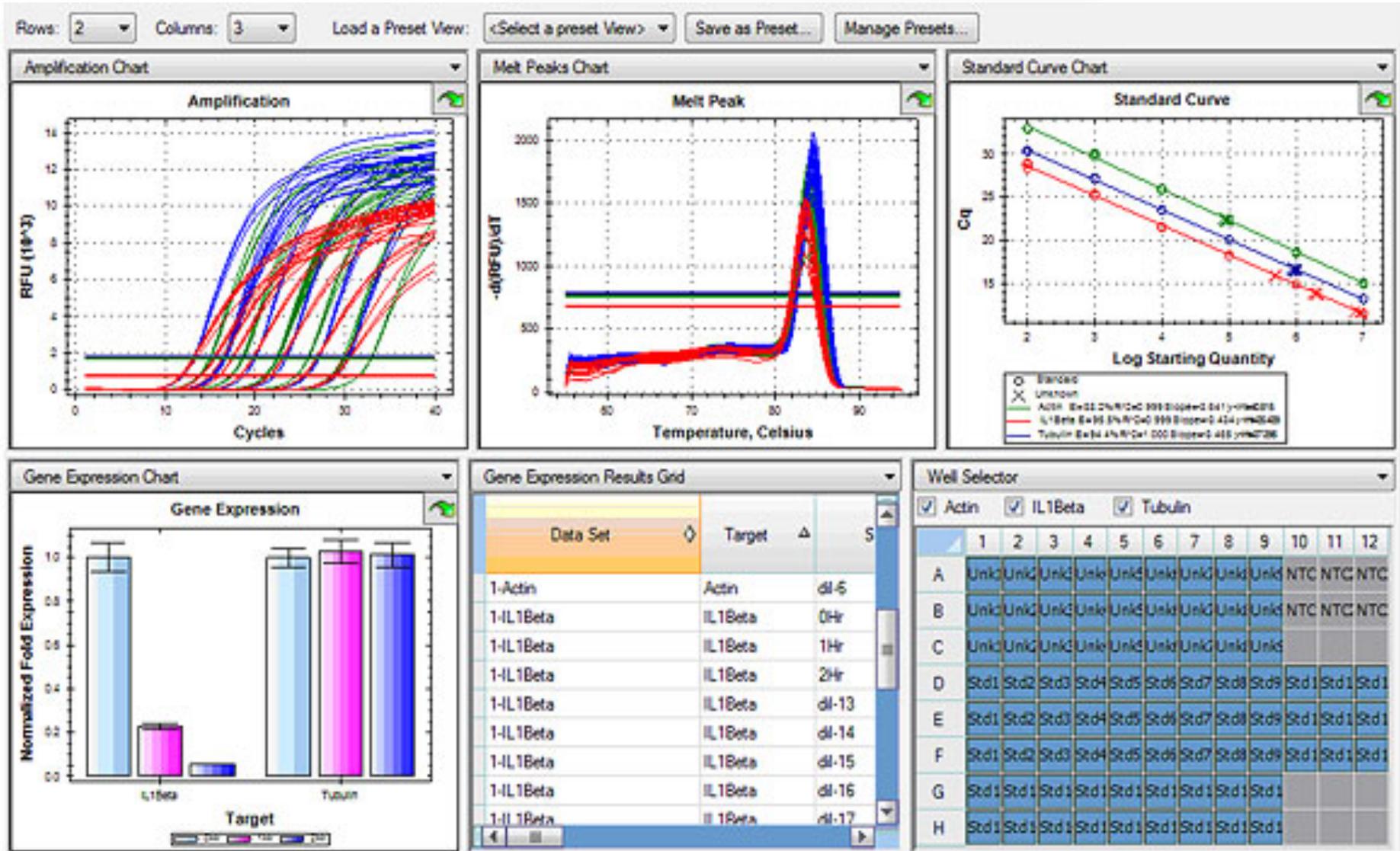
DATA  
INTERPRETATION

# RUN: setting



**UNG= Uracil N-Glycosylase**

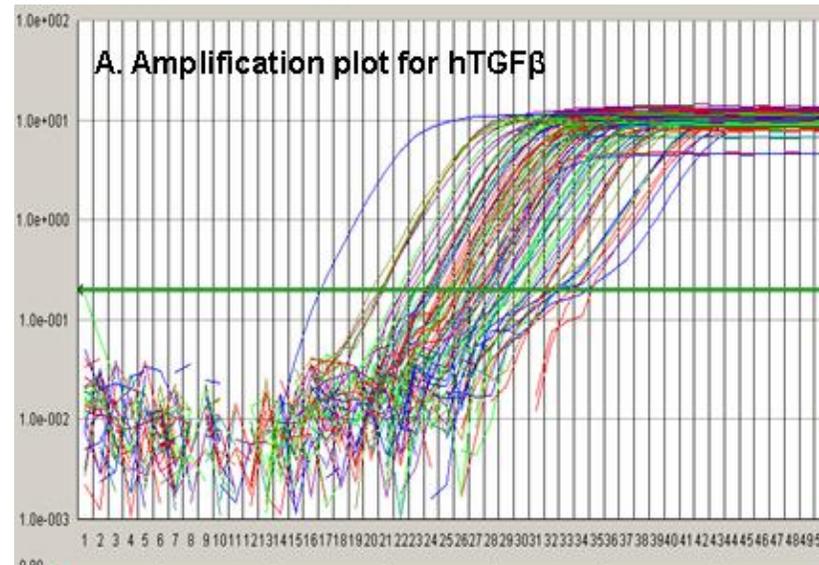
# CLASSICO SCREEN



Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui CT (Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di DNA stampo iniziale

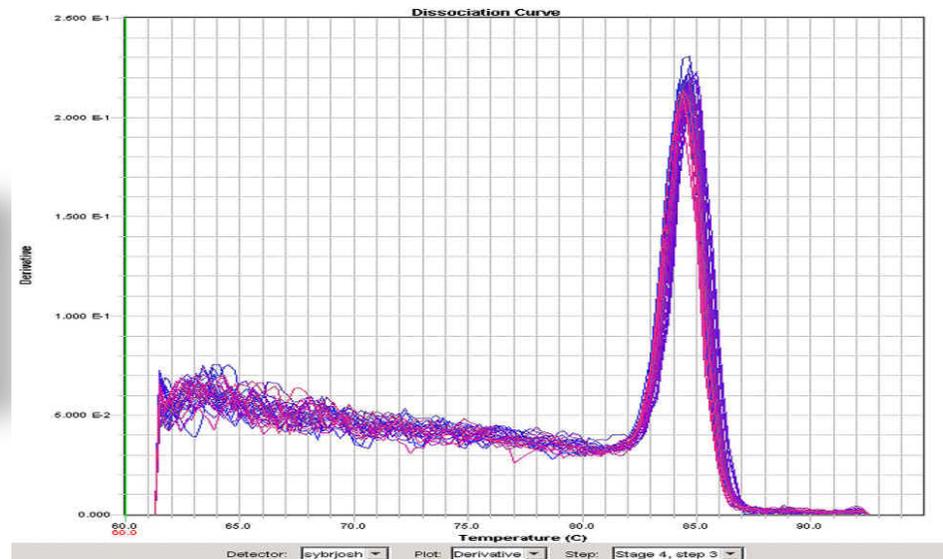
AMPLIFICATION PLOT

SYBR GREEN  
TAQMAN  
PROBE



DISSOCIATION CURVE

SYBR GREEN  
(ONLY)

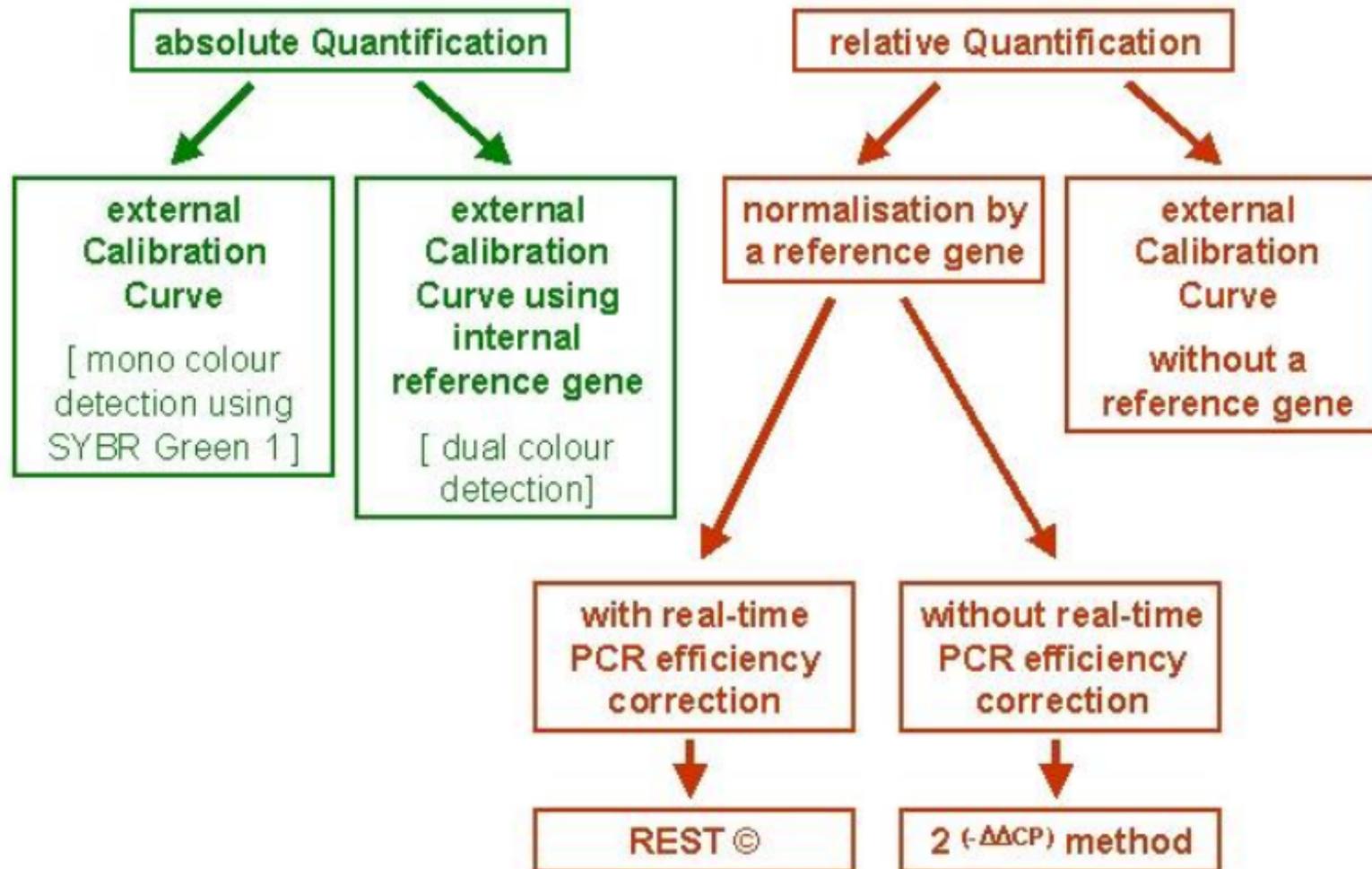


The temperature at which 50% of strands are hybridized is the melting temperature and is specific for that sequence

## **Interpretation**

- \* **Melting curve analysis**
- \* **Absolute quantification**
- \* **Relative quantification**
  - i. **Relative standard method (relative fold change against a calibrator)**
  - ii. **Comparative threshold method ( $\Delta\Delta C_T$ )**

# Quantification methods



# real time Polymerase Chain Reaction: relative quantification

## Step Action 1

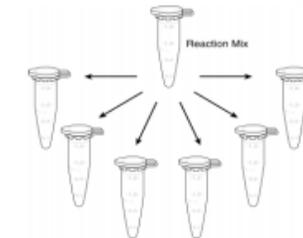
- Prepare several dilutions of cDNA (**obtained from control RNA**) within the **range of 80 pg to 50 ng** to perform standard linear equation. Make dilutions with water
- Prepare one vial for each sample to analyze
- Include a NTC reaction containing no template, with only water.

(No Template Control, 80 pg/ $\mu$ L, 400 pg/ $\mu$ L, 2 ng/ $\mu$ L, 10 ng/ $\mu$ L, and 50 ng/ $\mu$ L)



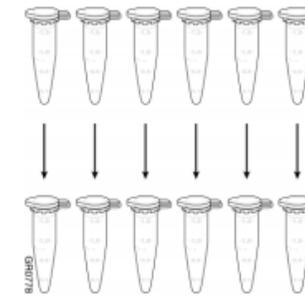
## Step Action 2

Prepare Reaction Mix into each 1.5 ml microcentrifuge tube



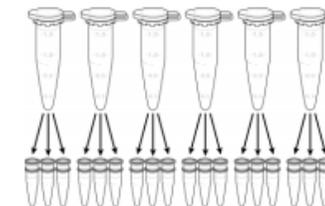
## Step Action 3

- Transfer the volume from each standard dilution and from samples tubes to the new microcentrifuge tube containing the Reaction Mix.
- Mix the components

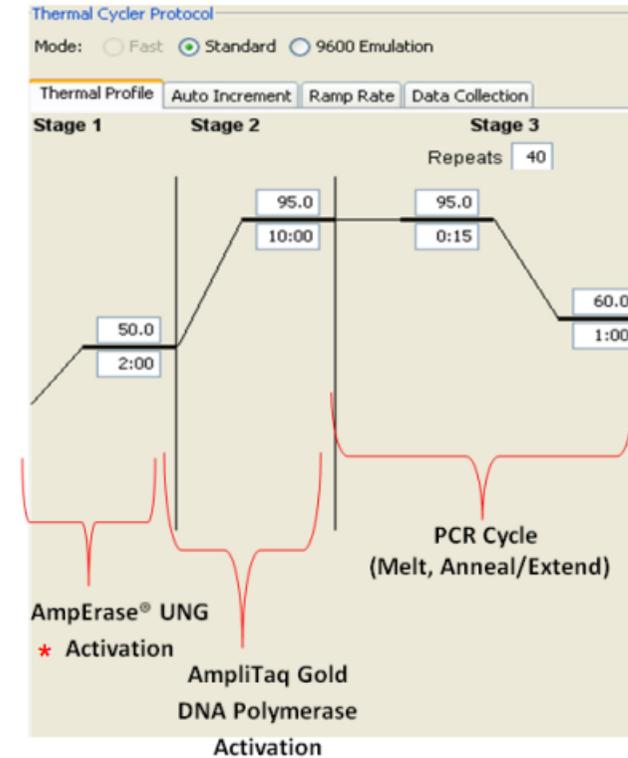


## Step Action 4

- Subdivide each reaction and transfer into the replicate number (2, or 3, or 4 aliquots) of a MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate
- cap the tubes and briefly centrifuge to remove air bubbles and collect the liquid at the bottom of the tube
- Transfer the plates to the thermal cycler block using the appropriate system for PCR amplification



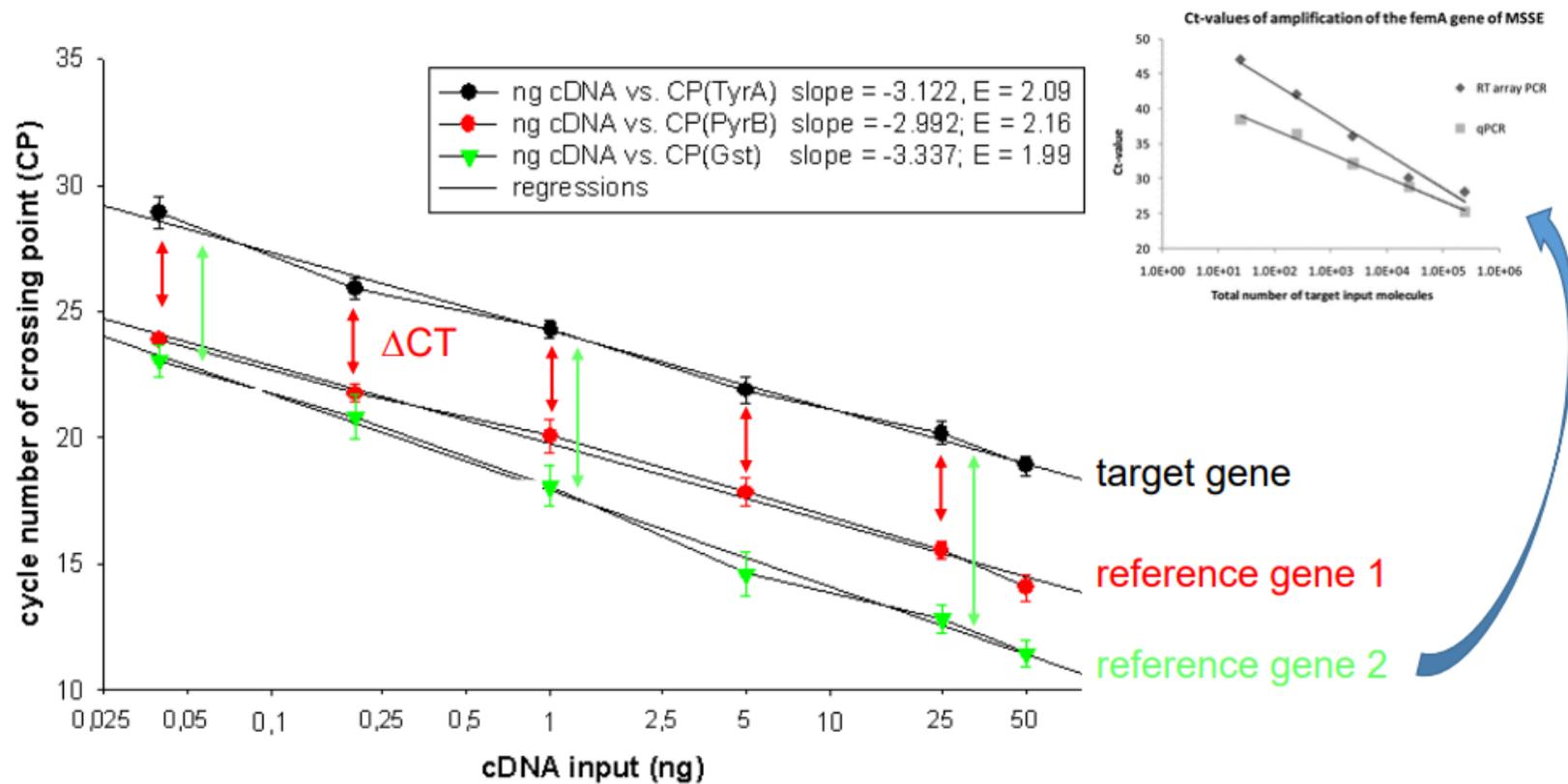
## real time Polymerase Chain Reaction: relative quantification



\* AmpErase® Uracil N-Glycosylase (UNG) is a 26 kDa, recombinant enzyme encoded by the *E. coli*. The enzymatic reaction specifically degrades PCR products from previous PCR amplifications in which dUTP has been incorporated, without degrading native nucleic acid templates. The method used to render PCR products susceptible to degradation involves substituting dUTP for dTTP in the PCR mixture, and pretreating all subsequent PCR mixtures with AmpErase® Uracil N-glycosylase (UNG) prior to PCR amplification. Products from previous PCR amplifications are eliminated by excising uracil residues using UNG. Although UNG is active on single- and double-stranded dU-containing DNA, AmpliTaq® DNA Polymerase, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, and the other components of the PCR mixture remain intact during UNG treatment, providing PCR amplification free of PCR product carryover.



# real time Polymerase Chain Reaction: relative quantification

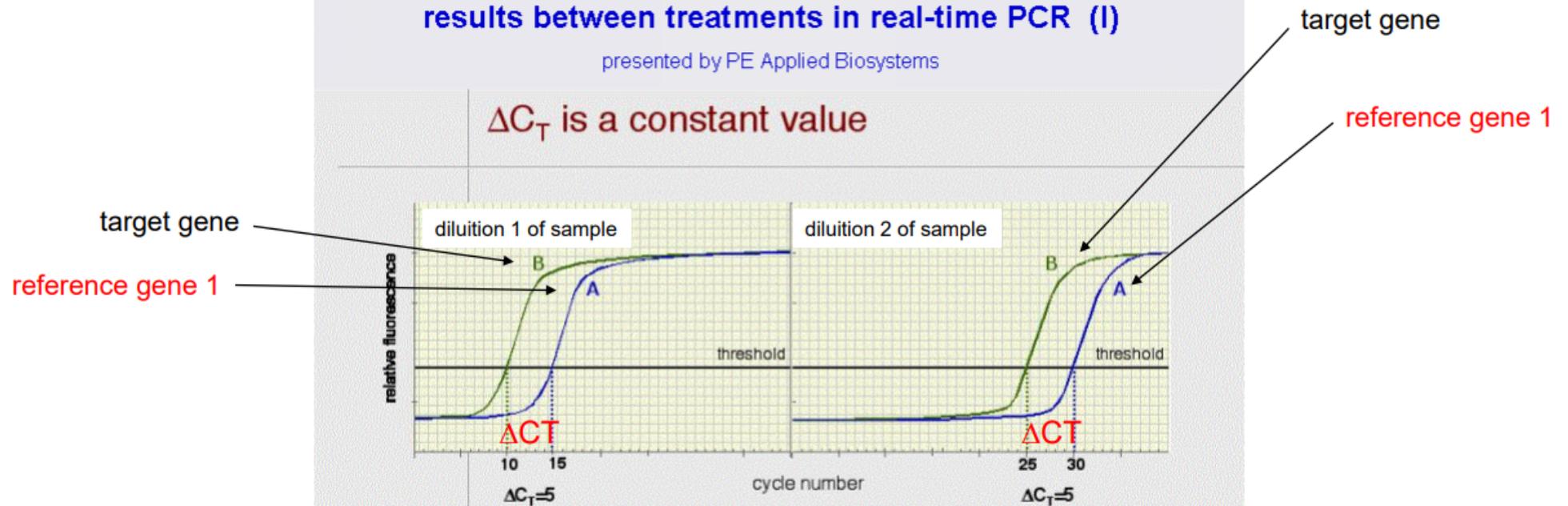


# real time Polymerase Chain Reaction: relative quantification

## Delta-delta method for comparing relative expression results between treatments in real-time PCR (I)

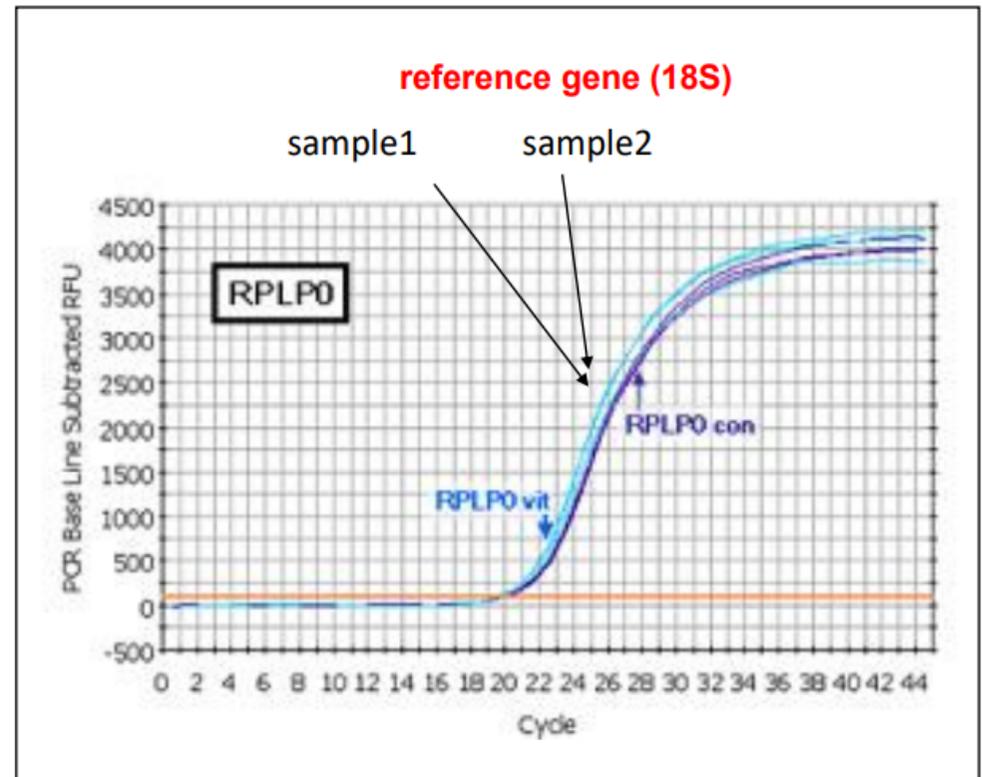
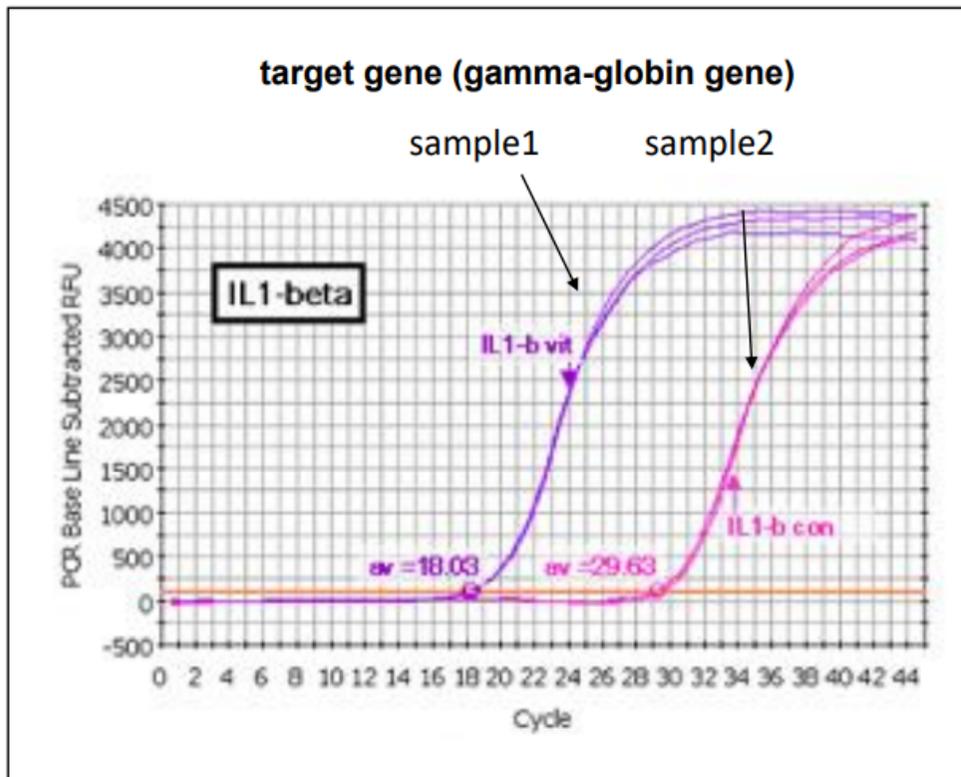
presented by PE Applied Biosystems

$\Delta C_T$  is a constant value



When the PCR efficiency of both systems is the same the  $\Delta C_T$  remains constant

## real time Polymerase Chain Reaction: relative quantification



# Data Analysis

## EXAMPLE:

SAMPLE	GENE	
	Ct p53 (target)	Ct GAPDH (reference)
Control (calibrator)	15.0	16.5
Tumor (test)	12.0	15.9

1)  $\Delta Ct_{\text{calibrator}} = 15.0 - 16.5 = -1.5$     and     $\Delta Ct_{\text{test}} = 12.0 - 15.9 = -3.9$

2)  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}} = -3.9 - (-1.5) = -2.4$

3)  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(-2.4)} = 5.3$

Tumor cells express p53 at a 5.3-fold higher level than control cells

## Data Analysis

- **Calcolo dei  $\Delta CT = CT$  medio gene target -  $CT$  medio *housekeeping***

normalizzare ciascun **campione incognito** sottraendo i  $CT$  ottenuti per il gene target a quelli ottenuti per un gene reference endogeno espresso costitutivamente (*housekeeping*).

- **Calcolo dei  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_i - \Delta CT_c$**

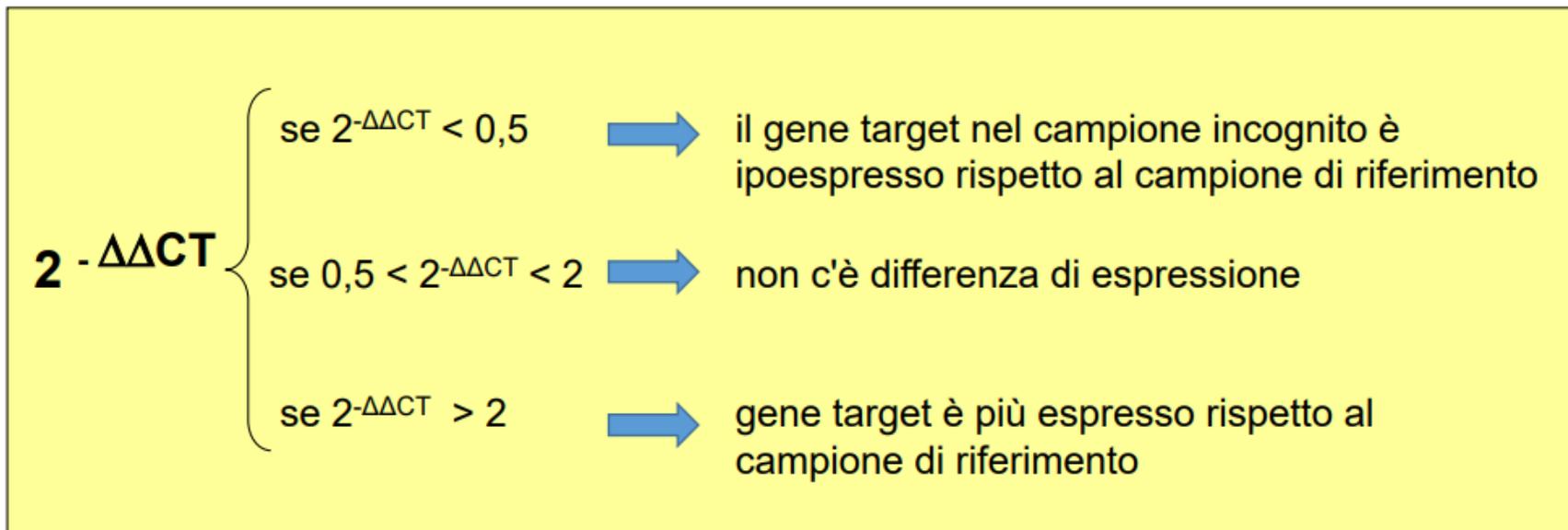
comparare ciascun  $\Delta CT$  così ottenuto con il  $\Delta CT$  di un **campione di riferimento o controllo**, anche detto “calibratore”.

- **Calcolare il valore  $2^{-\Delta\Delta CT}$**

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT_i - \Delta CT_c)}$$

**Il valore così ottenuto permette di determinare la concentrazione relativa del gene target nel campione incognito rispetto al campione di controllo**

## Data Analysis



## QUANTIFICAZIONE RELATIVA: SENZA CURVA STANDARD

**LIVAK METHOD ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ):** normalizzazione vs reference gene; efficienza vicino al 100% tra target e reference gene

$\Delta CT$ : ( $CT_{target} - CT_{reference\ gene\ i.e.\ GAPDH}$ )

$\Delta\Delta CT$ : ( $\Delta CT - internal\ calibrator : scegliamo\ noi$ )

$2^{-\Delta\Delta CT}$ : relative expression

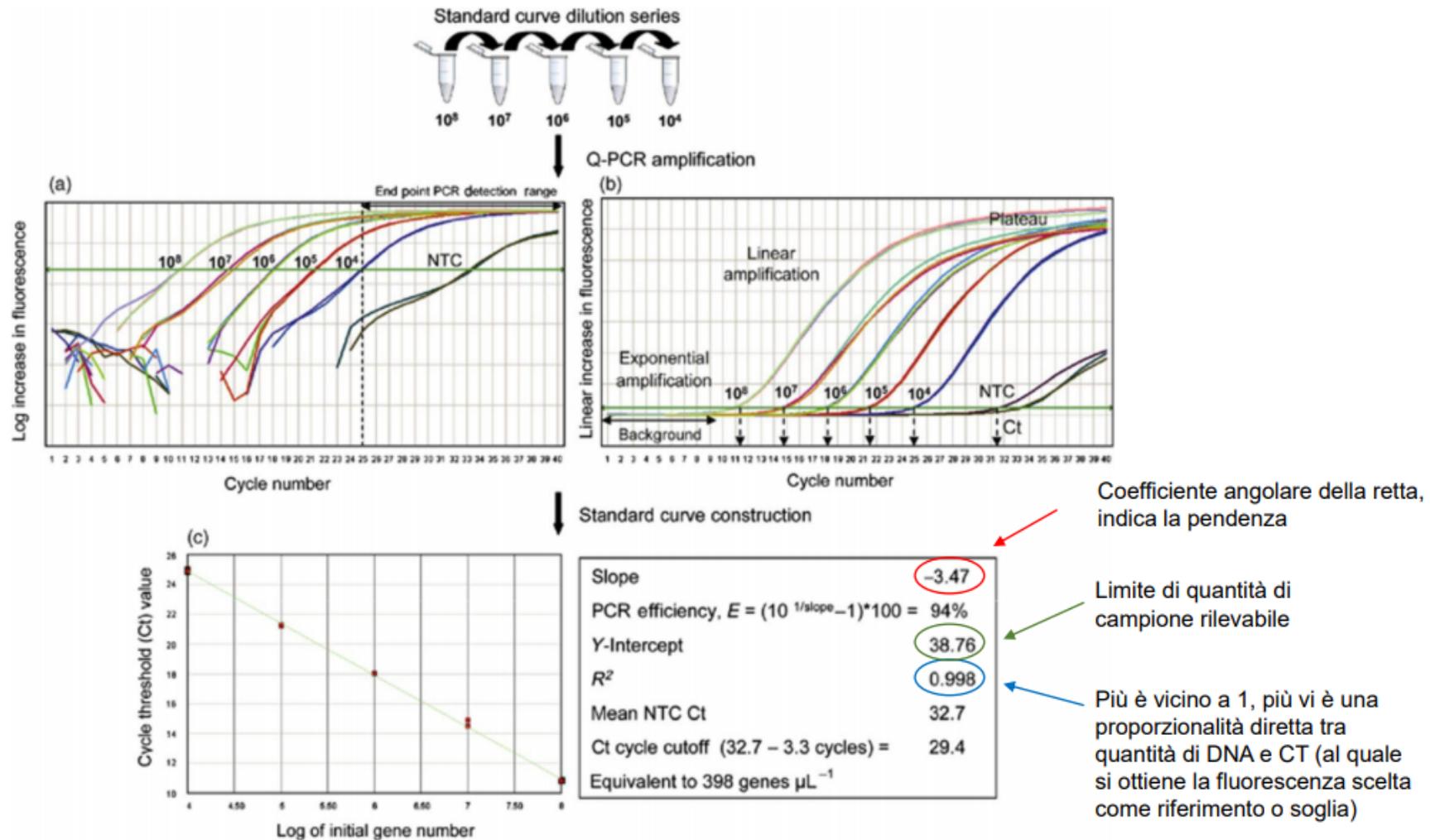
**NORMALIZZAZIONE VS STARTING MATERIAL** ( $\mu g$  DNA, mg TISSUE, n° CELLS)

$2^{\Delta CT}$  ( $CT_{calibrator} - CT_{target}$ ): relative fold change

**PFAFFL METHOD:** l'efficienza del target e reference gene è diversa.

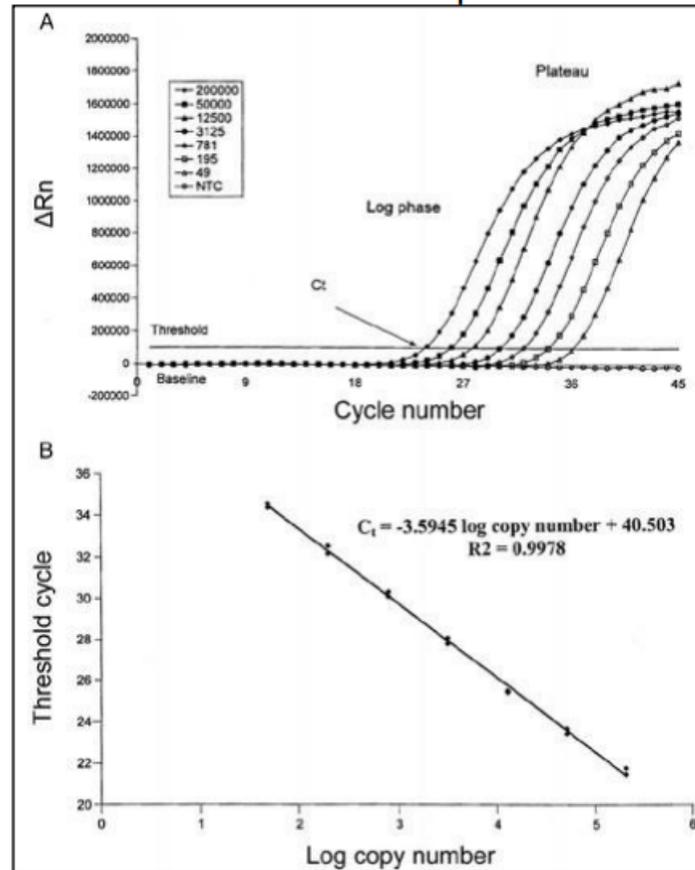
Ratio =  $2^{\Delta CT_{target\ (calibrator-test)}}$  /  $2^{\Delta CT_{reference\ (calibrator-test)}}$

# real time Polymerase Chain Reaction: absolute quantification

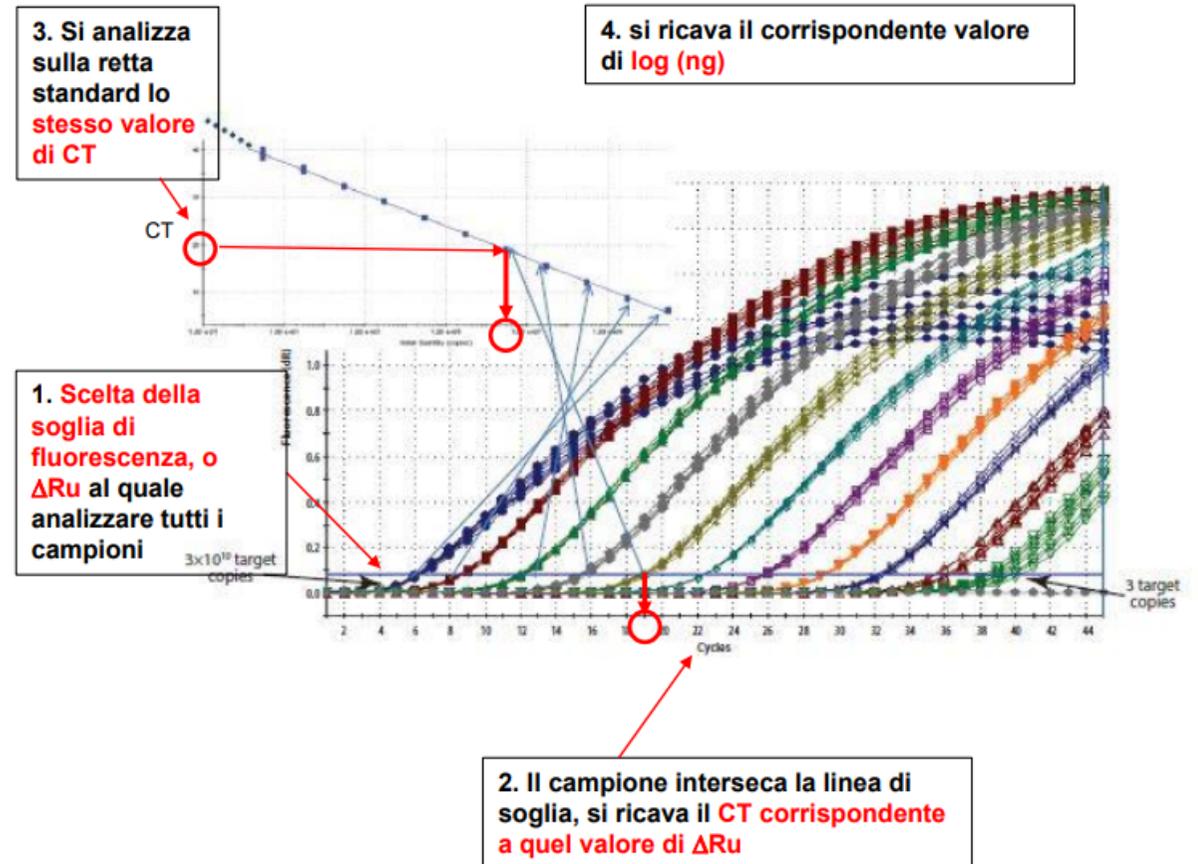


# real time Polymerase Chain Reaction: absolute quantification

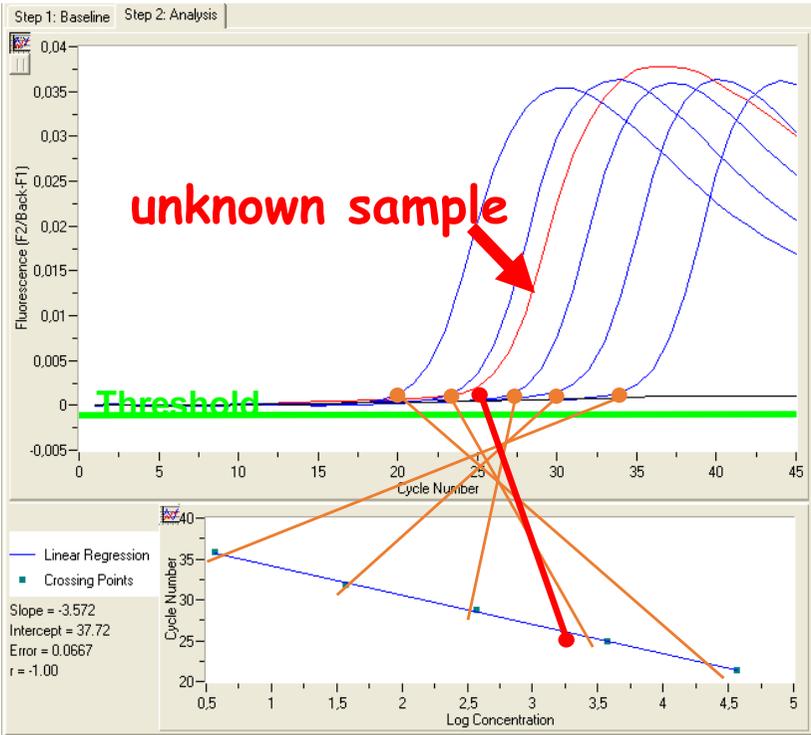
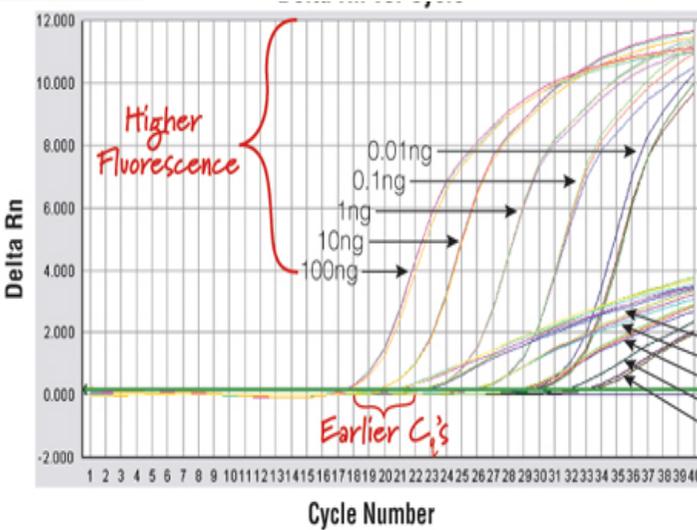
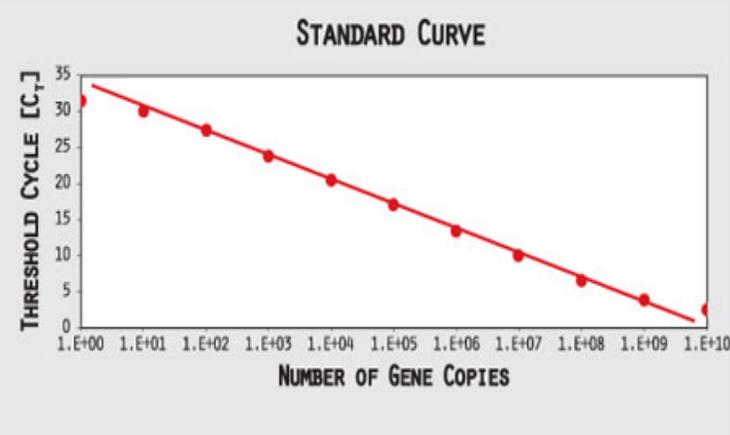
A. Standard template



B. analyzed samples



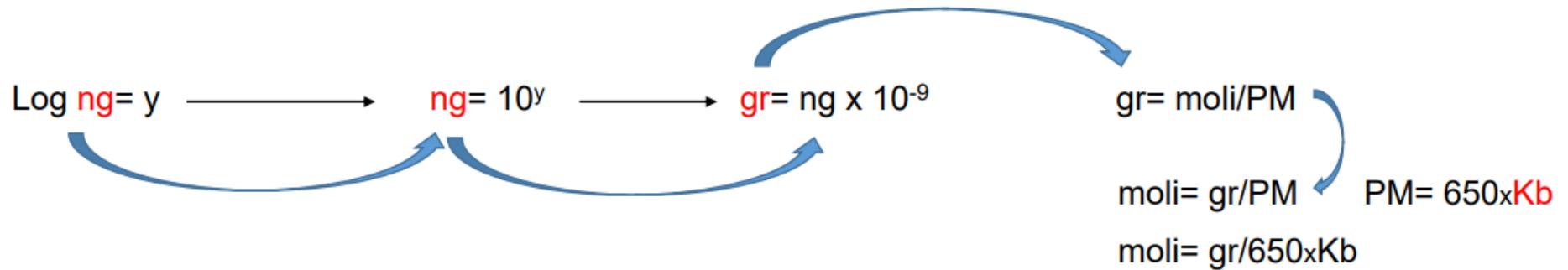
# CURVA STANDARD QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA



• **DILUIZIONE SCALARE i.e.: FATTORE 10**

• **Amplificando quantità note dello stesso template, le quantità ignote si ricavano per interpolazione dalla curva standard.**

## real time Polymerase Chain Reaction: absolute quantification



$$N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$$

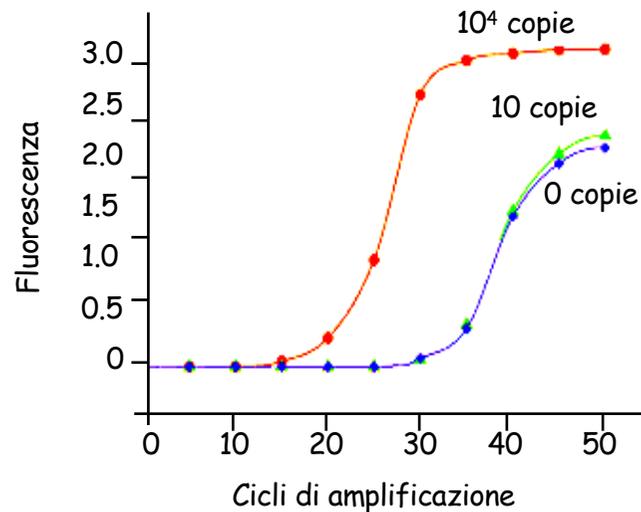
$$1 \text{ mole} = n^\circ \text{ molecole} \times 6,023 \times 10^{23}$$

$$gr / 650 \text{Kb} / 6,023 \times 10^{23} = n^\circ \text{ molecole di DNA template}$$

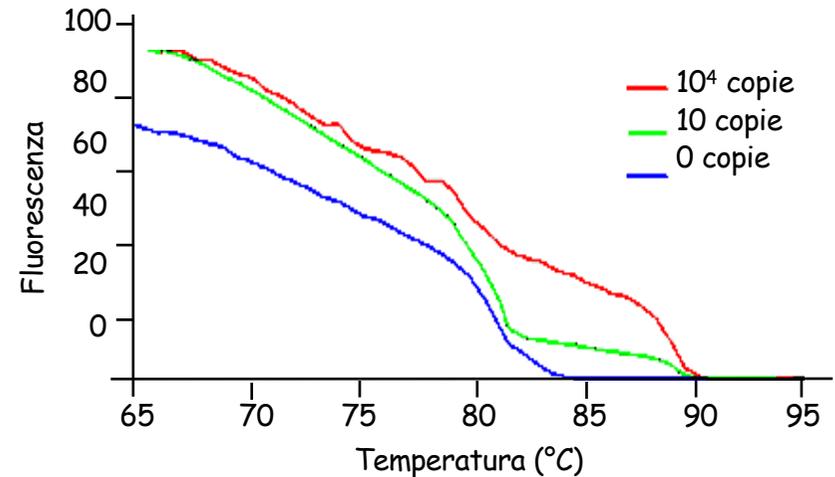
# ANALISI della CURVA di MELTING

Consente di identificare il prodotto di amplificazione specifico rispetto a prodotti aspecifici.

Curva di fluorescenza



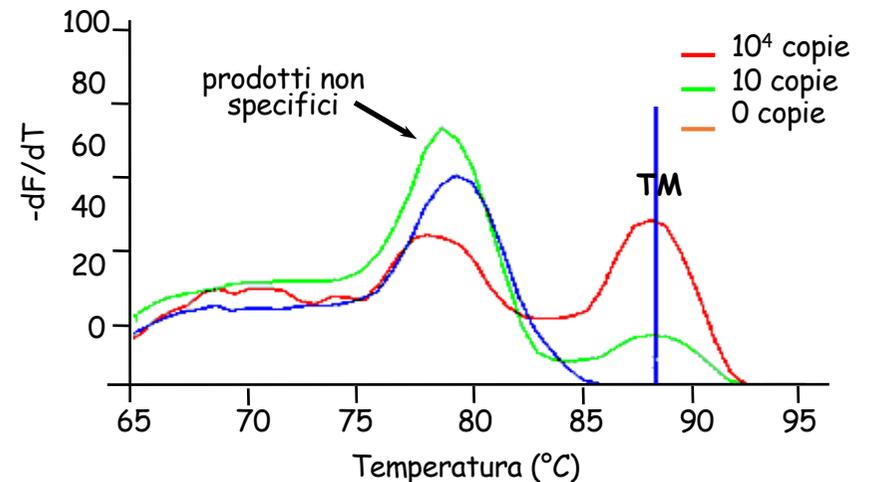
Curva di melting



Al termine della PCR la temperatura viene lentamente aumentata inducendo un decremento della fluorescenza.

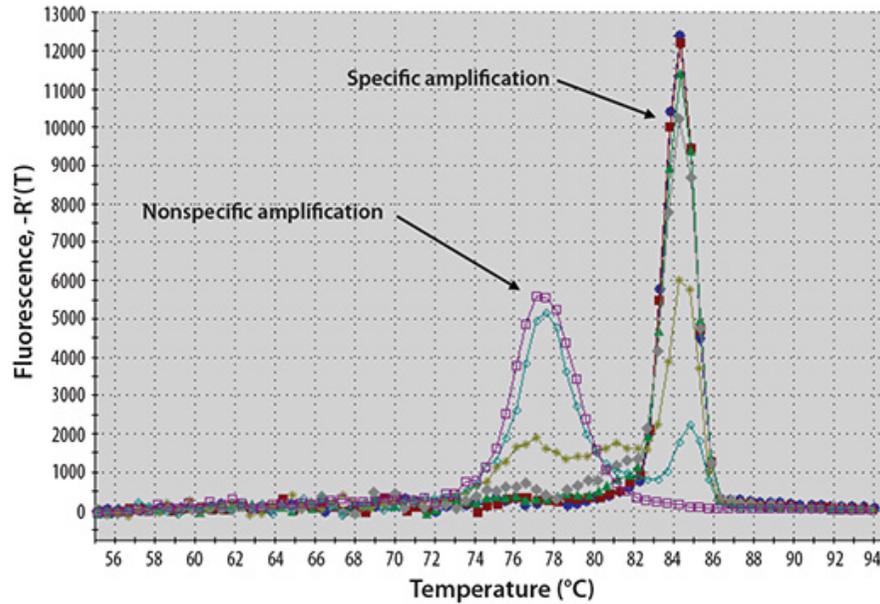
La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza corrisponde alla  $T_m$  del prodotto.

Derivata negativa della curva di melting

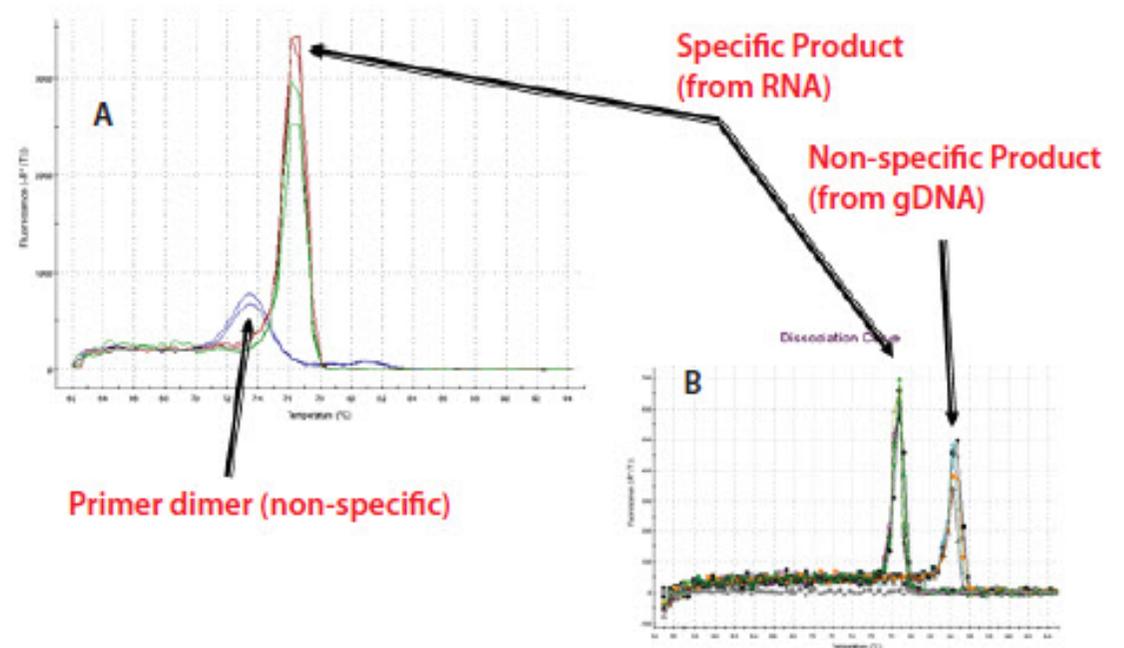


## Melting curve analysis: Validation of RT-specificity

Denaturation curve: SYBR green  
(da fare SEMPRE dopo la corsa)



- Primer dimers
- Non specific amplifications
- gDNA



## Melting curve

### Applications:

- Microbiological identification
- For detecting mutations
- Single nucleotide polymorphisms
- **Validation of RT-specificity**

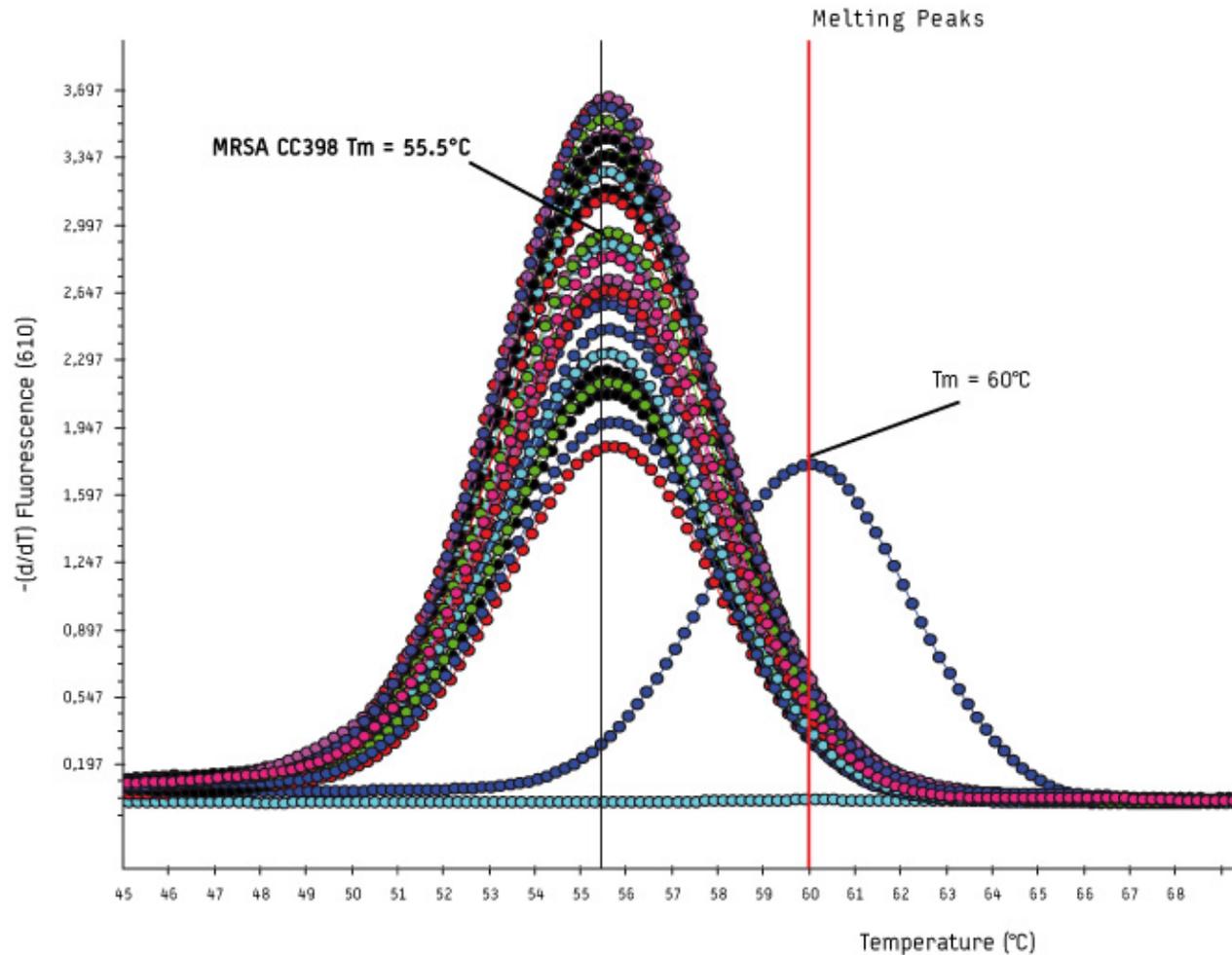
Melting analysis following PCR monitors duplex hybridization as the temperature is changed and is a simple method for sequence verification and genotyping.

Melting curve raw data are generally represented by PLOTTING FLUORESCENCE OVER TEMPERATURE

( for both specific probe and high-resolution dyes)

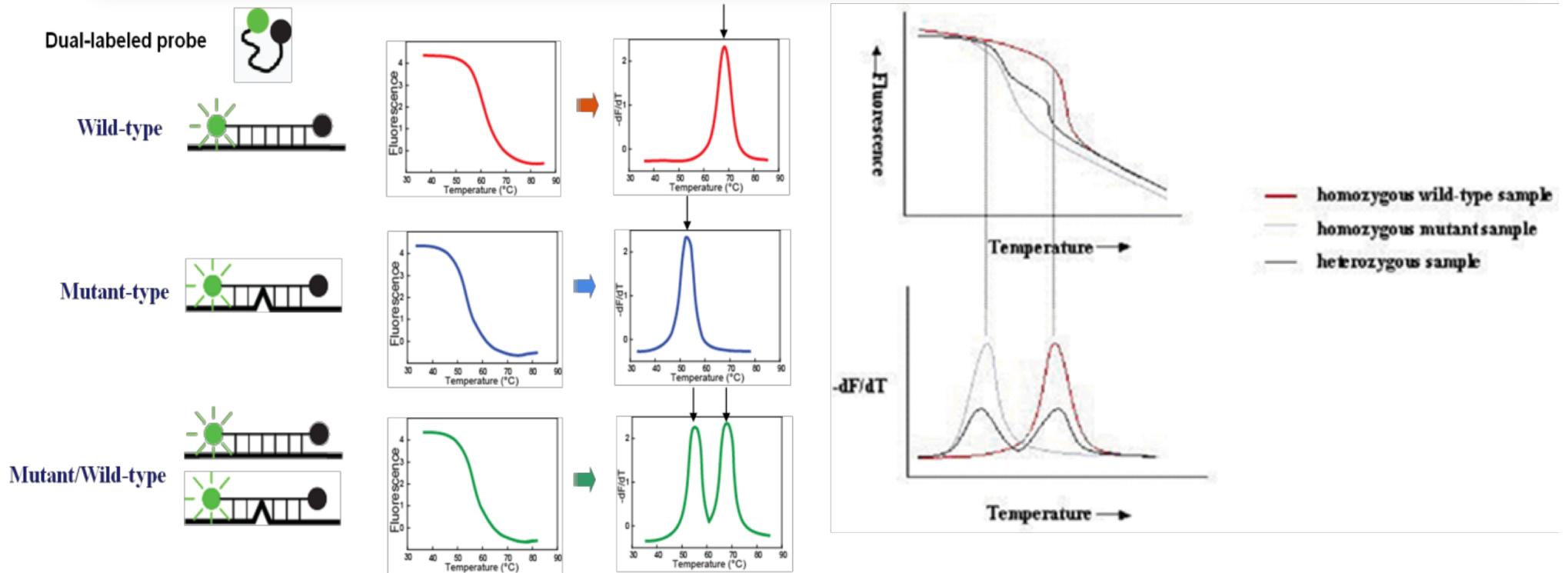
## Melting curve analysis: microbiological identification

Specificity of the Roche LightCycler MRSA Advanced test for differentiating MRSA CC398 and non-CC398 strains in hybridisation probe melting curve analysis



The curves represent the MRSA strain ATCC 33592 ( $T_m \approx 60^{\circ}\text{C}$ ) and 30 MRSA ST 398 strains of porcine origin with characteristic  $T_m$  values around  $55.5^{\circ}\text{C}$ . A methicillin-sensitive strain of *S. aureus* (clinical isolate) was used as negative control.

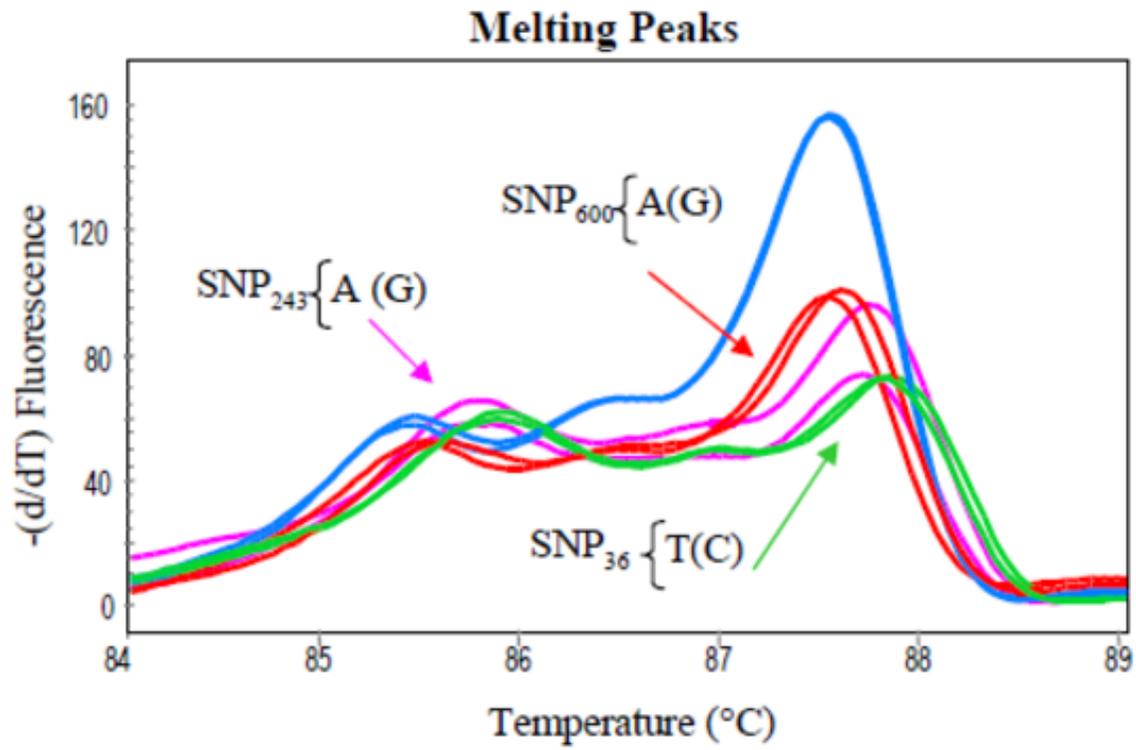
# Melting curve analysis: Mutations, genotyping



Genotype samples based on their DNA thermal denaturation properties.

Data derived from homozygous wild types, homozygous mutants, and heterozygous samples can differ regarding peak number, peak position or a combination of both.

# Analisi di Polimorfismi



**PCR inhibitors:**  
Hemoglobin, Urea, Heparin  
Organic or phenolic compounds  
Glycogen, Fats, Ca<sup>2+</sup>  
**Tissue matrix effects**  
Laboratory items, powder, etc.

**PCR enhancers:**  
DMSO, Glycerol, BSA  
Formamide, PEG, TMANO, TMAC etc.  
**Special commercial enhancers:**  
Gene 32 protein, Perfect Match, Taq Extender,  
E.Coli ss DNA binding

**real-time PCR  
efficiency**

DNA  
degradation

Tissue  
degradation

unspecific  
PCR products

Lab management

DNA dyes

Cycle conditions

DNA  
concentration

PCR reaction  
components

Hardware:  
PCR platform & cups

La real time PCR può essere molto influenzata:

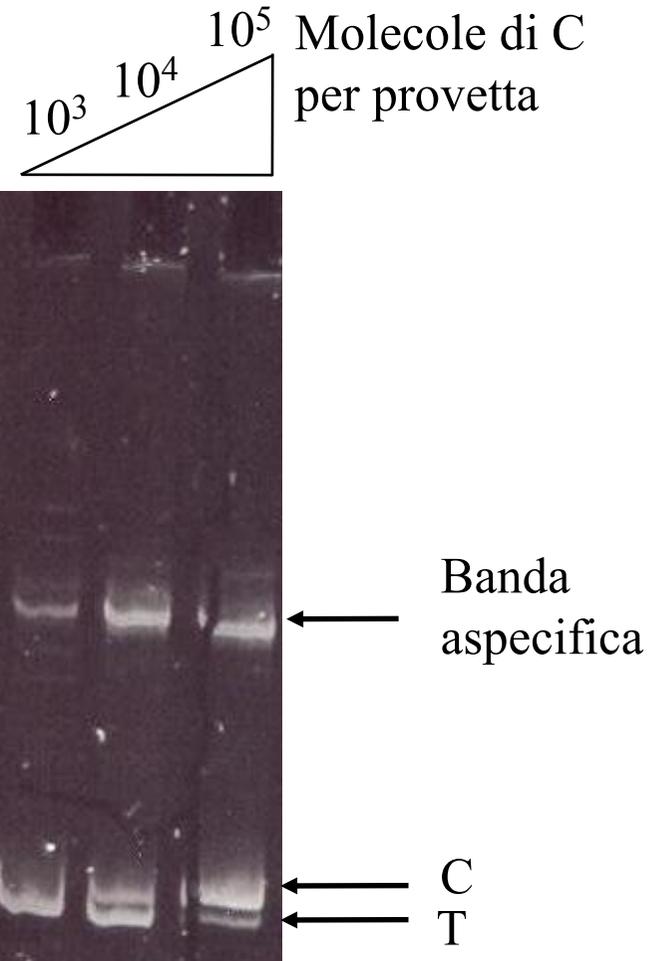
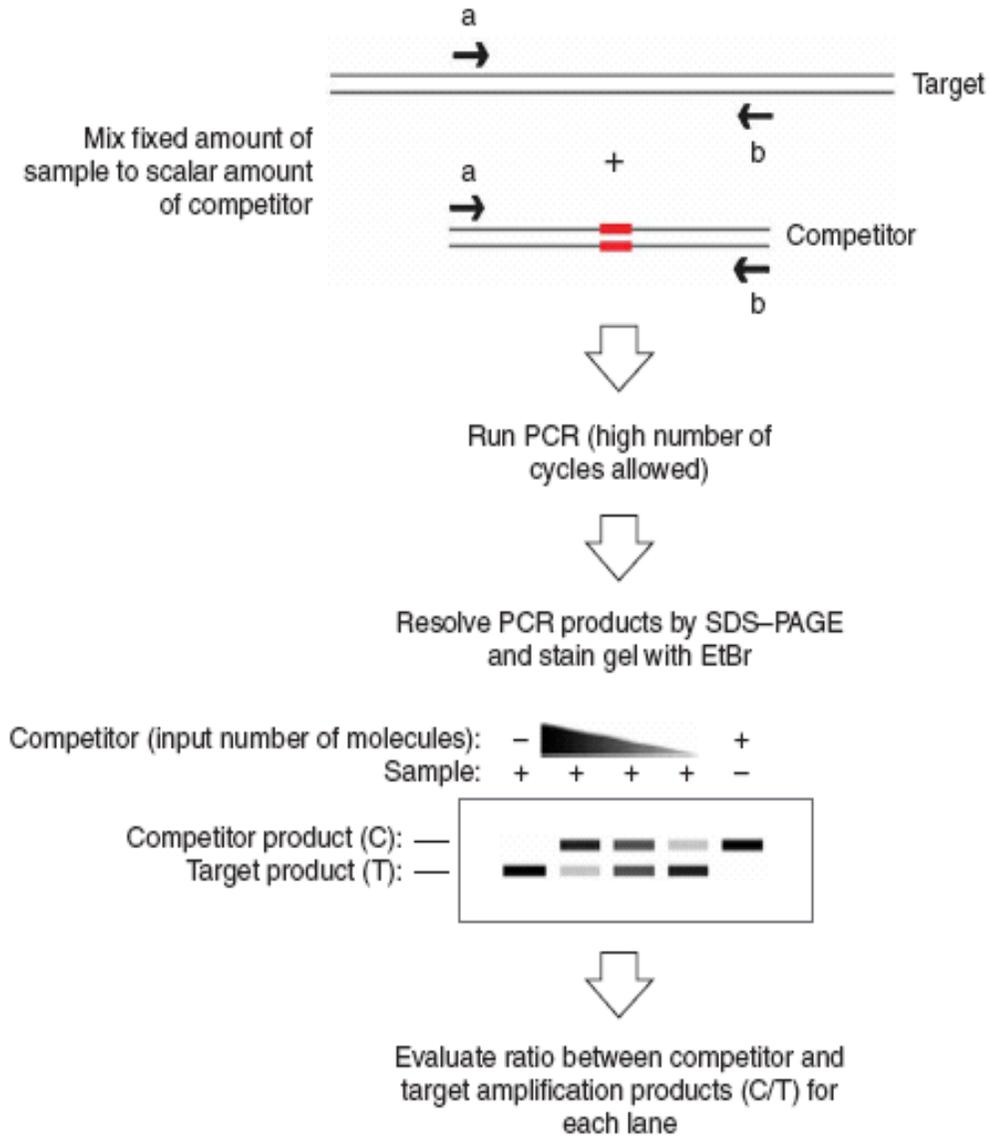
**quantificazione molecole di DNA:**

-dalla qualità del campione,  
-dalle variazioni random tra le varie provette di amplificazione nelle prime fasi di amplificazione, un fatto derivante dalla natura esponenziale del processo (piccole variazioni iniziali possono essere responsabili di grandi variazioni con il progredire dei cicli)

**quantificazione molecole di RNA:**

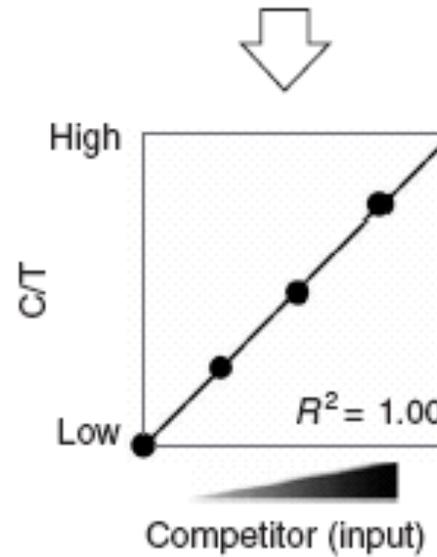
da variazioni nella efficienza di retro-trascrizione, un fatto che dipende dalla qualità del campione e che è soggetta a variazioni random tra le varie provette

# Competitive (quantitative) PCR

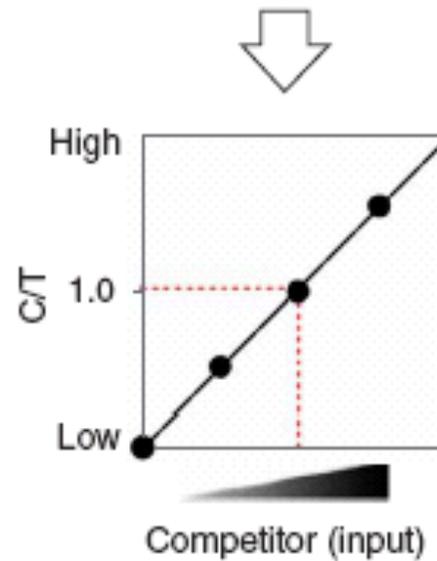


# Competitive (quantitative) PCR

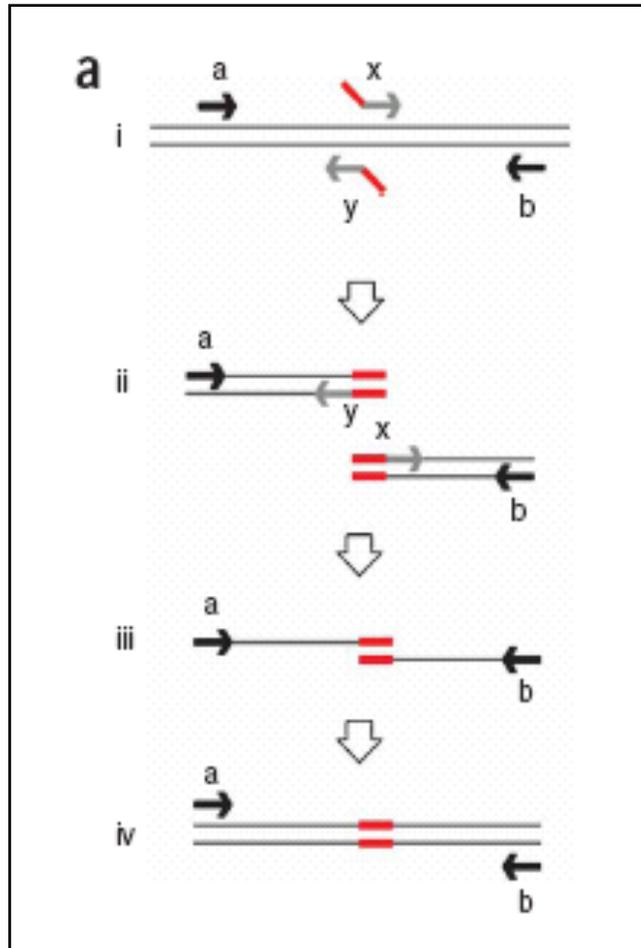
Plot C/T ratio against  
input number of  
competitor molecules



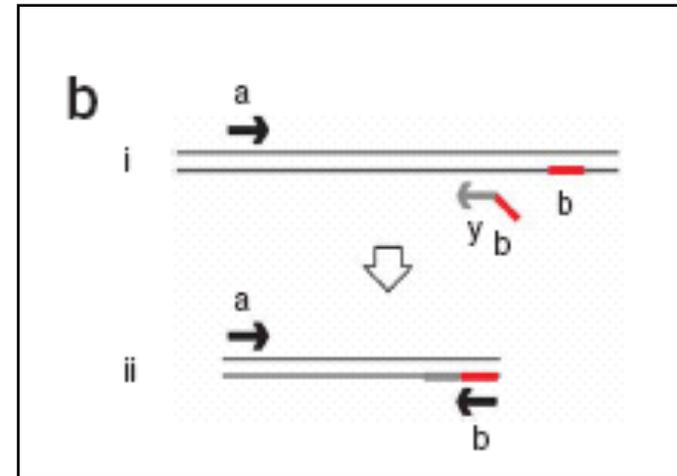
Calculate competitor  
copy number when  
C/T ratio = 1



# Competitive (quantitative) PCR: sintesi del competitore



Competitore contenente una piccola inserzione (rosso) – (DNA)



Competitore contenente una piccola delezione (DNA)

## Competitive (quantitative) PCR: vantaggi svantaggi

	<b>Real-time PCR</b>	<b>Competitive PCR</b>
Principle of quantification	Quantification at the exponential phase, depends on the initial sample quantity	Quantification at the reaction end point, not affected by initial sample concentration or total final amplification yield
Dynamic range (ratio between the smallest and largest amounts that can be quantified)	$1 \times 10^5$ to $1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$ , but at least three different concentrations of competitor needed
Sensitivity	Very high (<5 copies of input target)	Very high (<5 copies of input target)
Specificity	Varies, it can be very high with gene-specific probes (such as TaqMan probes)	Very high, not affected by the presence of nonspecific amplification products
Throughput	High-throughput possible	Very low—higher throughput achievable with adaptor-tagged competitive (ATAC)-PCR and real competitive PCR variations
Accuracy	High, twofold change in target concentration detectable	Higher, less than twofold change in target concentration detectable
Reproducibility	High but needs assay optimization	High
Absolute quantification	Yes, with standard curve construction	Yes
Setup	Easy, quick to perform. Does not need post-PCR manipulation	Requires competitor construction and post-PCR manipulation (not applicable to ATAC-PCR)
Risk of contaminations	Low	High
Cost	Very high	Low