

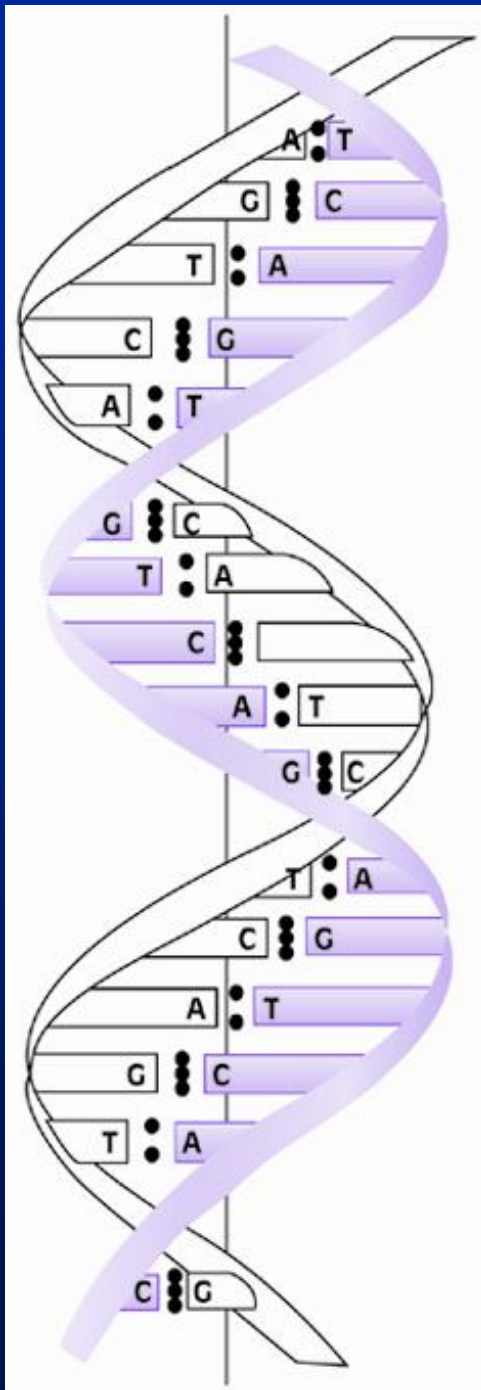


# PCR quantitative PCR (qPCR)

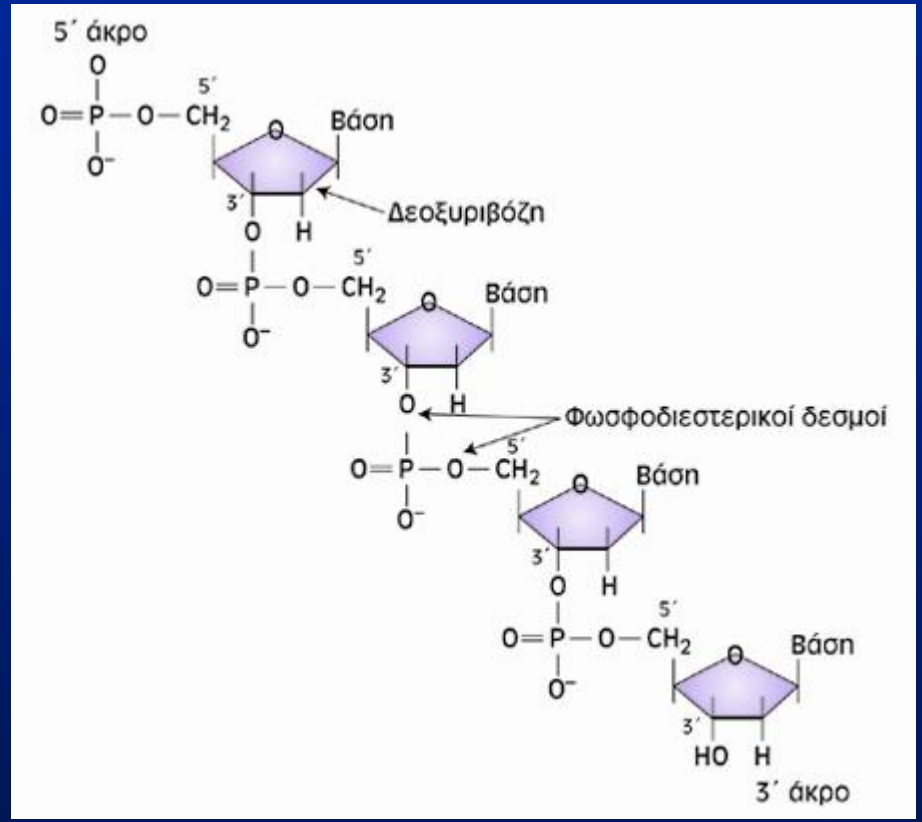
*E. Λιανίδου, Ph.D.*  
*Καθηγήτρια*

*Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Αθηνών*

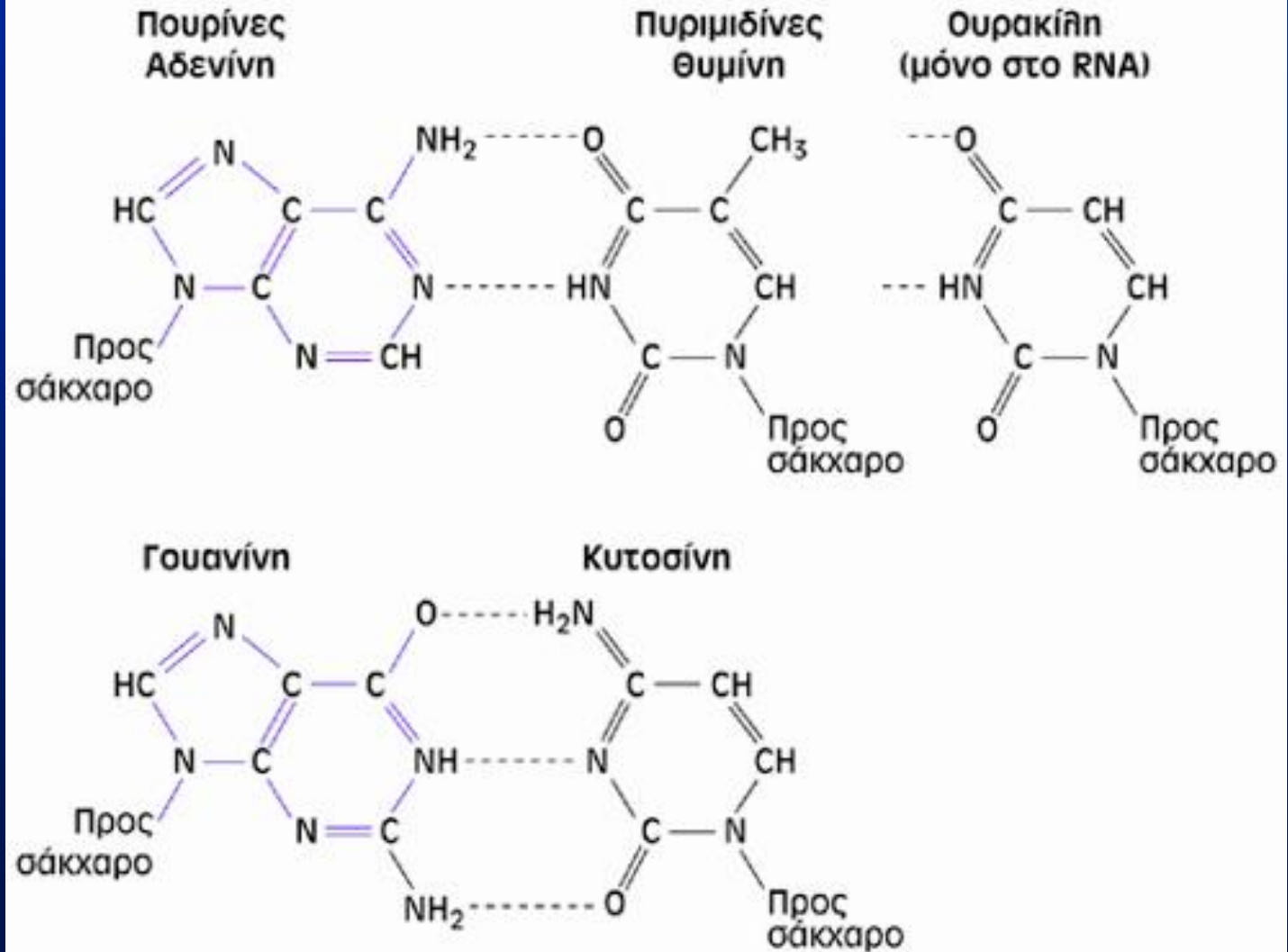
*[lianidou@chem.uoa.gr](mailto:lianidou@chem.uoa.gr)*



# DNA



# A:T (2 δεσμοί H), C:G (3 δεσμοί H)



# Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction) PCR

- in vitro μέθοδος για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA
- δίνει τη δυνατότητα απόκτησης μεγάλης ποσότητας DNA για ανάλυση
- in vitro μέθοδος κλωνοποίησης
- With PCR the bits of embedded, often hidden genetic information can be amplified into large quantities of accessible, identifiable and analysable material, (Guyer RL, Koshland DE. The molecule of the year, Science, 246:1543, 1989)



# Ιστορική αναδρομή

- 1983: σύλληψη της ιδέας, K. Mullis, Cetus Corporation
- 1985: πρώτη δημοσίευση, Science 1985, 230:1350-1354
- 1988: θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, Science 1988, 239:487-491
- 1988-σήμερα : Χιλιάδες άρθρα με εφαρμογές PCR
- 1989 το περιοδικό Science επέλεξε την PCR σαν το "μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα" και την Taq DNA πολυμεράση σαν το "μόριο της χρονιάς"
- 1993 βραβείο Nobel Χημείας στον K.Mullis



The Nobel Prize in Chemistry 1993  
Kary B. Mullis, Michael Smith

The Nobel Prize in Chemistry 1993

Nobel Prize Award Ceremony

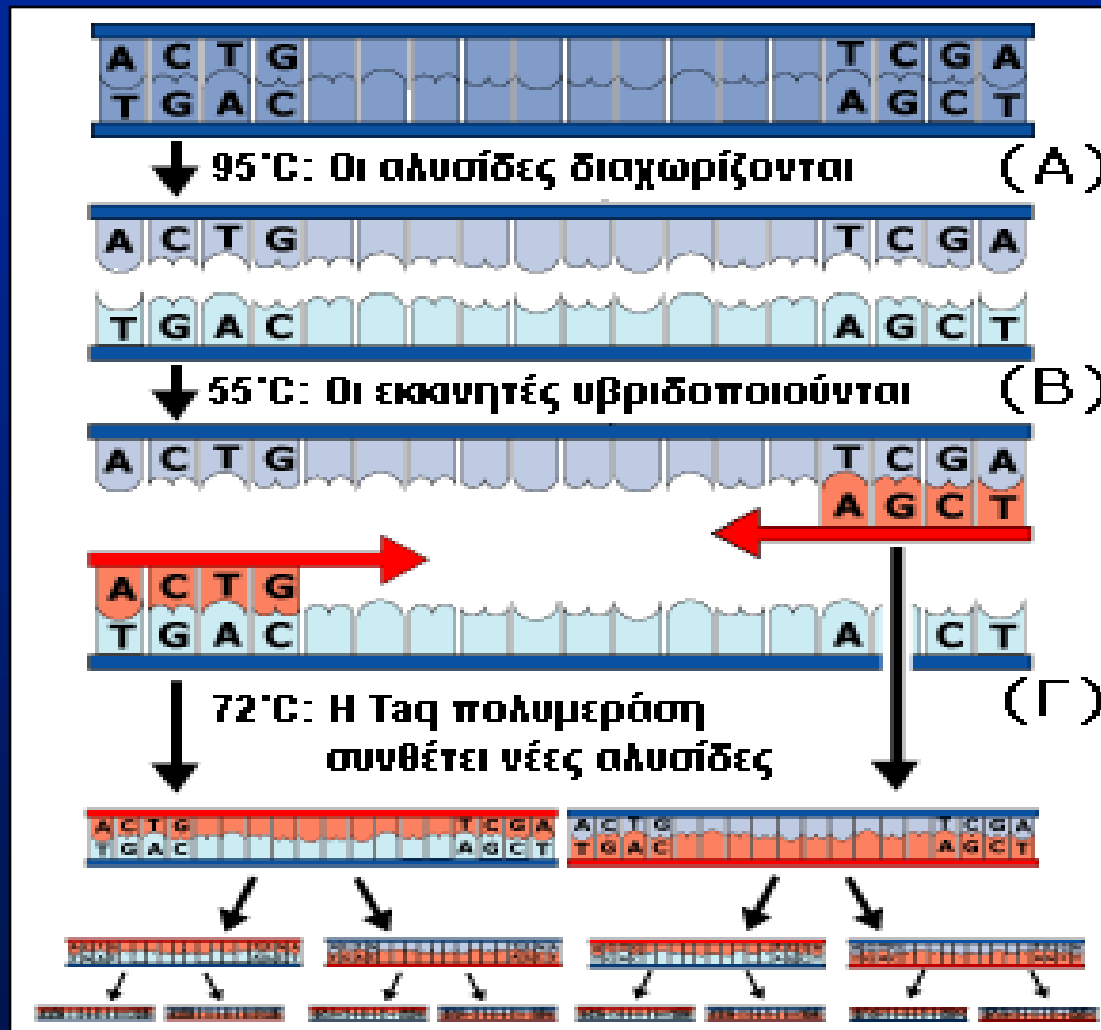
**Kary B. Mullis**

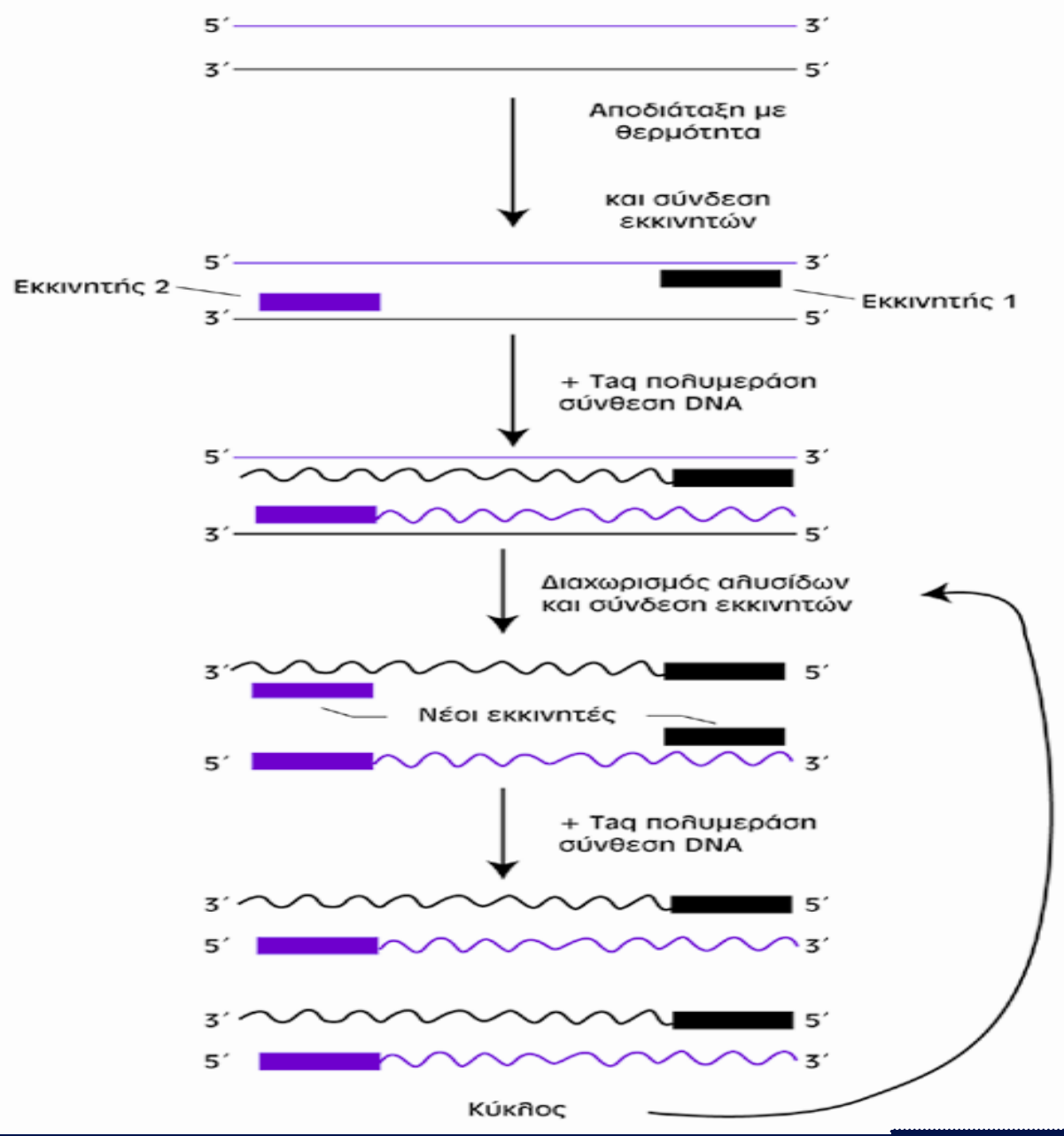


Biographical  
**Nobel Lecture**

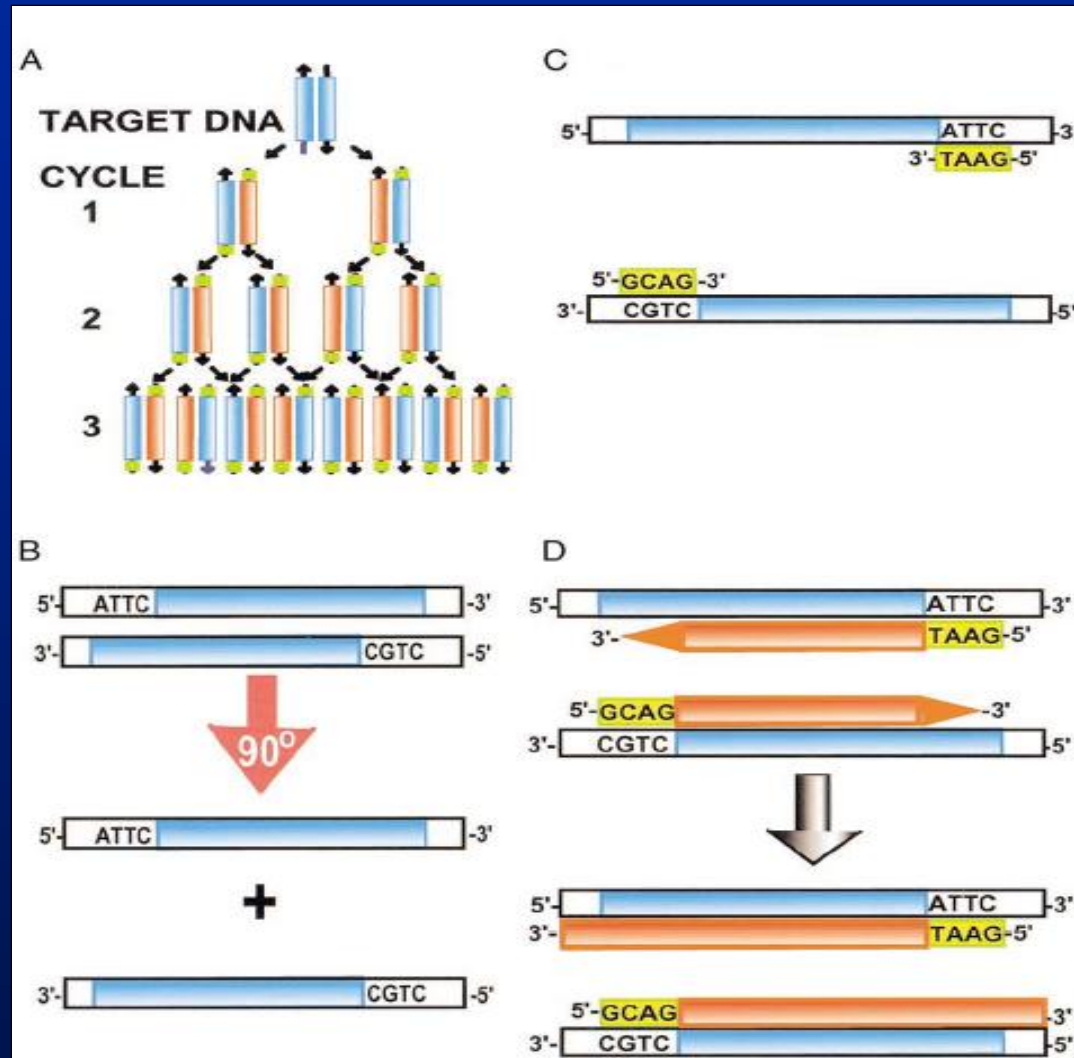
Interview  
Other Resources

# Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης





# Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης





# Πίνακας 1.1. Ενίσχυση ενός τμήματος DNA μέσω PCR

<u>Αριθμός κύκλων</u>	<u>Αριθμός δίκλωνων μορίων-στόχων</u>
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1.024
13	2.048
14	4.096
15	8.192
16	16.384
17	32.768
18	65.536
19	131.072
20	261.144
21	524.288
22	1.048.576
23	2.097.152
24	4.194.304
25	8.388.608



# Παράγοντες που επιδρούν στην PCR

- δείγμα DNA
- DNA πολυμεράση
- επιλογή εκκινητών
- συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{2+}$
- συγκέντρωση dNTPs
- παρουσία ενισχυτών και αναστολέων
- αριθμός κύκλων



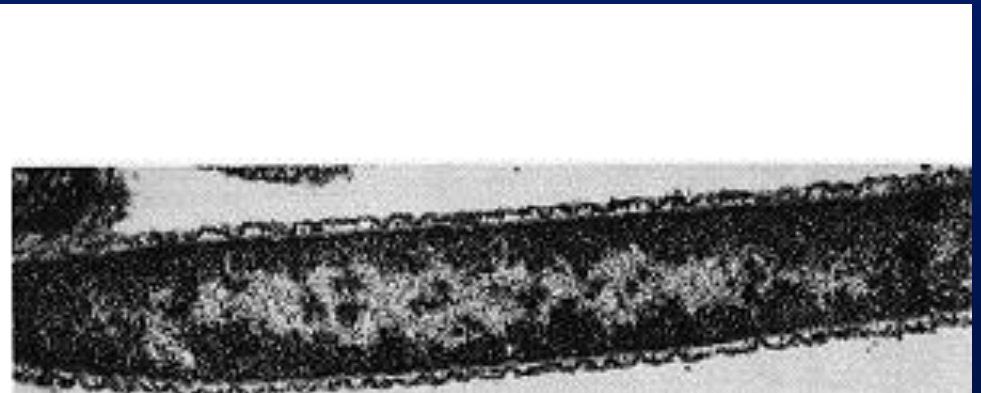
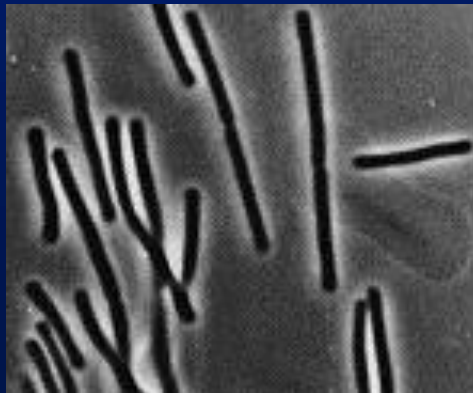
## Δείγμα DNA

- Το DNA είναι ένα πολύ σταθερό μόριο, εάν δεν εκτεθεί στη δράση ειδικών ενζύμων, των νουκλεασών
- επαρκές λιγότερο από ένα μικρογραμμάριο ολικού γενωμικού DNA
- ενίσχυση αλληλουχιών από ένα μόνο μόριο DNA
- Στο εμπόριο σήμερα κυκλοφορούν έτοιμα kit για την απλή, αποδοτική και γρήγορη εκχύλιση των νουκλεικών οξέων από βιολογικά δείγματα
- βιολογικά δείγματα (ιστοί, περιφερικό αίμα, κα)
- βιοψίες διατηρημένες σε παραφίνη ηλικίας άνω των 40 ετών
- Αιγυπτιακές μούμιες ηλικίας άνω των 4000 ετών!

# Yellow stone National Park, Wyoming, USA



## *Thermus aquaticus*



# Σύγκριση Klenow vs Taq Πολυμεράσης

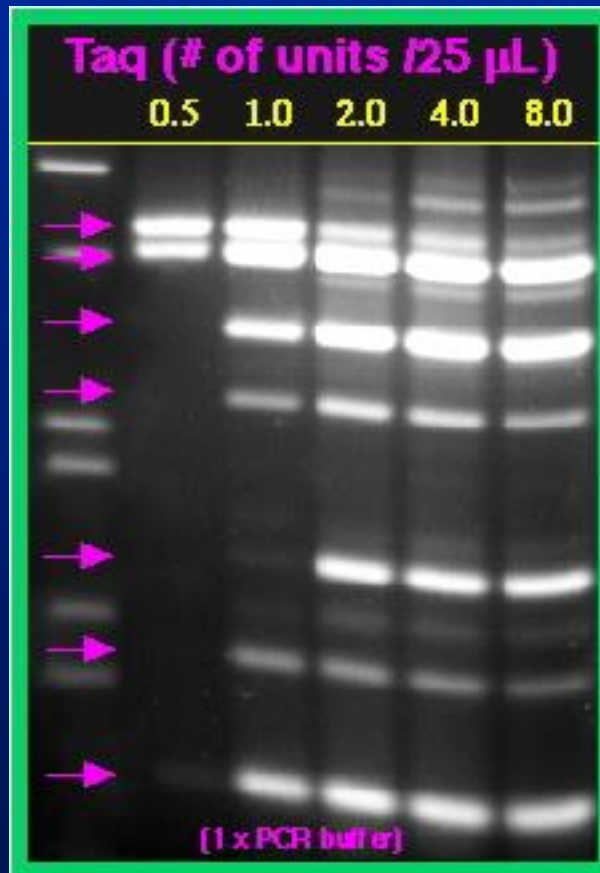
## Klenow

- optimum---->37°C
- μη ειδική σύνθεση DNA
- primer mismatching
- καταστροφή ενζύμου στους 94°C
- απαιτείται συνεχώς προσθήκη νέου ενζύμου

## Taq

- optimum----->72°C
- μεγάλη εξειδίκευση
- καλύτερη απόδοση
- δυνατότητα αυτοματοποίησης
- 95°C, 20s/cycle, 65% activity, 50 κύκλοι

# Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης Taq Πολυμεράσης



# Κριτήρια επιλογής εκκινητών

- Βέλτιστο μήκος 20-26 βάσεις (bp)
- περιεκτικότητα σε βάσεις G, C 40-60%
- αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών εντός του κλώνου των εκκινητών, ειδικά στο 3' άκρο
- αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών των εκκινητών με μη επιθυμητές αλληλουχίες DNA
- απόρριψη των εκκινητών που έχουν ομολογία με ανεπιθύμητες περιοχές άνω του 70%
- αποφυγή επανάληψης των G και C στο 3' άκρο των εκκινητών (πχ GCCCC, GGGG)

## Θερμοκρασία υβριδισμού

- $T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$  (< 20bp)
- Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις G και C
- θερμοκρασία 55°C είναι καλή για ένα τυπικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή 20 βάσεων με περίπου 50% σύσταση σε GC
- μεγαλύτερες θερμοκρασίες μπορεί να είναι απαραίτητες προς αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή



## Συγκέντρωση ιόντων $Mg^{2+}$

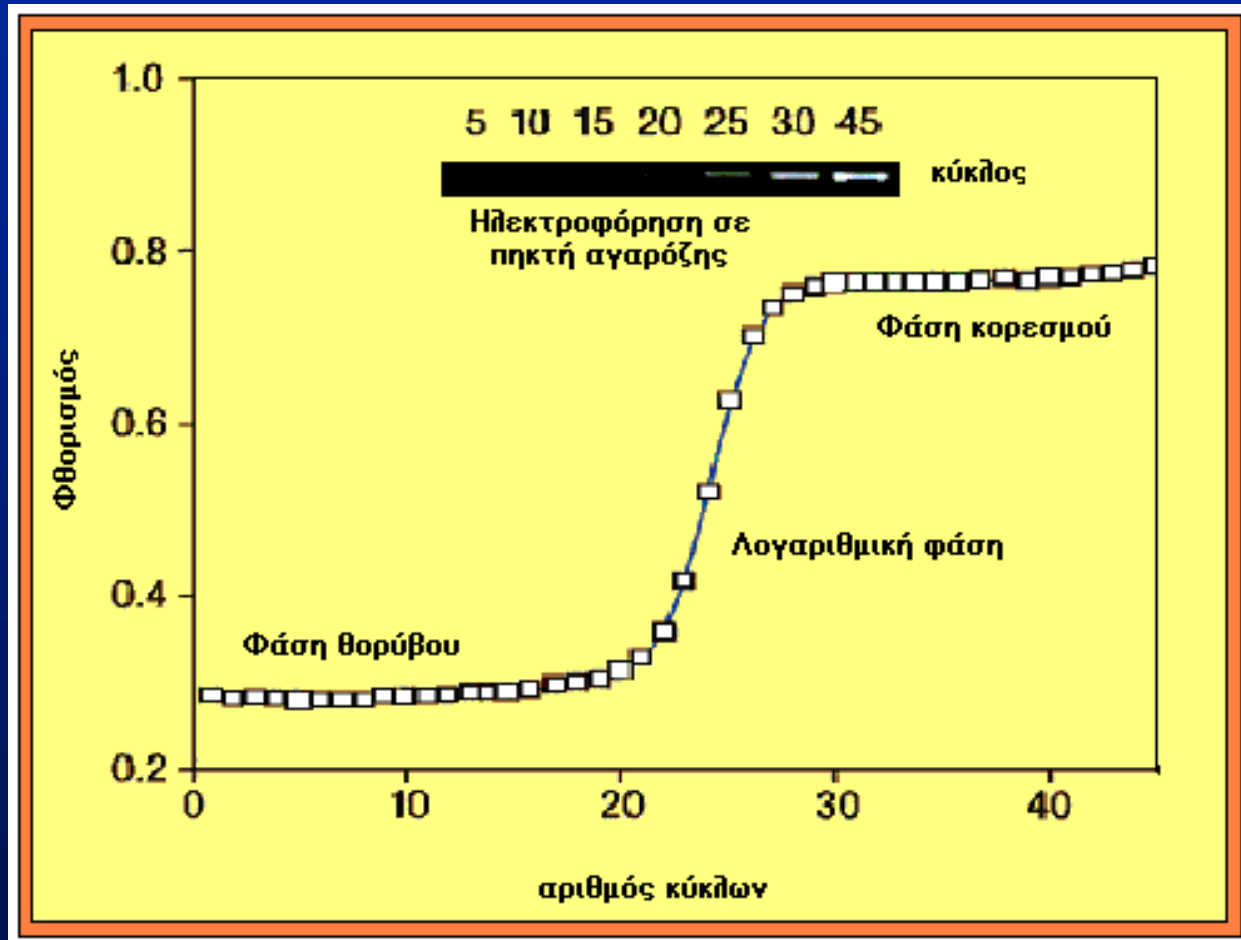
- μεταλλικός συμπράγοντας Taq DNA πολυμεράσης
- μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR
- Συνήθης βέλτιστη συγκέντρωση 1.5 mM (0.5-5 mM)
- περίσσεια  $Mg^{+2}$  θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος
- έλλειψη  $Mg^{+2}$  θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος

## Συγκέντρωση dNTPs

- τα dNTPs αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA
- οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200μM
- υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση
- τα dNTPs ενώνονται με τα  $Mg^{+2}$  και το ποσό των dNTPs προσδιορίζει το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου  $Mg^{+2}$
- αν η συγκέντρωση των dNTPs αλλάξει σημαντικά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και μια αλλαγή στη συγκέντρωση τού ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου  $Mg^{+2}$



# Φάση κορεσμού (plateau)



## Φάση κορεσμού οφείλεται σε:

- έλλειψη αρκετής ποσότητας αρχικού DNA εκμαγείου
- ατελής σύνθεση νέων κλώνων
- εξάντληση των εκκινητών και dNTPs
- καταστροφή ή απενεργοποίηση των συστατικών της αντίδρασης σε υψηλές θερμοκρασίες
- παρεμπόδιση της αντίδρασης από τα προϊόντα (πυροφωσφορικά και δίκλωνο DNA)
- ανταγωνισμός των αντιδρώντων με μη ειδικά προϊόντα η διμερή των εκκινητών (primer dimers)
- επανασύνδεση του προϊόντος της PCR σε υψηλές συγκεντρώσεις ( $>10^{-9}$  M) προ του υβριδισμού των εκκινητών
- κορεσμός του ενζύμου σε συνδυασμό με μειωμένη ενεργότητα έπειτα από πολλούς κύκλους

# Απόδοση PCR

Y= ενίσχυση

X= μέση απόδοση

n= αριθμός κύκλων

$$Y = (1+X)^n$$

εάν X=1 -----> Y=2<sup>n</sup>,    πρακτικά όμως X= 80-85%,

<u>απόδοση</u>	<u>20 κύκλοι</u>	<u>30 κύκλοι</u>
1.00	1.048.576	1.073.741.824
0.90	375.900	230.466.619
0.80	127.482	45.517.160

# Αναστολείς και ενισχυτές της αντίδρασης PCR

## αναστολείς:

- φύση των βιολογικών δειγμάτων
- μέθοδο απομόνωσης του DNA
- χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA
- ιοντικά επιφανειοδραστικά (SDS ισχυρός αναστολέας της Taq πολυμεράσης)

## ενισχυτές:

- φορμαμίδιο (5%), DMSO (<10%), PEG (5-15%), Tween-20 (0.1-2.5%), T4gene32 protein, γλυκερόλη (10-15%)

# Εξειδίκευση PCR

οφείλεται:

- στη δυνατότητα επιλογής της προς ενίσχυση περιοχής DNA μέσω της επιλογής κατάλληλων εκκινήτων

επιτυγχάνεται με:

- χαμηλή συγκέντρωση  $Mg^{2+}$ , dNTPs, Taq, εκκινήτων
- χαμηλό αριθμό κύκλων
- αυξημένη θερμοκρασία υβριδισμού
- αυξημένο ρυθμό αυξομείωσης θερμοκρασίας
- θερμική εκκίνηση (hot start)

## Μη ειδικό προϊόν PCR οφείλεται συνήθως σε :

- πιθανότητα λάθους της πολυμεράσης (1 στα  $10^9$  nt in vivo,  $2 \times 10^4$  nt in vitro)
- μη ειδική σύνδεση των εκκινητών
- επιμόλυνση από προηγούμενα προϊόντα PCR





## Επιμόλυνση στην PCR

οφείλεται στην εξαιρετική ευαισθησία της PCR

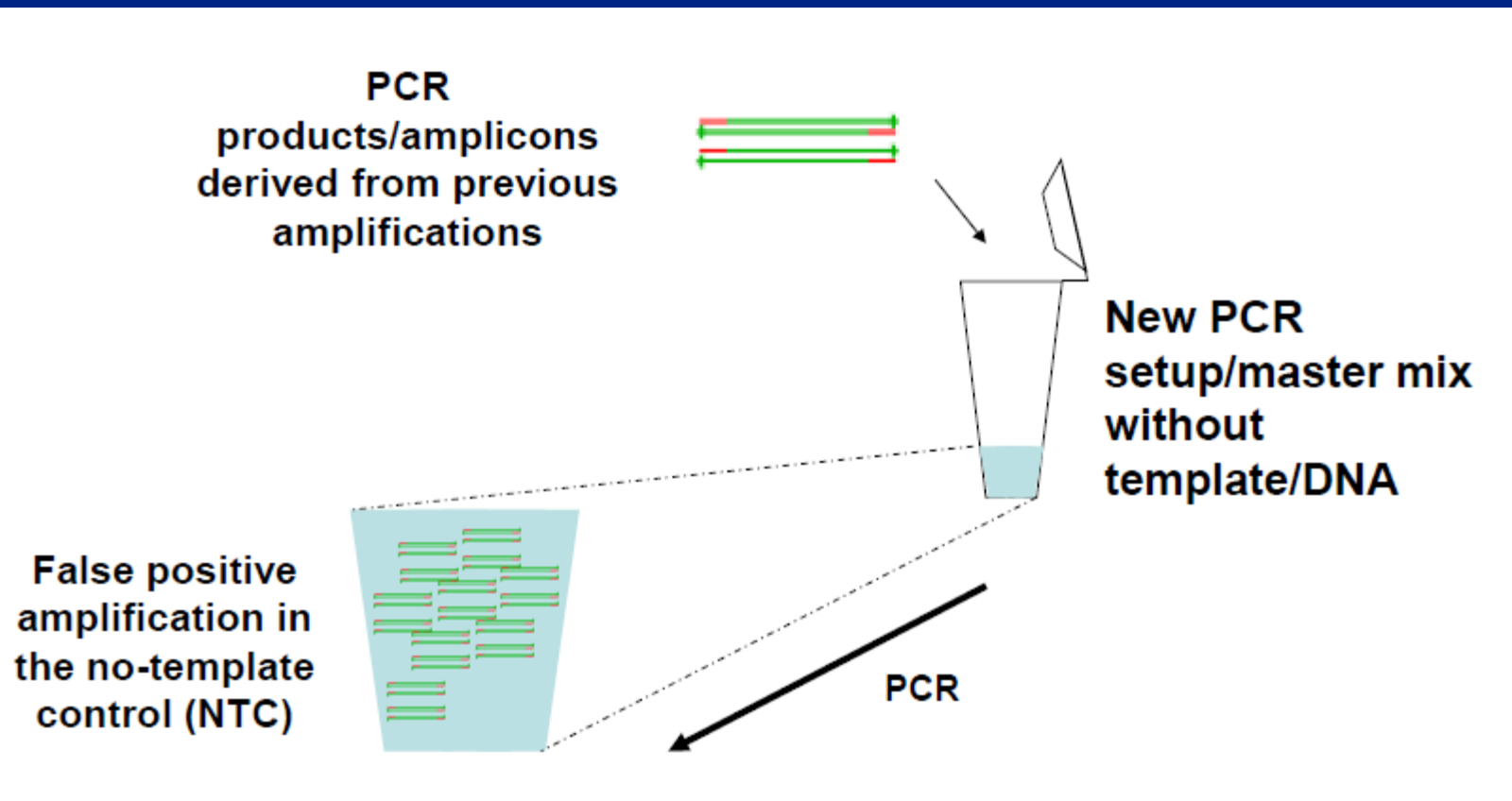
- πολύ σημαντική ειδικά όταν ενισχύονται σπάνιες αλληλουχίες
- πολύ σημαντική ειδικά όταν χρησιμοποιείται για διαγνωστικό σκοπό (πχ HIV, HCV, HBV)

αποφεύγεται με :

- καλή εργαστηριακή πρακτική
- χρήση control (πχ H<sub>2</sub>O) σε κάθε PCR
- ακτινοβολήση του μίγματος της αντίδρασης με UV πριν την προσθήκη του δείγματος DNA
- χρήση διαφορετικών χώρων και πιπετών για προετοιμασία μίγματος και PCR



# Επιμόλυνση στην PCR





## Οργάνωση εργαστηρίου για την αποφυγή επιμόλυνσης στην PCR

PCR laboratories should be divided into four separate work areas, each having dedicated special equipment for:

- (a) reagent storage and set-up
- (b) sample preparation
- (c) PCR reaction mix assembly and amplification
- (d) PCR product analysis.



## Οργάνωση εργαστηρίου για την αποφυγή επιμόλυνσης στην PCR

The following operations are done in the **reagent storage and set-up area**:

- preparation of stock solutions, preparation of aliquoted solutions, and preparation of master mix solutions.
- Cleaning of the workplace has to be performed immediately after the termination of the work.
- Also, specific work areas must not be accessed if work was performed earlier in any of the other working areas, particularly in the PCR product analysis area.

# Οργάνωση εργαστηρίου για την αποφυγή επιμόλυνσης στην PCR

## *Job description, work flow*

- Delivery of stock reagents and material for sample preparation is best done directly to the reagent storage and set-up area.
- Vessels containing reaction mixtures should always be centrifuged briefly before opening and freezing.
- The required reagents are stored exclusively in this area and processed here into the stock solutions needed.
- After the stock solutions have been checked for suitability, they should be divided into aliquots for storage and further use, to reduce the danger of contamination through frequent opening of reaction vessels and pipetting.
- freeze stock solutions in small aliquots.

# Πιθανές πηγές επιμόλυνσης στην PCR

- βιολογικά δείγματα
- εργαστηριακό περιβάλλον
- υγρό άζωτο/πάγος
- πιπέτες/ρύγχοι πιπετών
- υαλικά/σωληνάρια
- αντιδραστήρια
- θερμικός κυκλοποιητής
- τράπεζα UV
- συσκευές ηλεκτροφόρησης



# Οργάνωση εργαστηρίου για την αποφυγή επιμόλυνσης στην PCR

- The respective rooms must be marked as related to the specific areas
- **PCR-Setup is a one way street!**
- → Otherwise spreading of severe **carryover contamination** is possible.



# Νεώτερες εξελίξεις στην οργανολογία της PCR

## Θερμικοί κυκλοποιητές (Thermal cyclers)

- εκτέλεση PCR εντός φρεατίων πλακών μικροπιλοδοτήσεως 96 και 384 θέσεων
- εκτέλεση 2 ανεξάρτητων κύκλων σε ανεξάρτητες κεφαλές στον ίδιο κυκλοποιητή
- διαβάθμιση θερμοκρασίας υβριδισμού (gradient)
- εκτέλεση PCR σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (in situ PCR)
- ταχύτατη αυξομείωση θερμοκρασίας με συστήματα Peltier καθώς και με κυκλοφορητή αέρα (air cycling systems)
- παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR)
- σημαντική μείωση του χρόνου για την ολοκλήρωση της αντίδρασης
- δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των αρχικών DNA στόχων



# Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης PCR

- ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Πίνακας 1. Εύρος διαχωρισμού του DNA σε πηκτές αγαρόζης και πολυακρυλαμιδίου

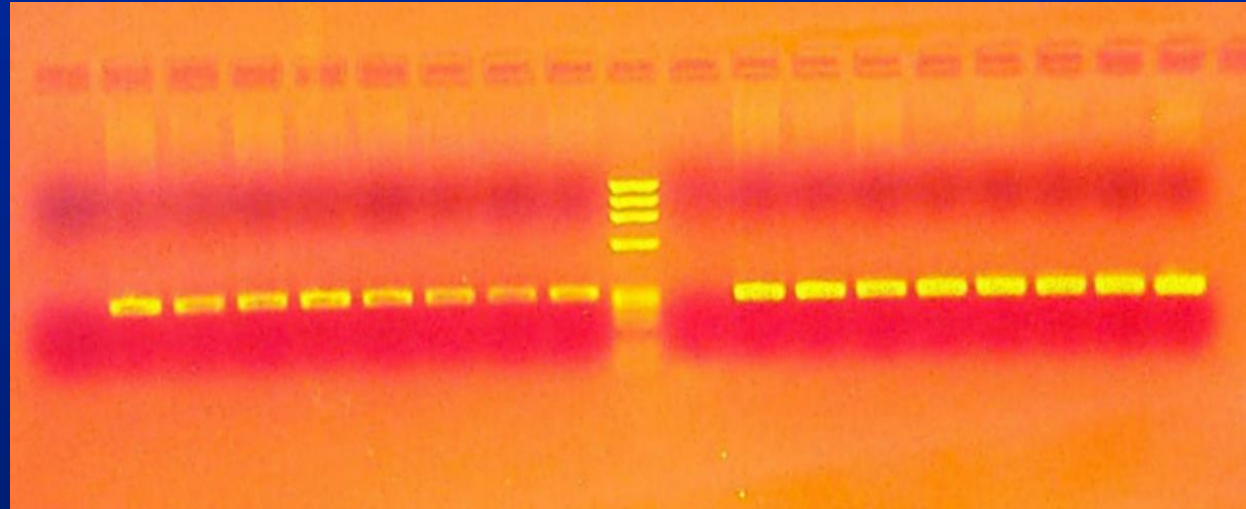
<u>Αγαρόζη, %</u>	<u>DNA (Kb)</u>	<u>Ακρυλαμίδιο, %</u>	<u>DNA (bp)</u>
0.3	5-60	3.5	1000-2000
0.6	1-2	5.0	80-500
0.7	0.8-10	8.0	60-400
0.9	0.5-7	12.0	40-200
1.2	0.4-6	15.0	25-150
1.5	0.2-3	20.0	6-100

# ανίχνευση προϊόντων της αντίδρασης PCR

- βρωμιούχο αιθίδιο
- SYBR GREEN, SYBR GOLD (Molecular Probes) : πολύ υψηλή ευαισθησία
- χρώση αργύρου : πολύ υψηλή ευαισθησία
- αυτοραδιογραφία (autoradiography)
- αποτύπωση (blotting) (Southern Blot για DNA και Northern Blot για RNA)



## ανίχνευση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης



- **#1: PCR blank**
- **#2-#9: BRCA1, exon 14**
- **#10: DNA marker**
- **#11 PCR blank**
- **#12-19: BRCA1, exon 22**

# Κυριότερες παραλλαγές της αντίδρασης PCR

- PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)
- Ασύμμετρη PCR
- Διπλή PCR (Nested PCR)
- Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)
- PCR-ELISA
- PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

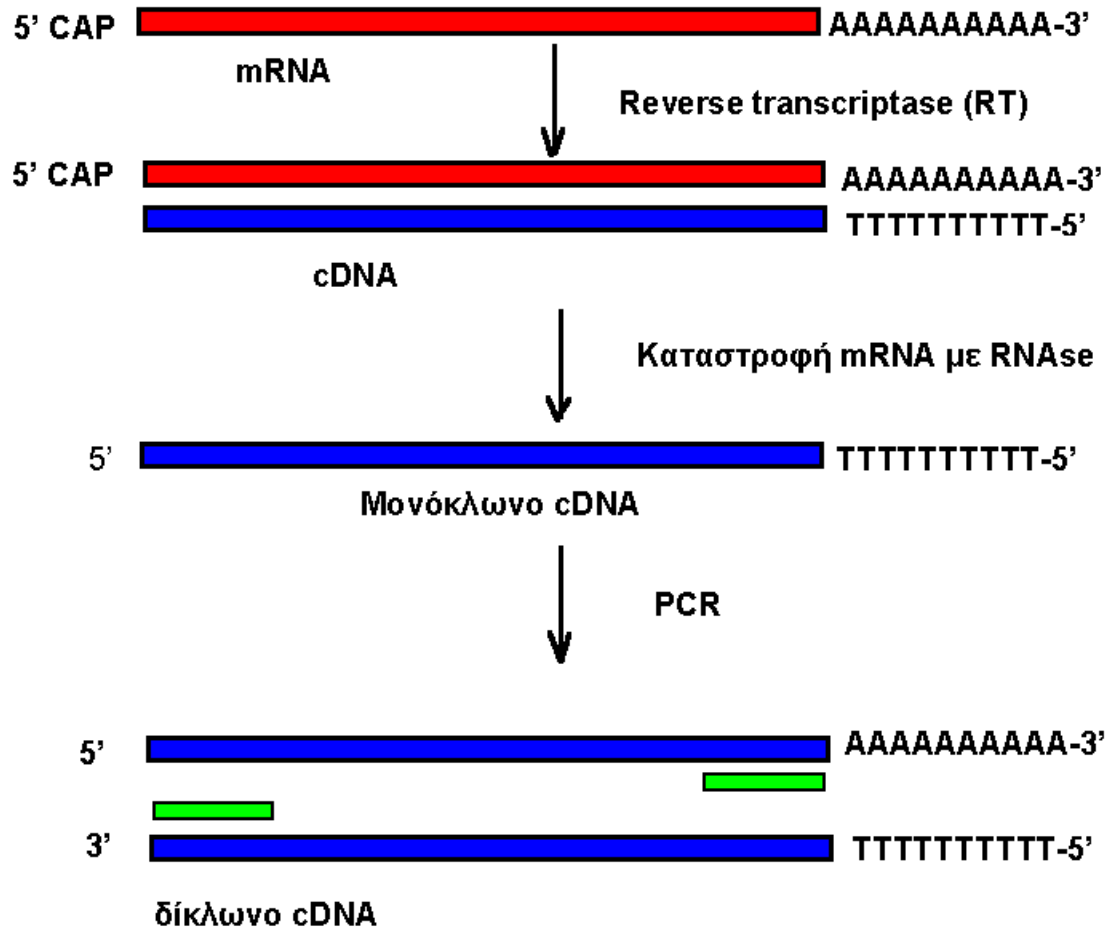


# PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)

- ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το RNA αντί του DNA
- το RNA μετατρέπεται σε cDNA με αντίστροφη μεταγραφή
- για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή, oligodTs, ή μόνο ένας ειδικός PCR-εκκινητής
- το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την Ταq-πολυμεράση και με δύο ειδικούς PCR εκκινητές δημιουργείται το δίκλωνο cDNA
- το δίκλωνο cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την συνήθη τεχνική της PCR



# Βασική αρχή RT-PCR



# RT-PCR ενός σταδίου (one step RT-PCR)

- ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο
- 
- αξιοποίηση της διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών όπως η *T. Thermophilus* (Tth) DNA πολυμεράση να μεταγράψουν αντίστροφα RNA παρουσία  $Mn^{2+}$ , ενώ ταυτόχρονα δρούν και ως DNA πολυμεράσες

## σημαντικά πλεονεκτήματα:

- δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων
- ταχύτητα-απλούστερη διαδικασία
- προστασία από κίνδυνο επιμόλυνσης

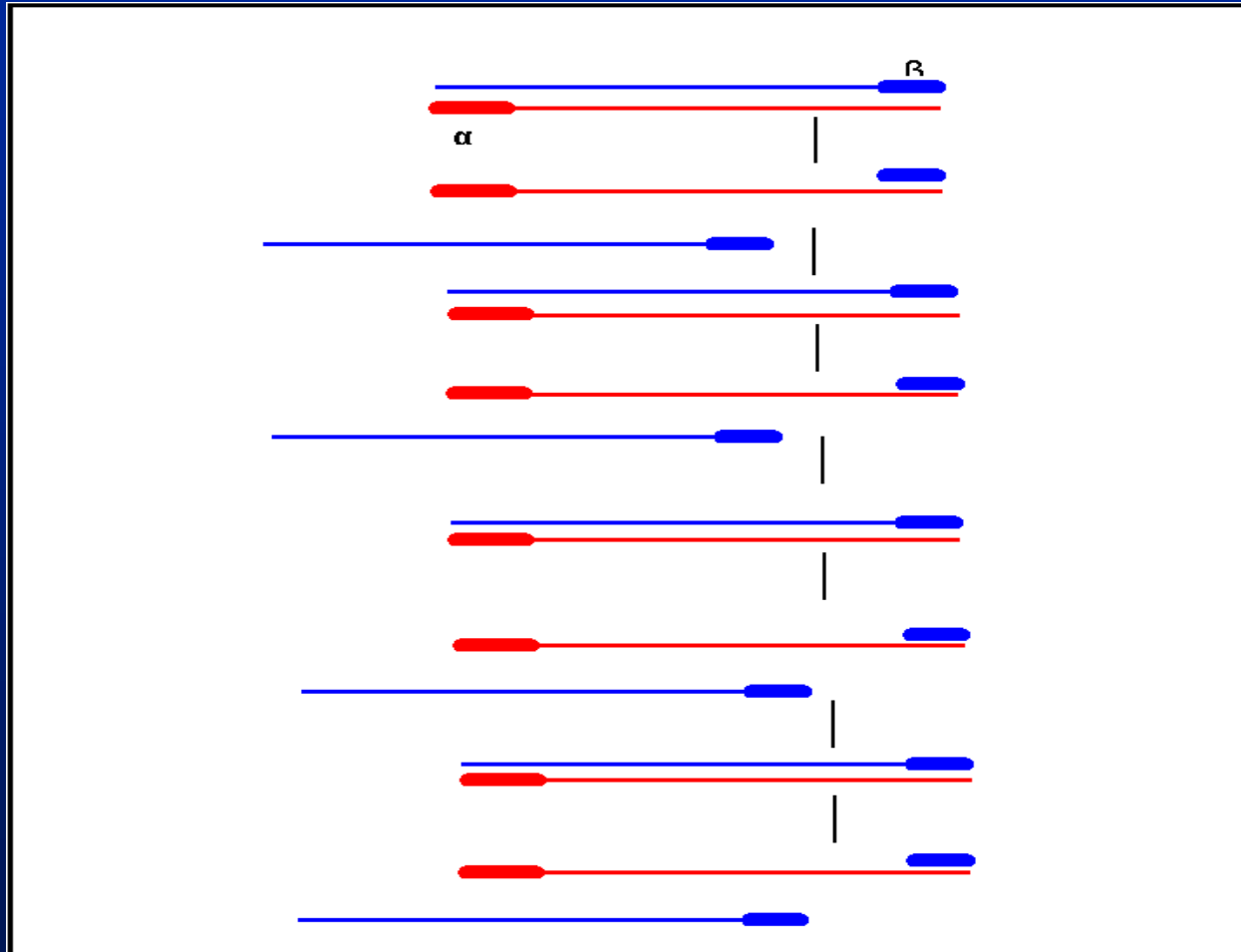
## Ασύμμετρη PCR

- παράγεται μονόκλωνο DNA
- χρησιμοποιείται για DNA-sequencing
- χρησιμοποιούνται  $n$  άνισες (ασύμμετρες) συγκεντρώσεις των δύο εκκινητών (σε αναλογίες 1:10, 1:2, 1:50)
- στους πρώτους 15-25 κύκλους, το περισσότερο προϊόν που παράγεται είναι δίκλωνο
- καθώς ο μικρής συγκέντρωσης εκκινητής εξαντλείται, στους επόμενους κύκλους παράγεται πλεόνασμα της μιας αλυσίδας
- το μονόκλωνο DNA συσσωρεύεται γραμμικά





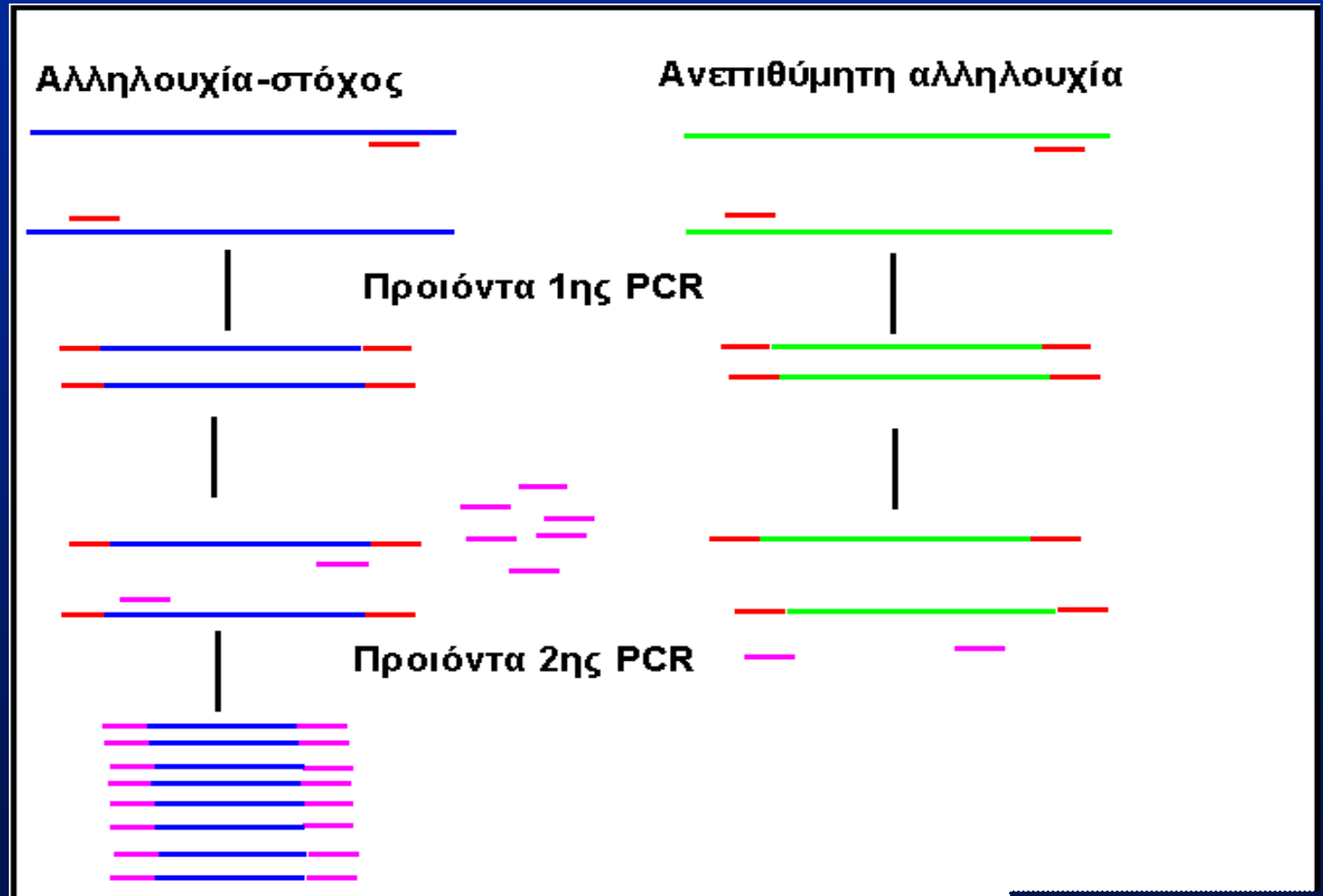
# Βασική αρχή ασύμμετρης PCR



## Διπλή PCR (nested PCR)

- χρησιμοποιείται για αύξηση της ειδικότητας της αντίδρασης PCR
- δύο PCR όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (εξωτερικό και εσωτερικό)
- το εσωτερικό ζεύγος υβριδοποιείται σε περιοχή που ενισχύεται από το άλλο
- στον πρώτο γύρο της PCR, χρησιμοποιείται το εξωτερικό ζεύγος των εκκινητών
- στον δεύτερο γύρο ενισχύονται επιλεκτικά τα κομμάτια που περιέχουν την αλληλουχία-στόχο

# Αρχή μεθόδου διπλής PCR

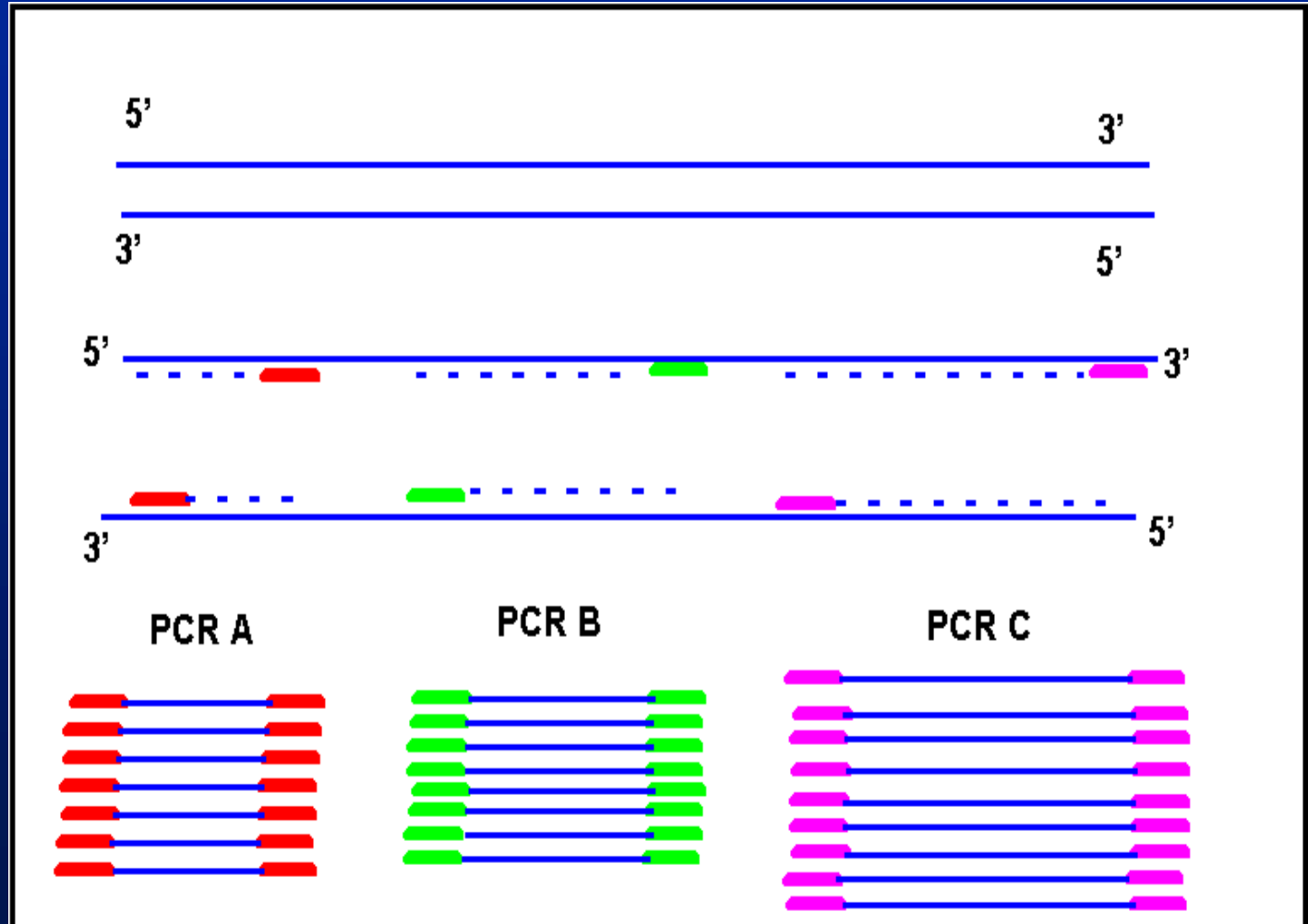


# Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)

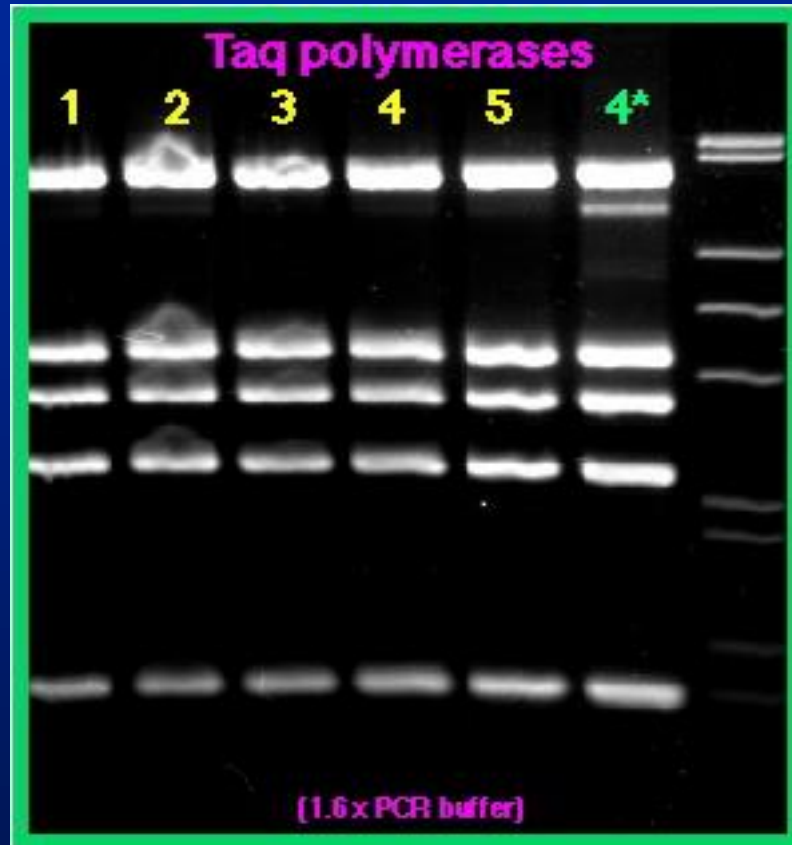
- χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιοχών της αλληλουχίας-στόχου
- χρησιμοποιείται στη διάγνωση γενετικών ασθενειών που οφείλονται σε απαλοιφές γενετικού υλικού γονιδίων, όπως η μυϊκή δυστροφία του Duchenne
- πολύ απλούστερη από την αποτύπωση κατά Southern (Southern blot)



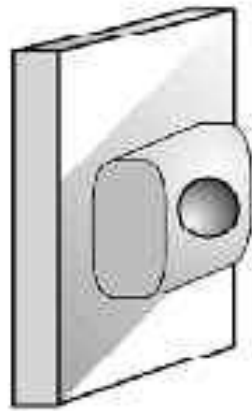
# Αρχή μεθόδου πολλαπλής PCR



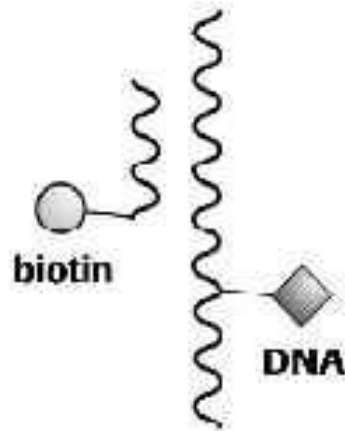
# Πολλαπλή PCR



# Mycoplasma PCR-ELISA

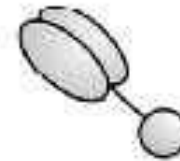


**streptavidin-coated MTP**

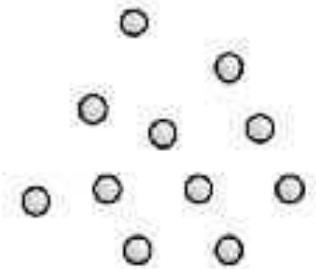


**biotin-labeled capture probe**

**DIG-labeled amplicon**



**anti-DIG-POD, Fab-fragments**



**POD substrate (TMB)**



# Εφαρμογές της κλασικής PCR

Προγεννητική διάγνωση (κυστική ίνωση, μεσογειακή αναιμία, διάφορες κληρονομικές νόσοι)

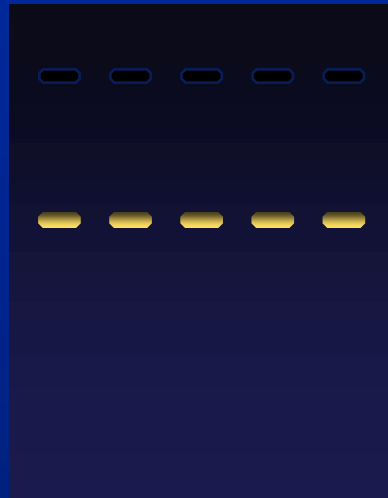
Προγεννητική διάγνωση (Τρισωμία 21, σύνδρομο Down)

Διάγνωση και χαρακτηρισμός μολυσματικών ασθενειών (ανίχνευση HIV, HBV, HCV, HPV κα)

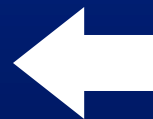
Διάγνωση και χαρακτηρισμός νεοπλασιών



# Κλασική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) Πληροφορίες που μας δίνει η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης



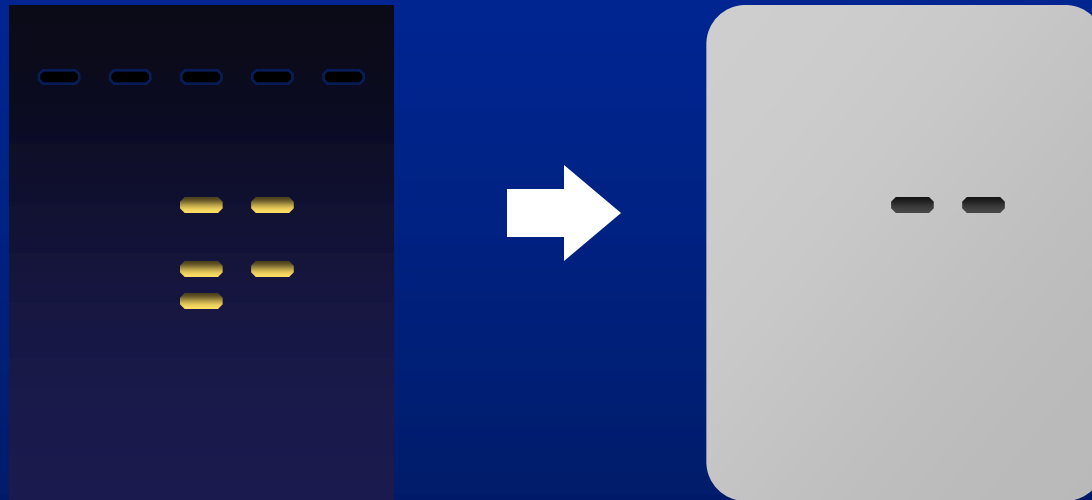
**Πληροφορία για το μέγεθος**



**Καμία πληροφορία  
για την αλληλουχία αλλά  
ούτε και για την αρχική  
ποσότητα**

# Κλασσική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Πληροφορίες που μας δίνει το blot



Πληροφορία για το μέγεθος

πληροφορία  
για την αλληλουχία αν είναι ελεγχόμενες  
και αυστηρές οι συνθήκες υβριδισμού

# Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

## Ποσοτική PCR (qPCR)

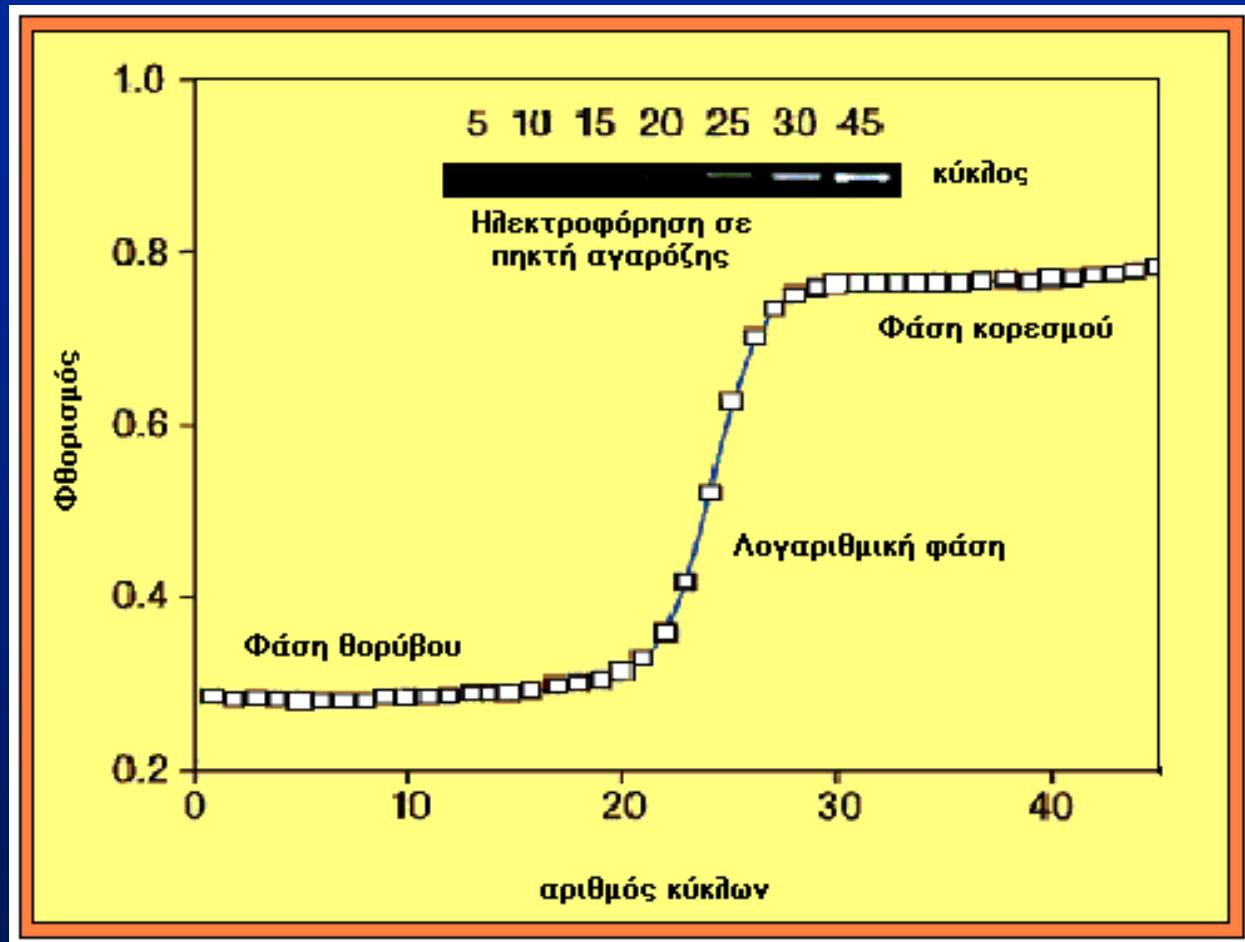
### Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού

Η ποσοτική PCR δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR κατά τη διάρκεια της εξέλιξής της

#### Πλεονεκτήματα:

- Αυτοματοποίηση
- Δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού
- Αποφυγή ηλεκτροφορήσεων
- Αποφυγή επιμολύνσεων
- Υψηλή ευαισθησία
- Κατάλληλη για μεγάλο αριθμό δειγμάτων

## Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

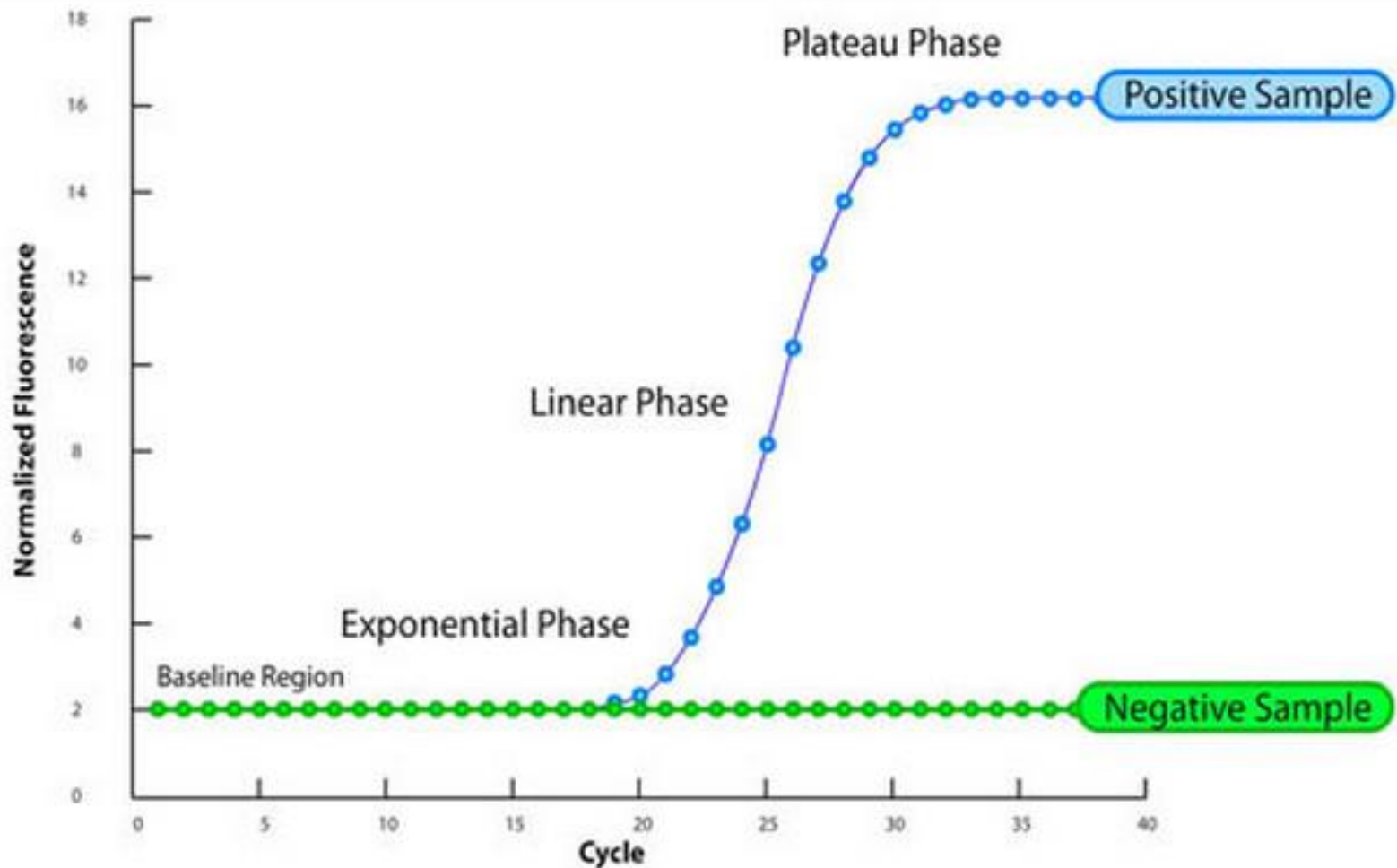


Ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και μέτρηση της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης

# Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

## Ποσοτική PCR (qPCR)

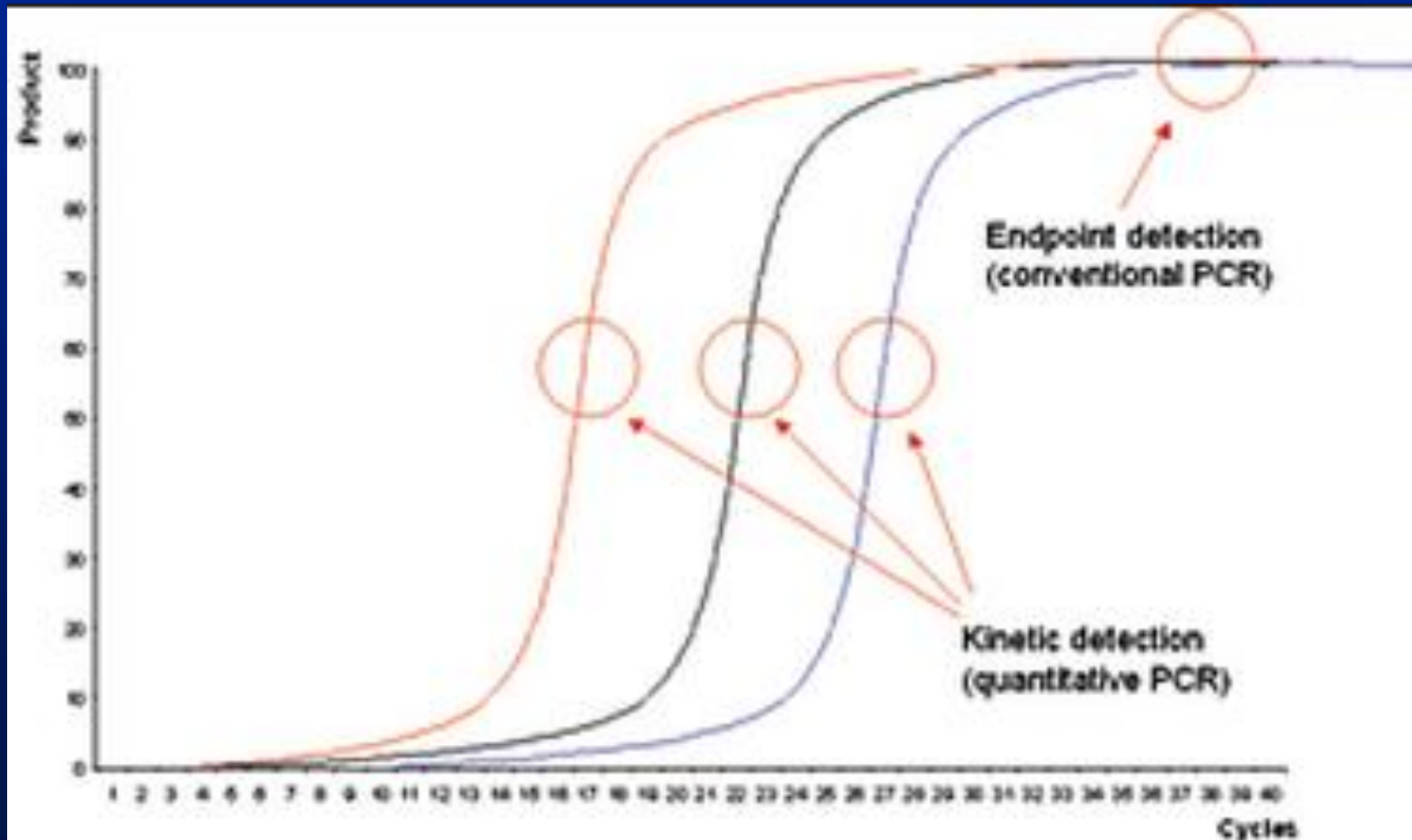
### Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού



# Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

## Ποσοτική PCR (qPCR)

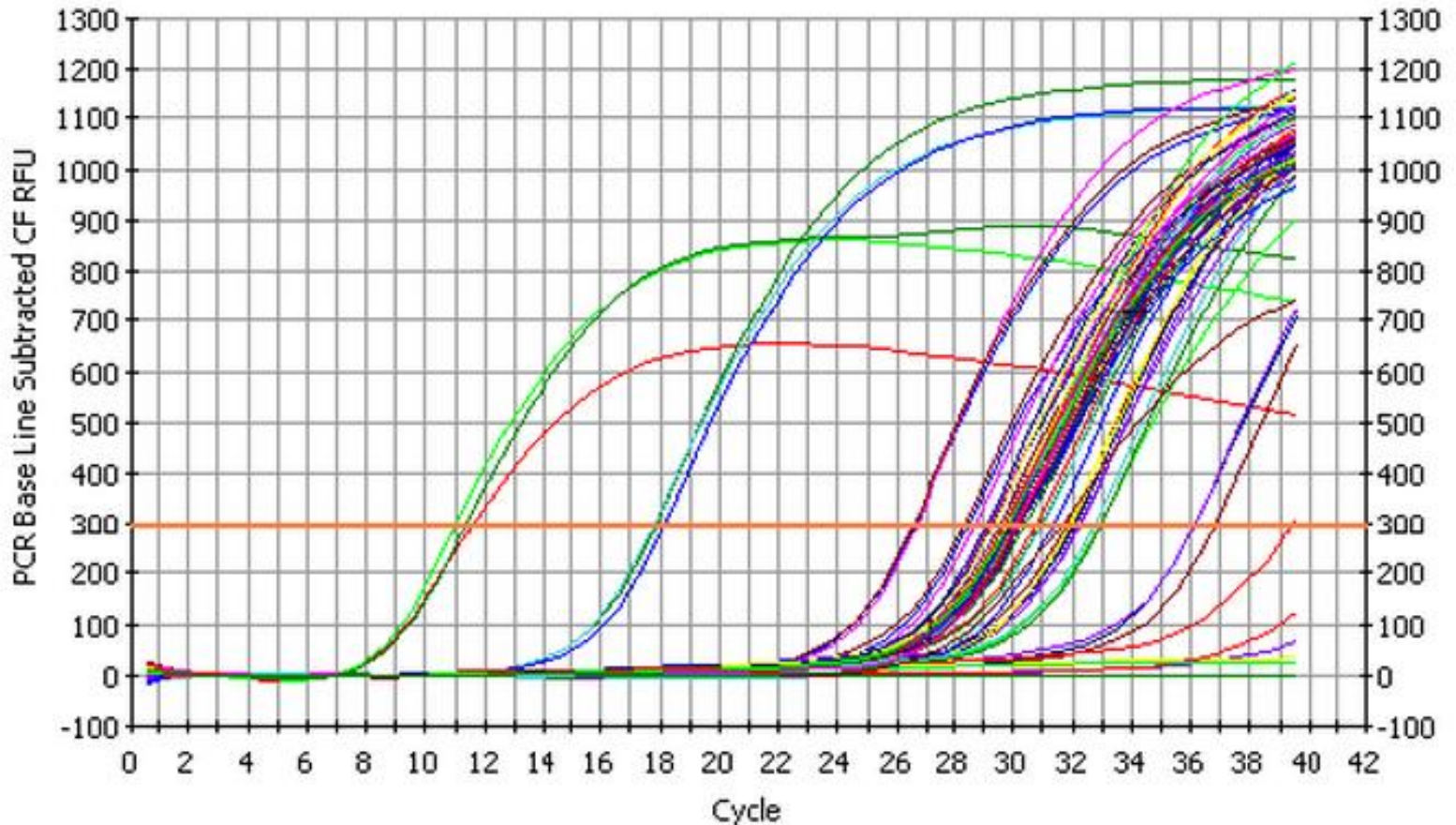
### Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού



# Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

## Ποσοτική PCR (qPCR)

### Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού

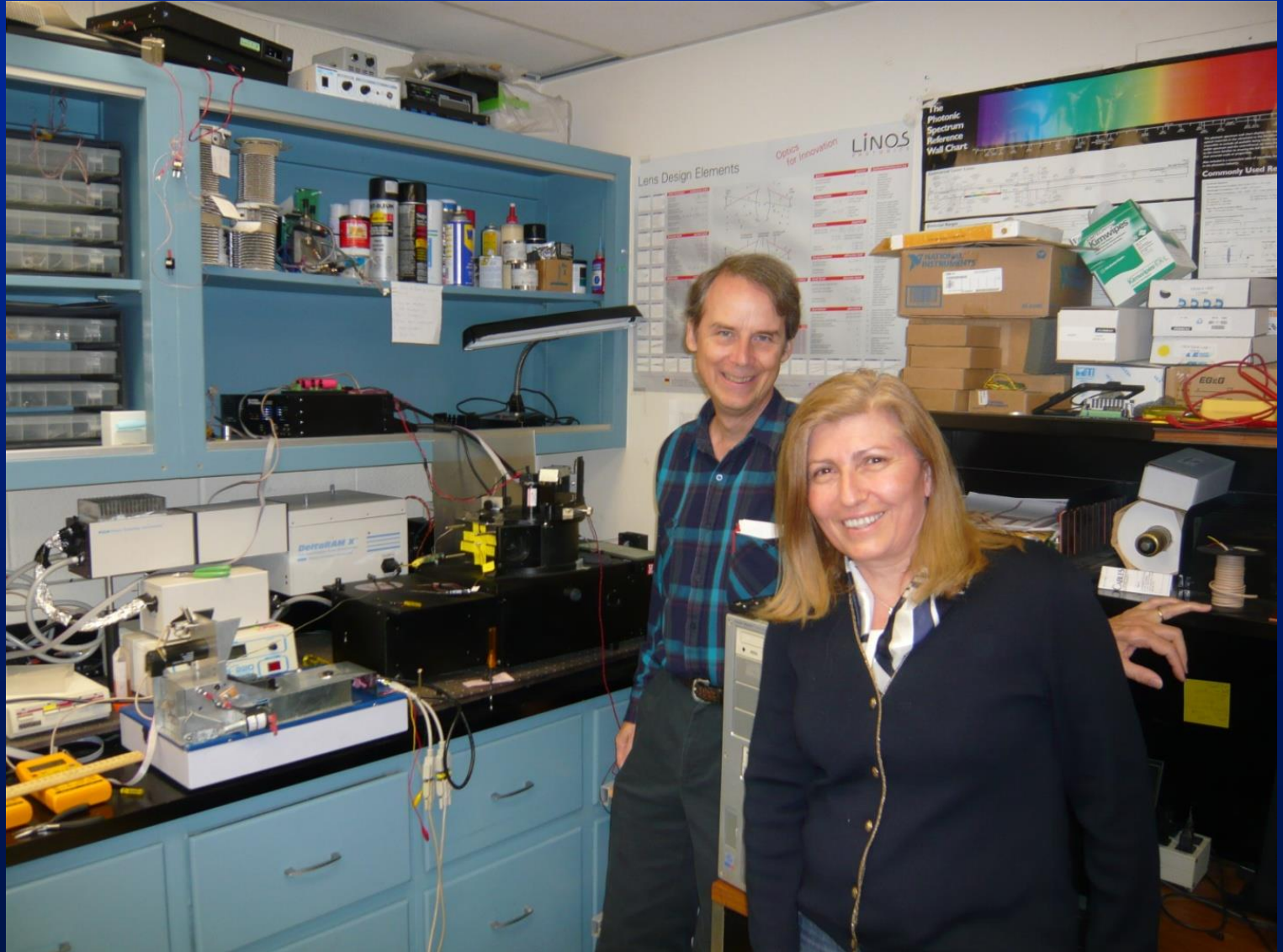


# Prototype: LightCycler, 1997





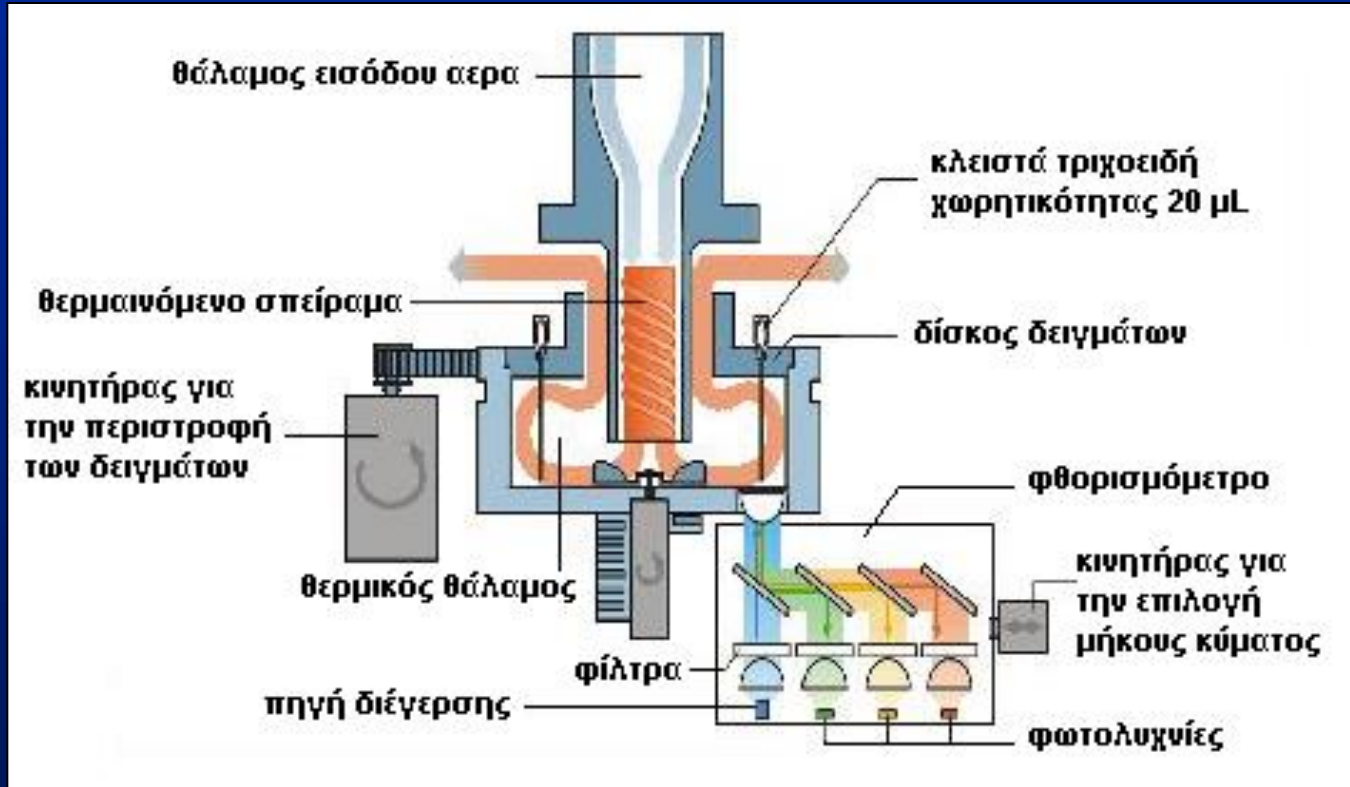
# LightCycler Inventor: Dr. Carl Wittwer, Univ of Utah, Salt Lake City



# LightCycler

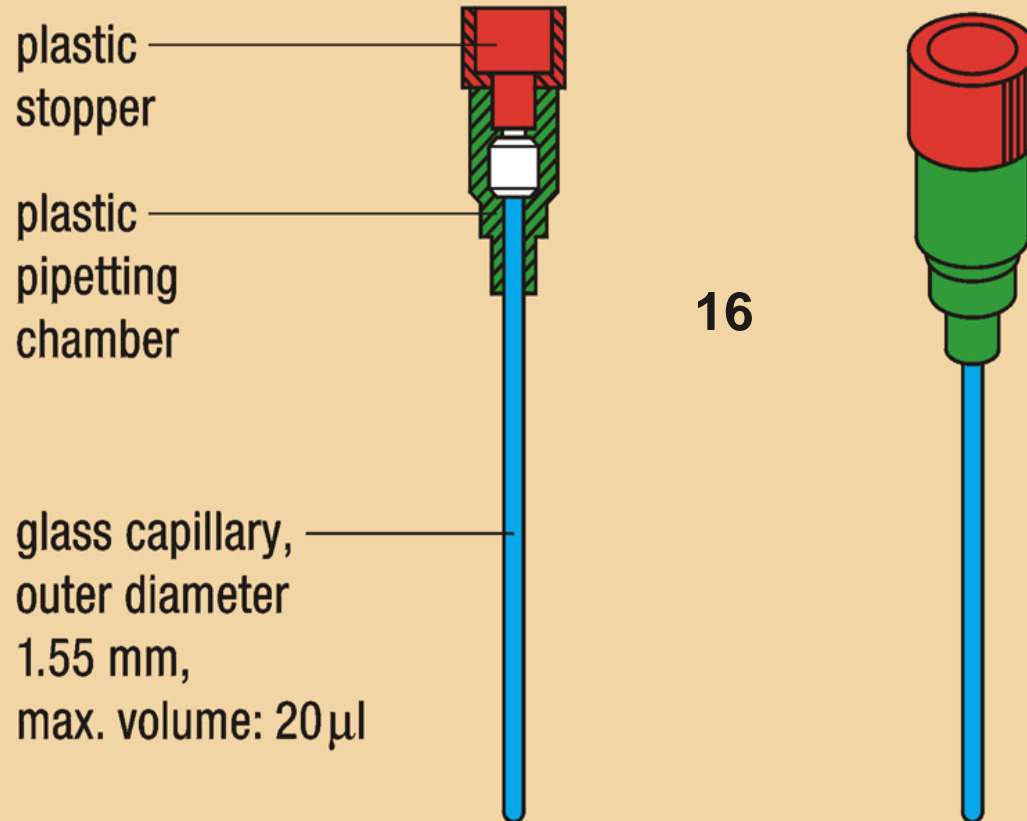


**Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο  
(Real time PCR)  
τεχνολογία LightCycler (Roche Diagnostics)**



**Συνδυασμός φθορισμομέτρου και θερμικού κυκλοποιητή**

# Κυψελίδες αντίδρασης PCR στο LIGHTCYCLER







# Smart Cycler (Cepheid)

## A flexible system built on the independently programmable I-CORE™ Module

The Smart Cycler is an integrated DNA/RNA amplification and detection instrument system. The system is designed for ease of use, from the expandable modular format to the Smart Cycler Software. Each Smart Cycler Processing Block is built around the proprietary microprocessor-controlled I-CORE™ (Intelligent Cooling/Heating Optical Reaction) Module. Thermally and optically optimized proprietary reaction tubes work in concert with the unique design of the I-CORE Module to deliver rapid cycling, faster amplification and immediate data collection through real time optical detection. Expanding the Smart Cycler System is simple, preserving the investment in hardware while allowing for the changing needs of research environments.

### I-CORE™ Module single-site thermal cycler/fluorometer

#### RAPID HEATING AND COOLING

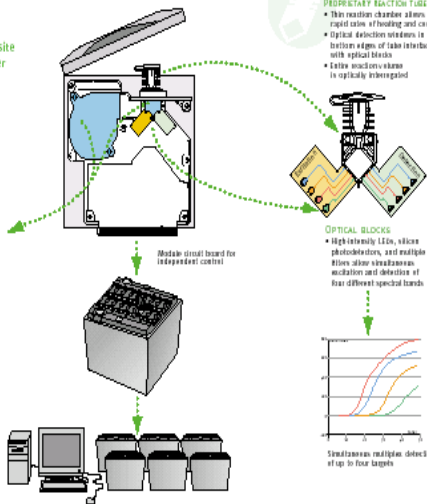
- High thermal conductivity ceramic heater plates with integrated temperature sensors
- High efficiency cooling fan



Rapid thermal cycling enables protocol time reduction

#### FLEXIBILITY

- Sixteen I-CORE™ blocks per Processing Block
- Sixteen independently controlled reaction sites, used singly or in groups
- Link up to six processing blocks in one system



## The Smart Cycler® System: A **flexible** and **expandable** real time thermal cycler

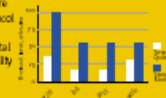
Nucleic acid detection and analysis in today's molecular biology laboratory is performed under the pressures of time and staffing constraints, changing research goals and wide-ranging detection requirements. Labs need to find protocols and instrumentation that provide speed, flexibility and versatility. They need to cycle smarter. The Smart Cycler® System from Cepheid makes it all possible.

### Flexibility

Independently programmable reaction sites give maximum flexibility. Up to sixteen different cycling protocols can be performed simultaneously in one processing block. Multiple experimental runs can be started at different times, allowing several operators to use the instrument concurrently.

### Speed

Rapid, precise heating and cooling of the reaction mixture to target temperatures significantly reduces cycling protocol times. The Smart Cycler System's combined fast thermal ramp rates and real time detection greatly reduce the total time required to carry out an experiment. Finally, the ability to multiplex cycling protocols and to use multiple dye detection in a single run enhances lab productivity.



Rapid cycling enables reduced protocol time

### Real time detection

The Smart Cycler System Software optically monitors each reaction site as the fluorescent signals develop. Growth curves are displayed in real time as amplification occurs, and the presence of amplified product can be confirmed when the fluorescent signal exceeds a defined threshold.

### Four-color optical capability

Each of the sixteen reaction sites in a Smart Cycler Processing Block has its own optical subsystem comprised of solid state components and is capable of four-channel fluorescent detection. By using multiple fluorescent reporter dyes, up to four targets can be detected simultaneously in a single reaction mixture.

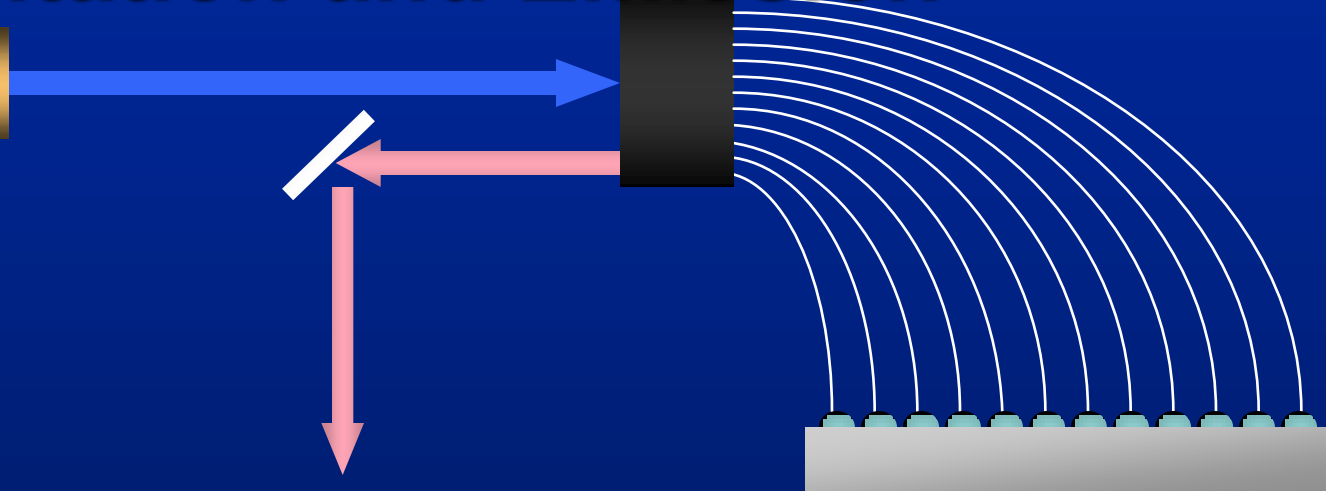
### Versatility

The modular nature of the Smart Cycler System gives laboratories a great deal of flexibility to meet workload demands. System capacity can be easily and cost-effectively expanded by adding processing blocks – up to six per System.

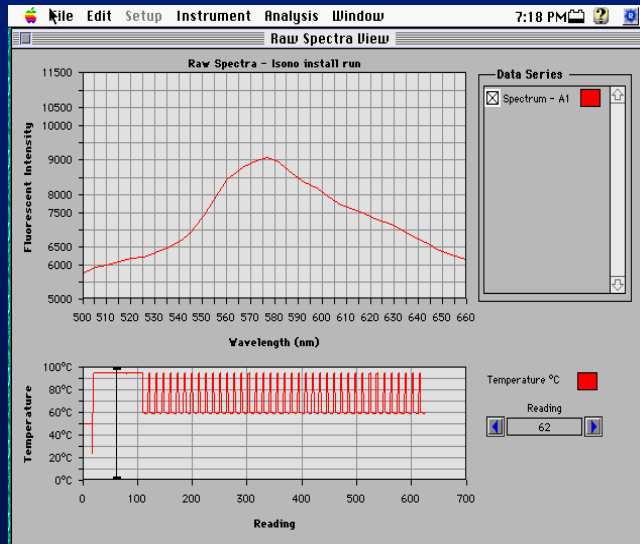
# ABI Prism

## Excitation and Emission

Laser  
488nm



CCD

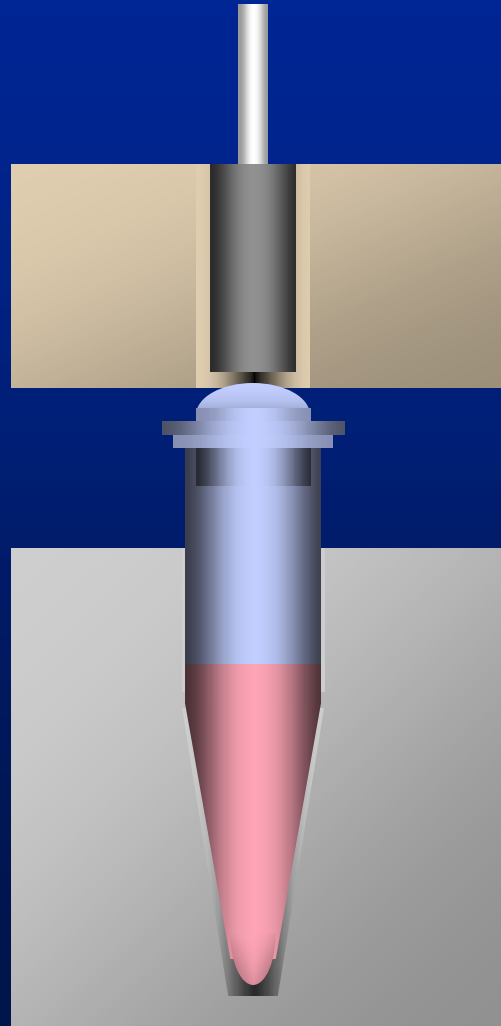


96 wells every  
7 - 8 seconds.



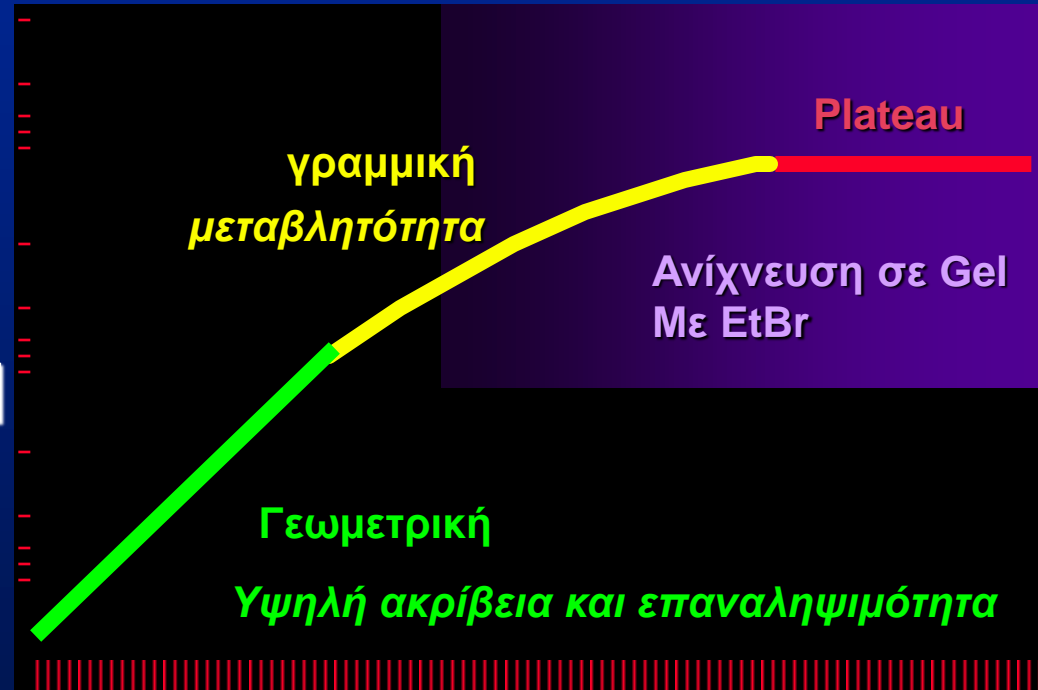
# ABI Prism

Ανίχνευση μέσω των σωληναρίων της PCR



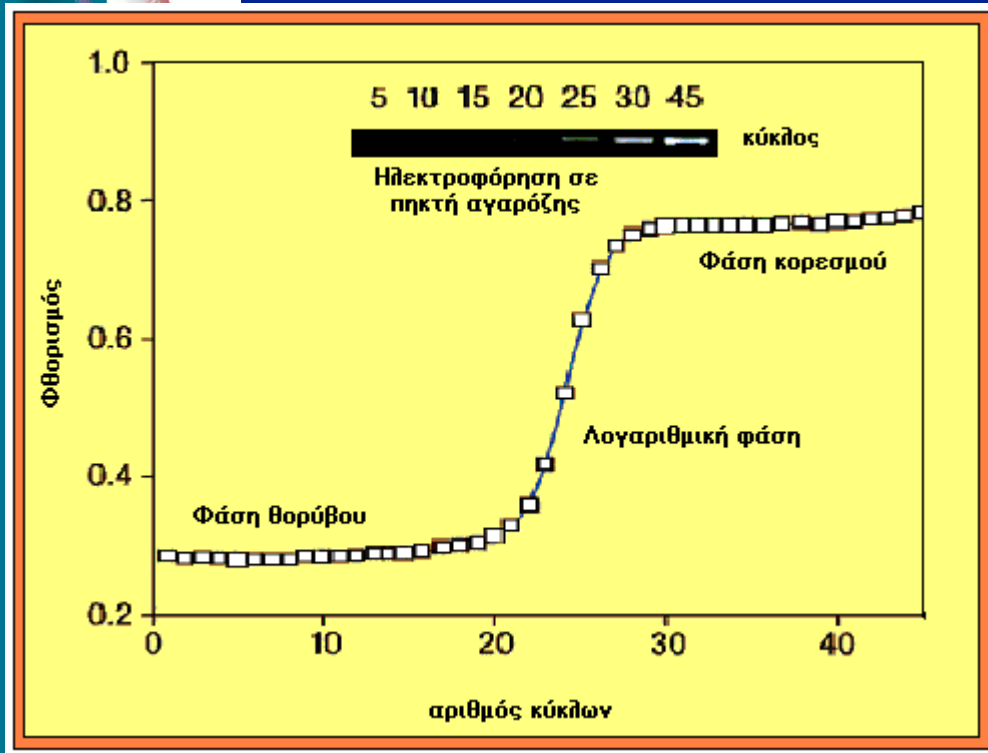
# Φάσεις της αντίδρασης PCR

Log [DNA]



Κύκλος #

# Χαρακτηριστικό καταγράφημα αντίδρασης real time PCR



$$N = N_0 \times (1+E)^n$$

$N$  : η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου μετά από  $n$  κύκλους

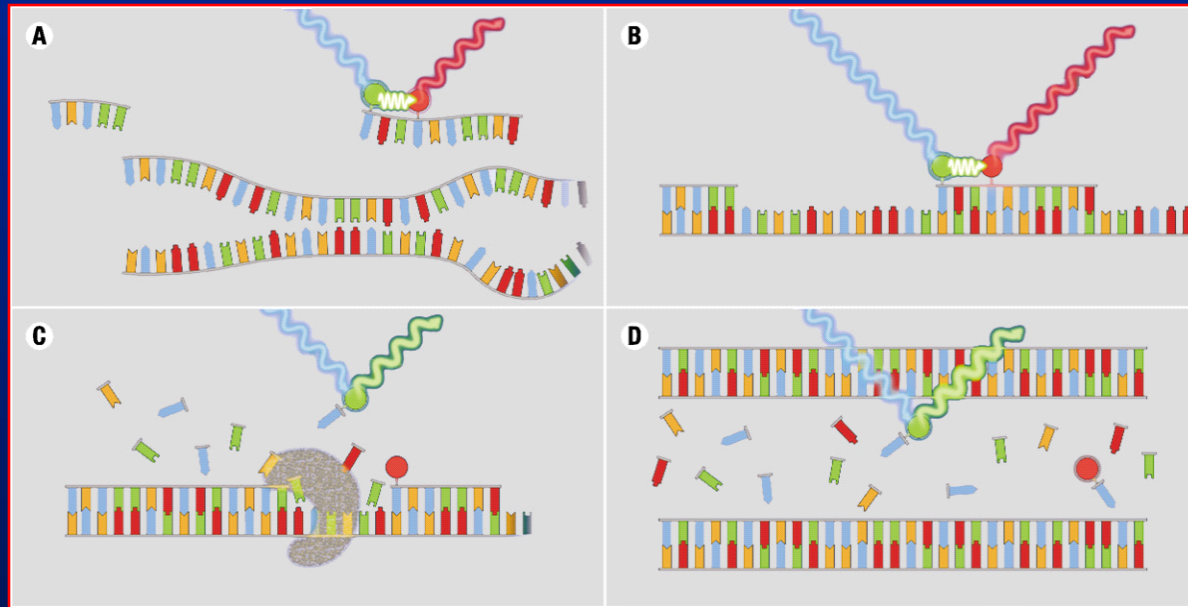
$N_0$  : η αρχική ποσότητα του στόχου

$n$  : ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης

$E$  : η απόδοση της αντίδρασης PCR

# PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)

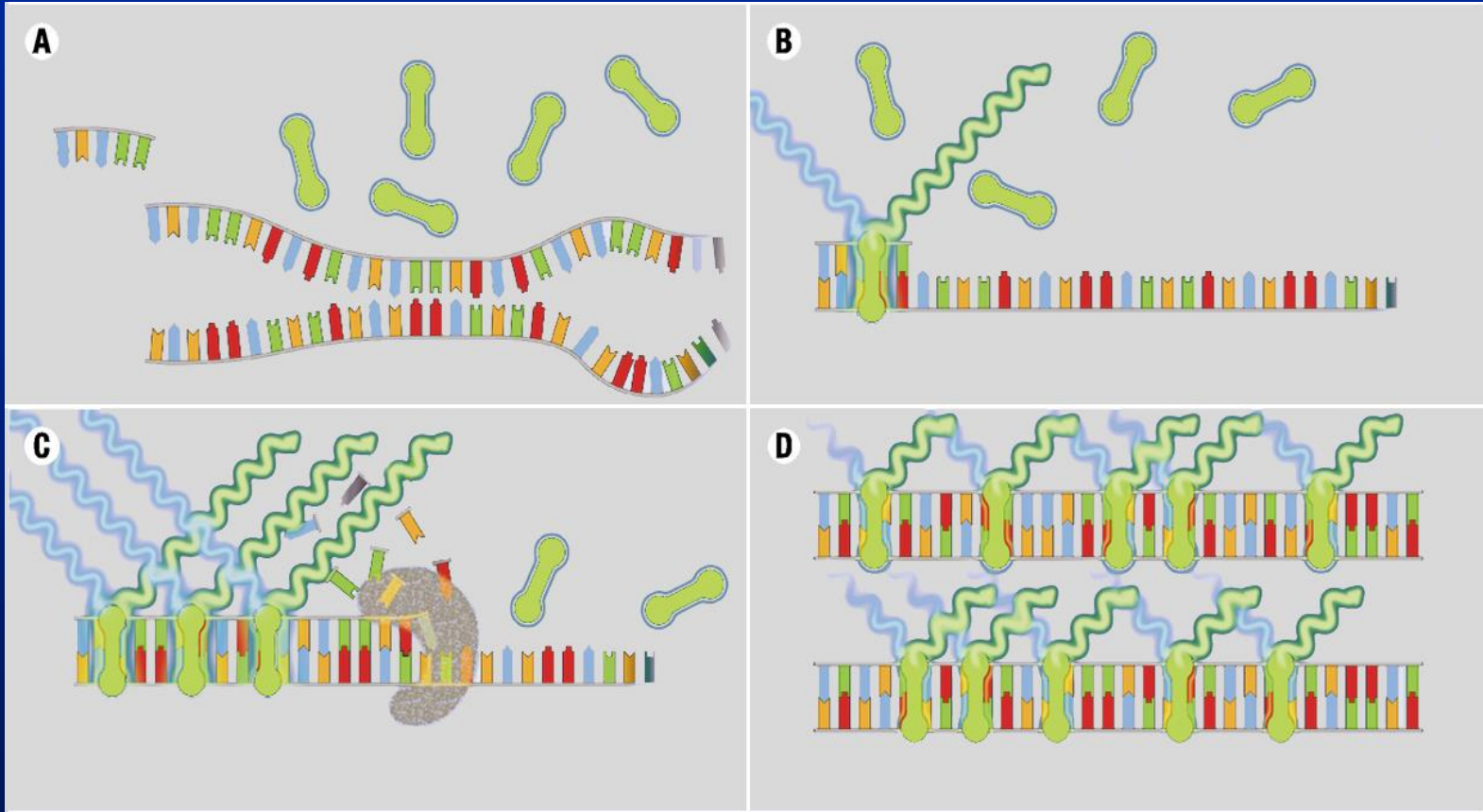
βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR και στη μέτρηση της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού κατά την διάρκεια της αντίδρασης



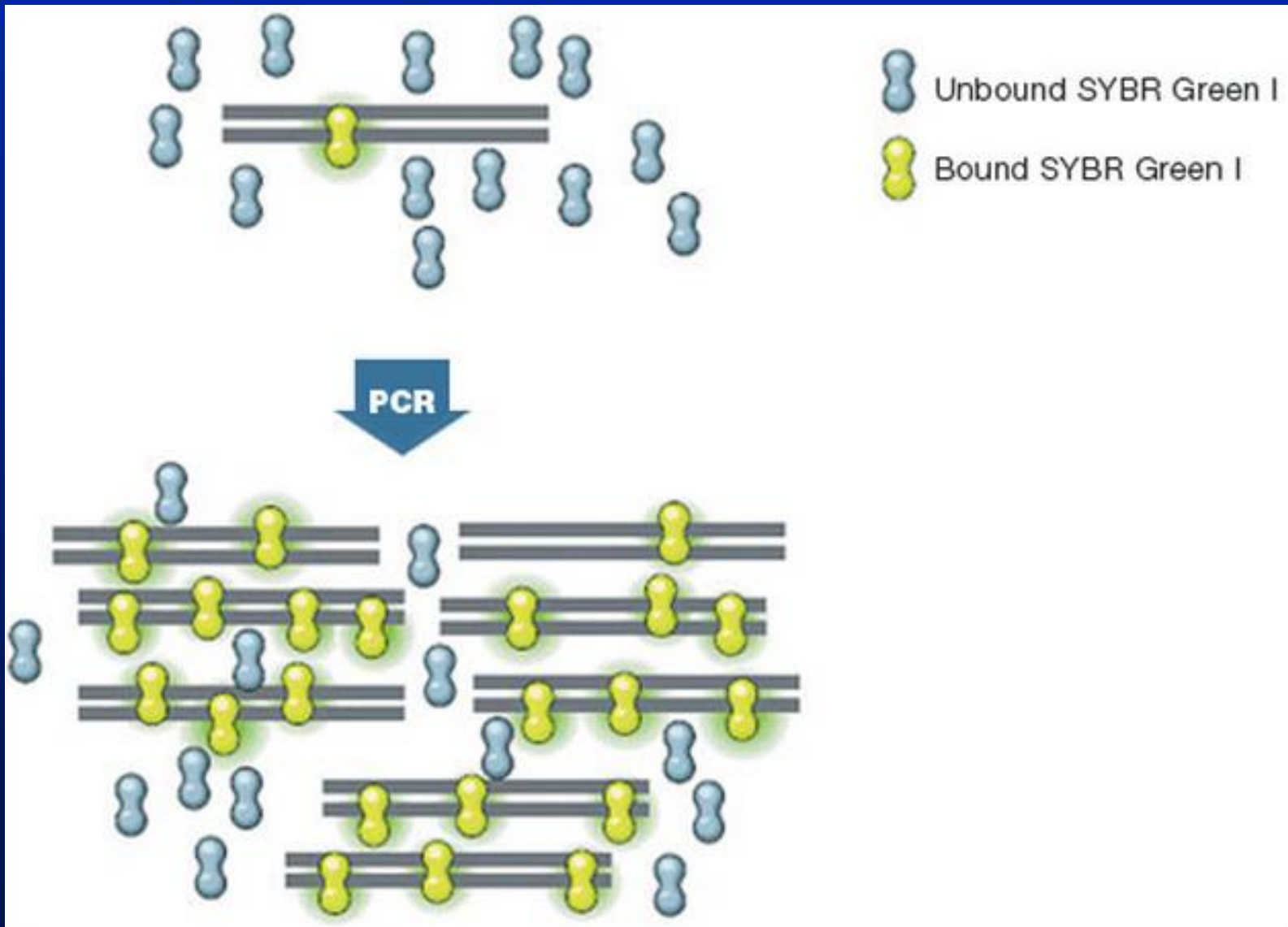
## ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ qPCR

- **ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΓΙΑ dsDNA (SYBR<sup>®</sup> Green, LCGreen)**
- **ΖΕΥΓΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ (dual hybridization probes)**
- **ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ (hydrolysis probes, TaqMan<sup>®</sup>)**
- **ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΦΑΡΟΙ (molecular beacons)**
- **ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΤΥΠΟΥ «ΣΚΟΡΠΙΟΣ» (scorpions)**

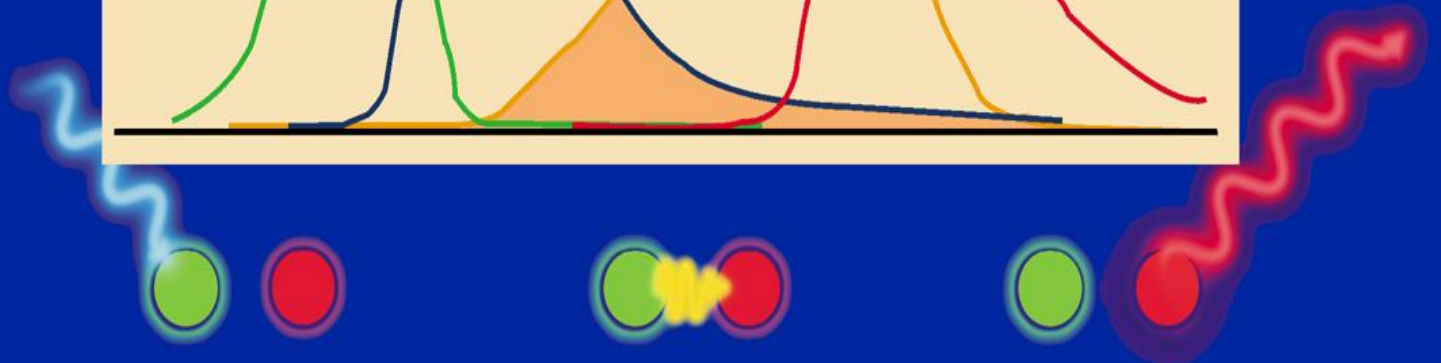
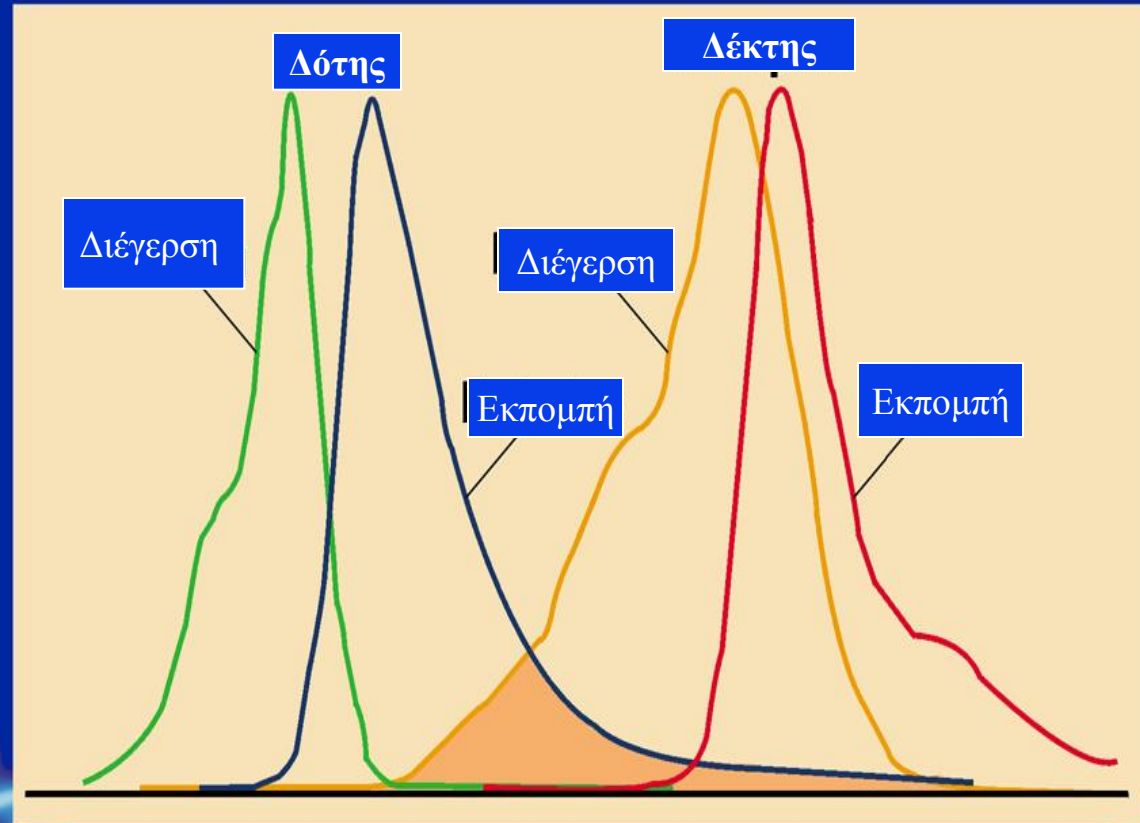
# Αρχή μεθόδου του συστήματος ανίχνευσης με SYBR Green



# Αρχή μεθόδου του συστήματος ανίχνευσης με SYBR Green

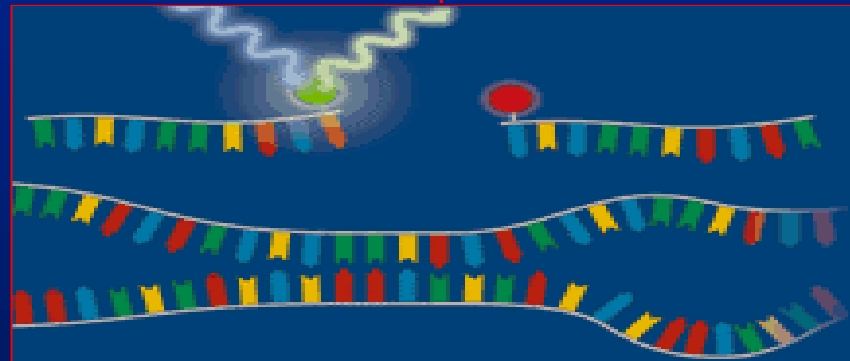
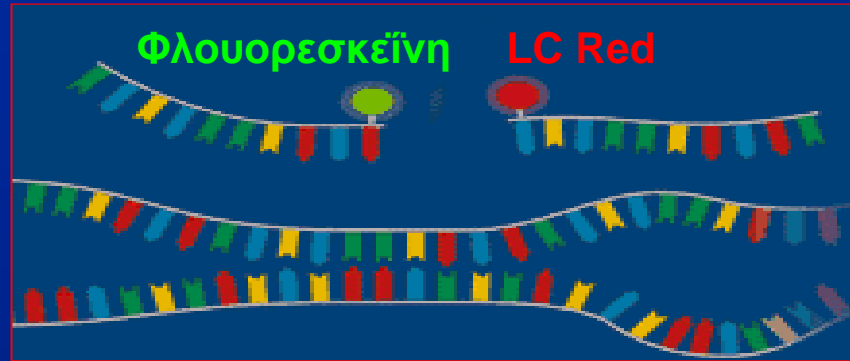


# ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕΣΩ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)



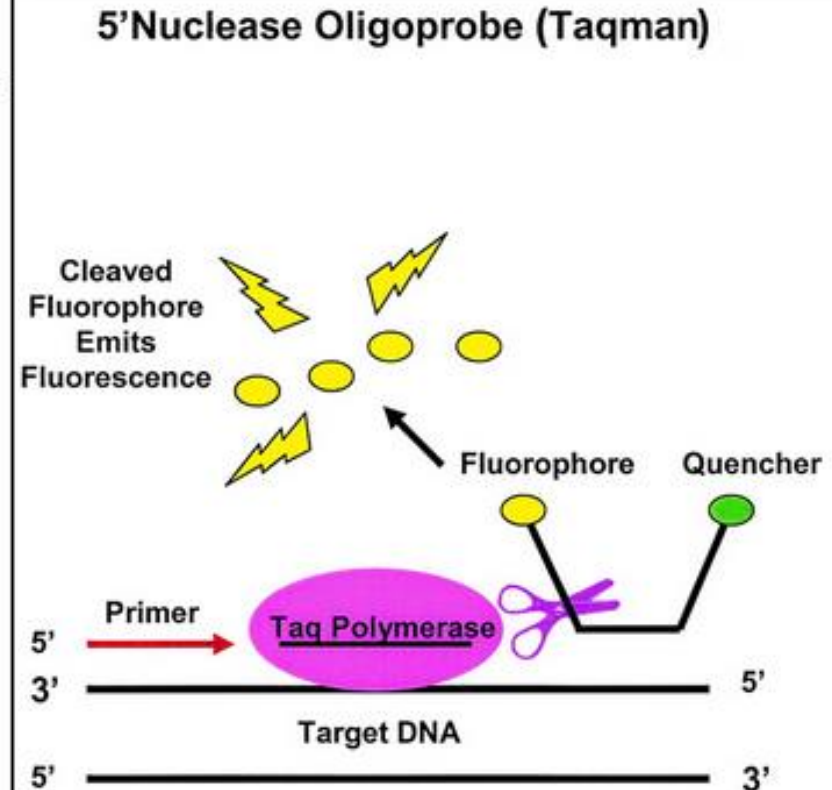
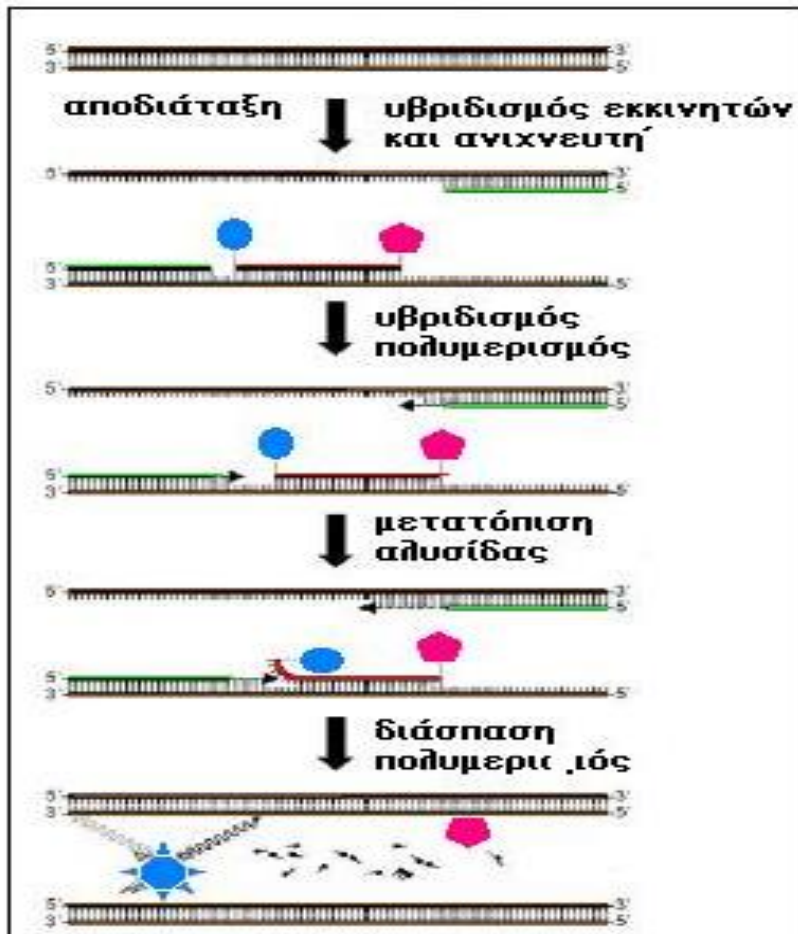


# ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕ ΖΕΥΓΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ DNA

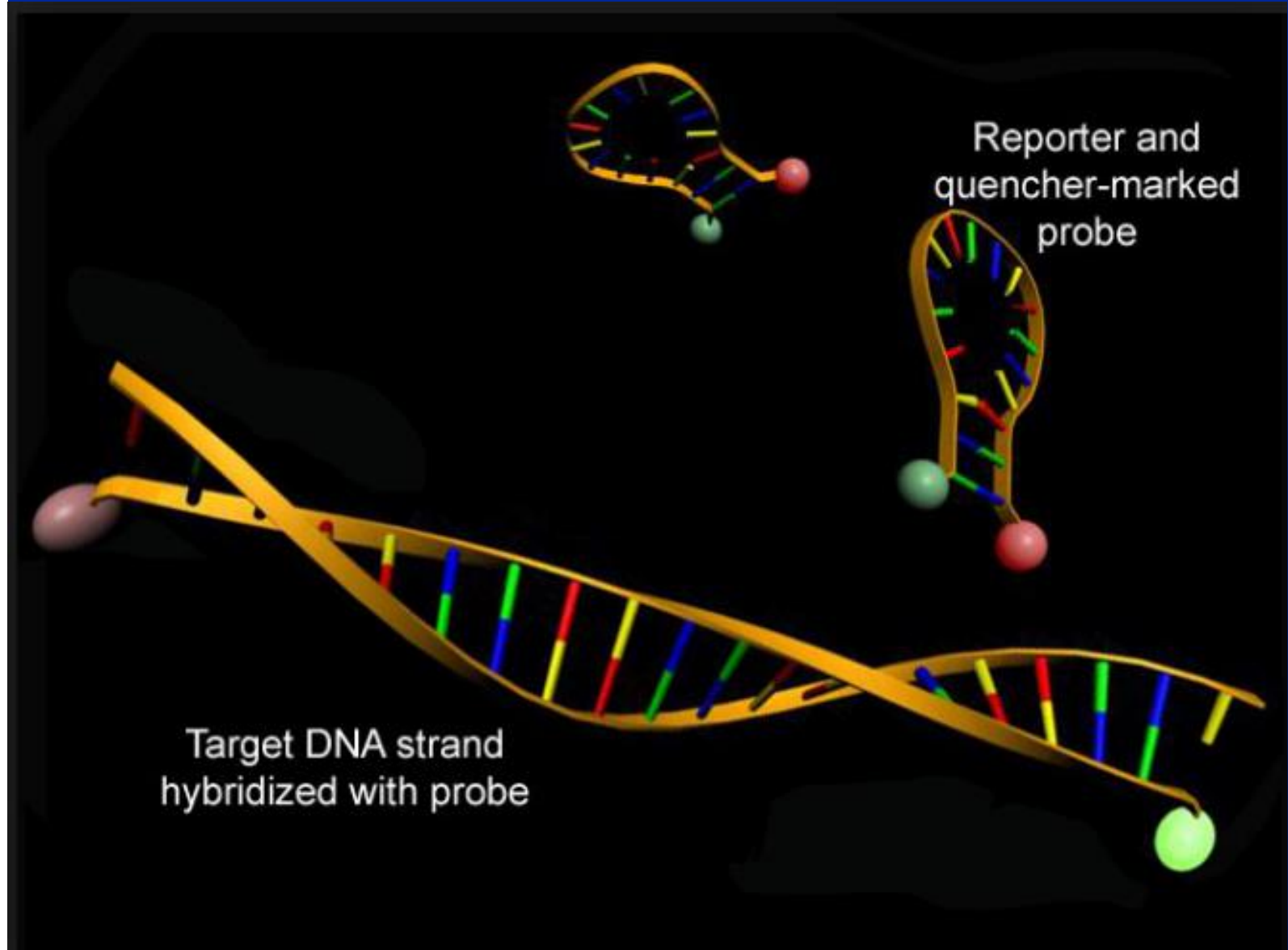


# Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

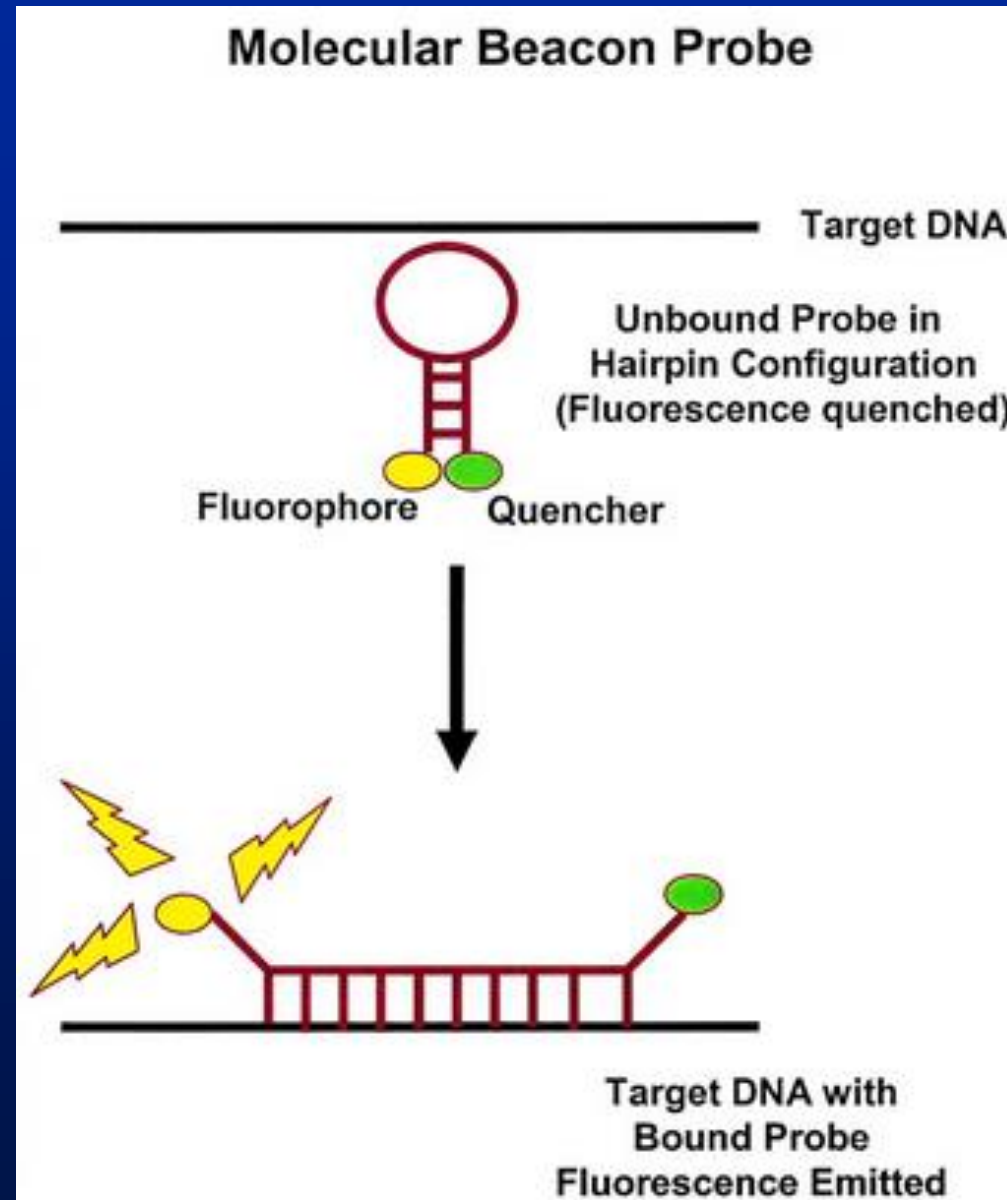
## σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτή υδρόλυσης (τύπου TaqMan)



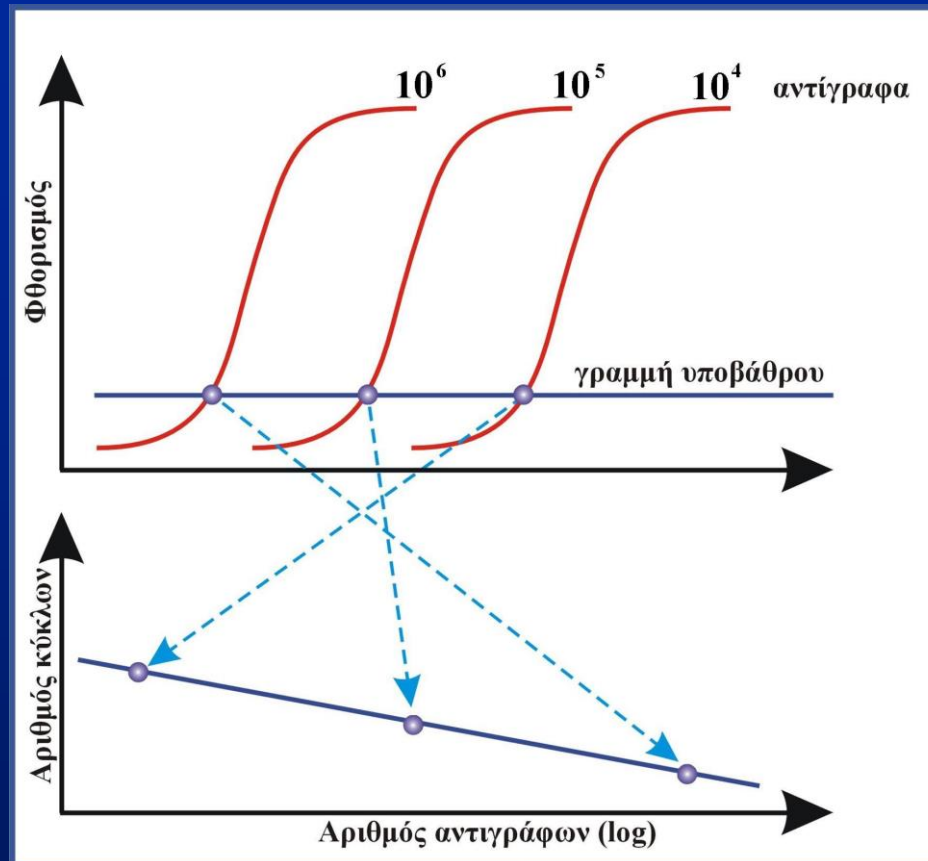
# Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές Μοριακούς Φάρους



# Σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές Μοριακούς Φάρους



# Αρχή ποσοτικού προσδιορισμού με qPCR



**C<sub>q</sub>**: σημείο στο οποίο η ένταση φθορισμού ξεπερνά το σήμα υποβάθρου (μέγιστο δεύτερης παραγώγου)

Το διάγραμμα βαθμονόμησης κατασκευάζεται με γραφική παράσταση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης προτύπων συναρτήσει του αντίστοιχου C<sub>q</sub>

## ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR

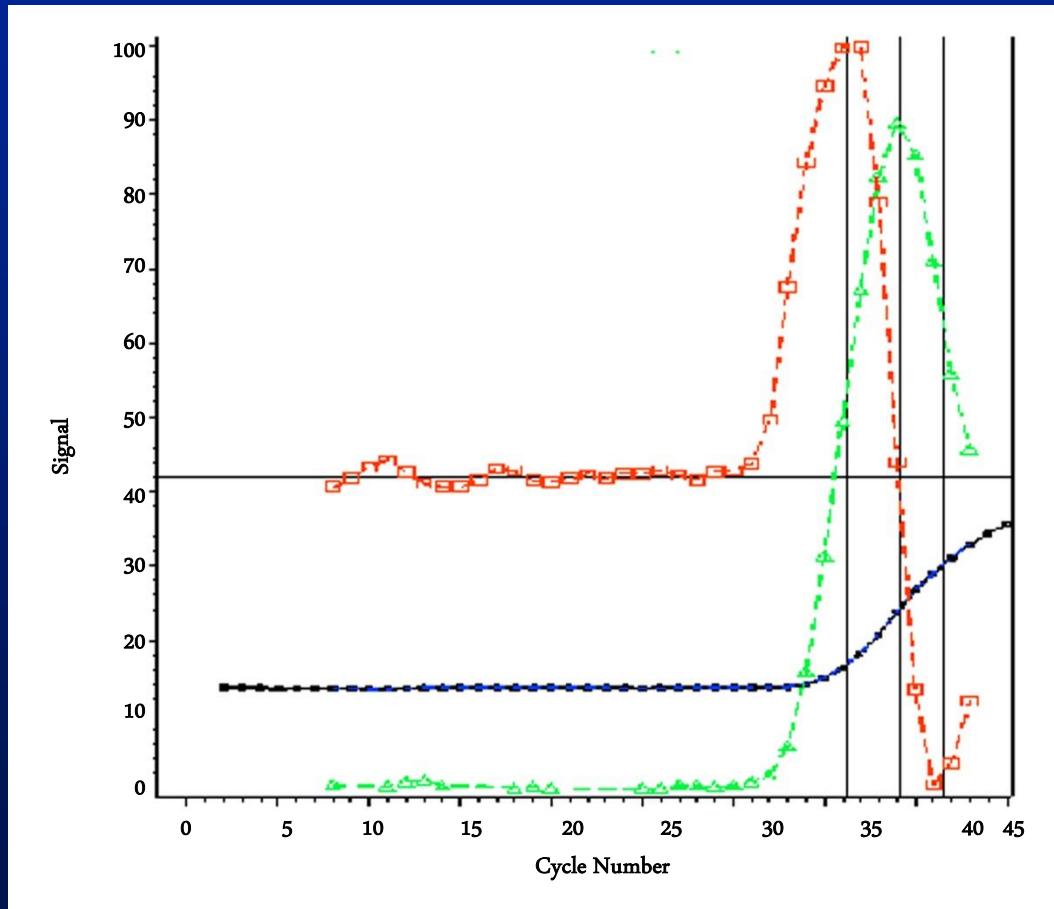
Ο αριθμός των αρχικών μορίων νουκλεϊκού οξέος διπλασιάζεται με κάθε κύκλο PCR με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του προϊόντος σύμφωνα με τη σχέση:

$$P = T (1+E)^n \quad (1)$$

όπου  $P$ , η ποσότητα του προϊόντος,  
 $T$ , η αρχική ποσότητα του DNA στόχου (*target*),  
 $n$ , ο αριθμός των κύκλων της PCR, και  
 $E$ , η μέση απόδοση της αντίδρασης για κάθε κύκλο

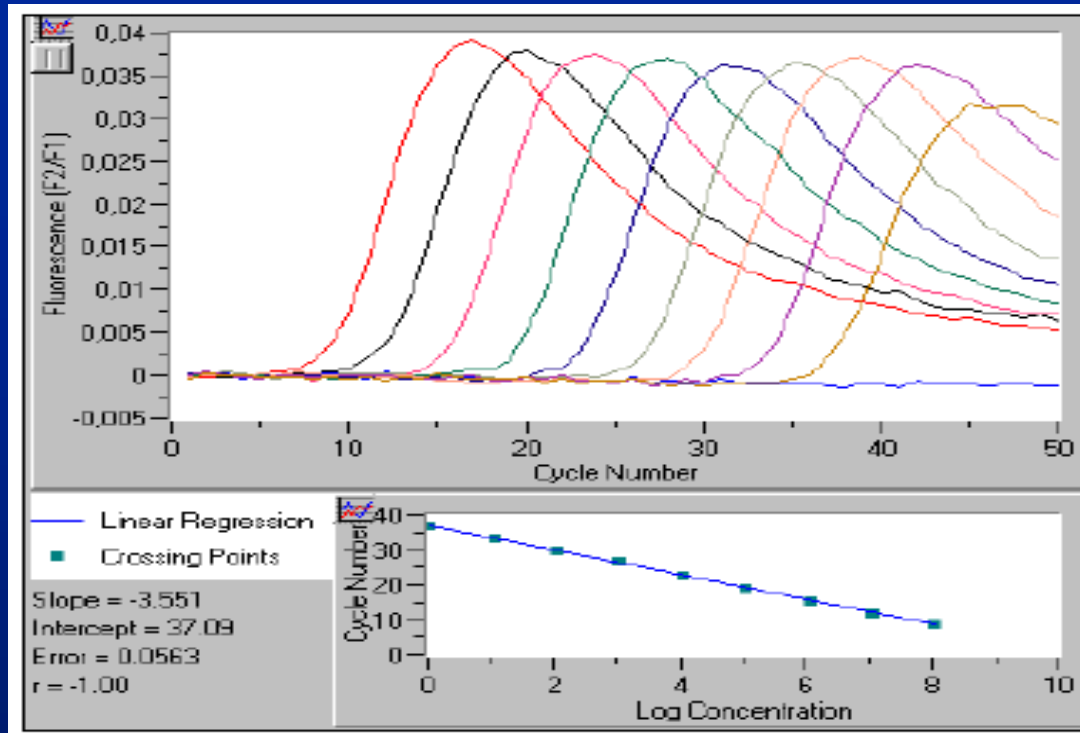
Η ποσοτική PCR προϋποθέτει μία σταθερή και επαναλήψιμη σχέση μεταξύ του αναλυτικού σήματος που λαμβάνεται από το προϊόν της αντίδρασης και της αρχικής ποσότητας του DNA στο δείγμα

# Υπολογισμός του σημείου ποσοτικοποίησης $C_q$ ( $C_q$ quantification) με τη μέθοδο της δευτέρας παράγωγου



- σήμα φθορισμού
- πρώτη παράγωγος
- δεύτερη παράγωγος

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ



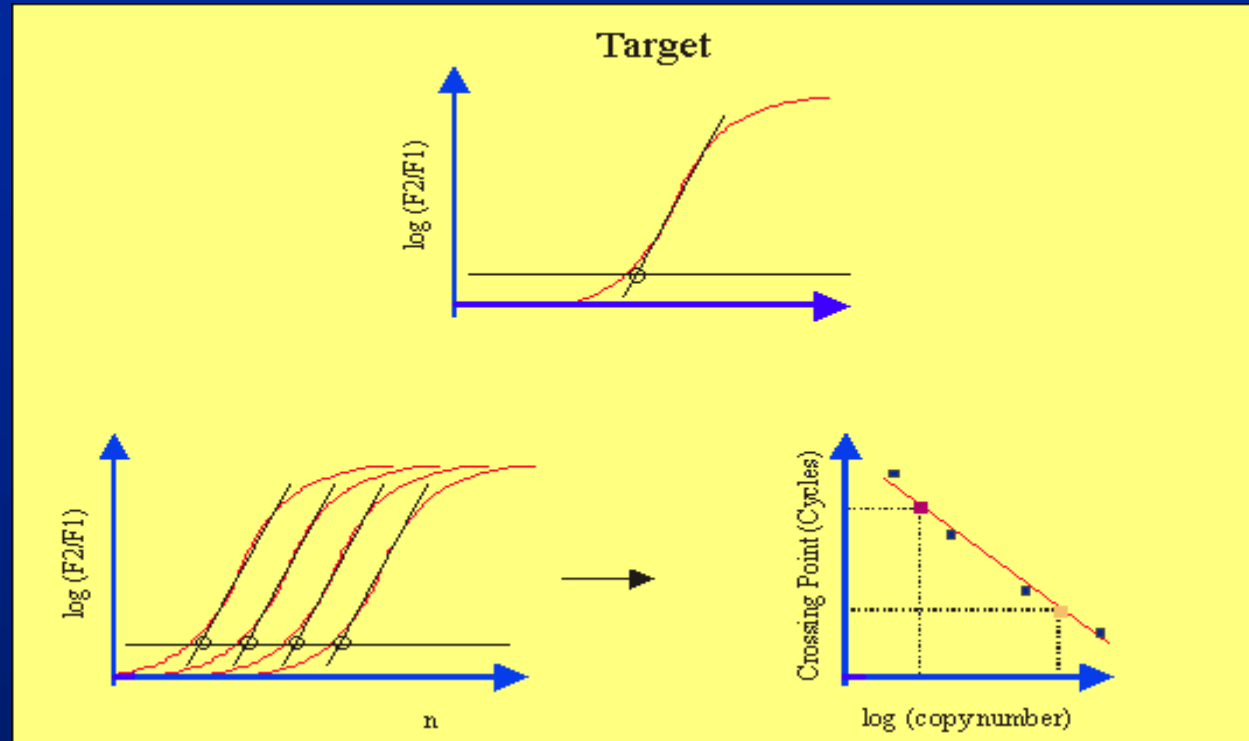
- Το διάγραμμα βαθμονόμησης κατασκευάζεται με γραφική παράσταση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης των προτύπων συναρτήσει του αντίστοιχου  $C_p$ .
- Η απόδοση της PCR δίνεται από τον τύπο:  $E = 10^{-1 / κλίση}$ .
- Ευρεία δυναμική περιοχή:  $1 \times 10^8$  ως  $1 \times 10$  copies/ $\mu$ L.



# ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ (Quantification NOT Quantitation!!!) ΜΕ ΕΞΩΤΕΡΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ

Άγνωστο  
δείγμα

Διάγραμμα  
βαθμονόμησης



- Η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων υπολογίζεται σε αντίγραφα του γονιδίου-στόχου.
- Το πρότυπο είναι εξωτερικό και ομόλογο.
- Ευρεία δυναμική περιοχή.
- Δεν υπάρχει έλεγχος για αναστολείς της PCR που πιθανόν να υπάρχουν στο δείγμα.

# Q-PCR με χρήση εσωτερικών προτύπων

*Εσωτερικά πρότυπα μη ανταγωνιστικού τύπου*

Γονίδια αναφοράς (reference genes), όπως η β-ακτίνη

χρησιμοποιούν διαφορετικούς εκκινητές και υποβάλλονται σε PCR παράλληλα με το δείγμα με το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών

**Απαραίτητη προϋπόθεση:**

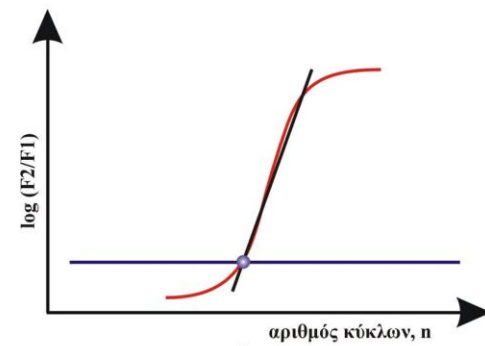
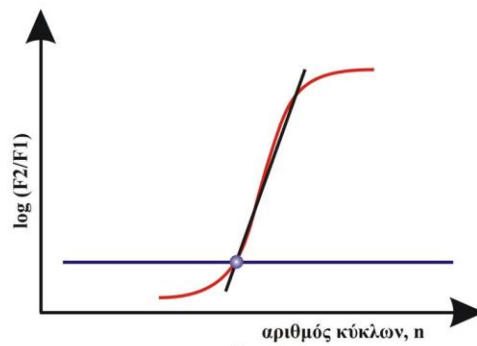
**ταυτόσημο επίπεδο μεταγραφής του mRNA του προτύπου**



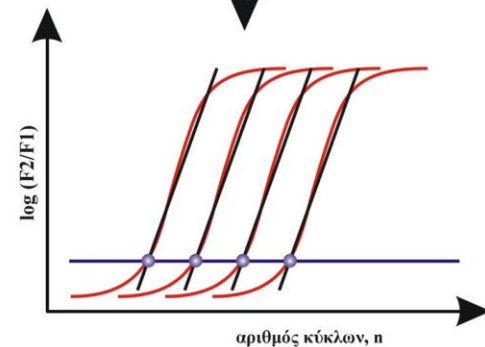
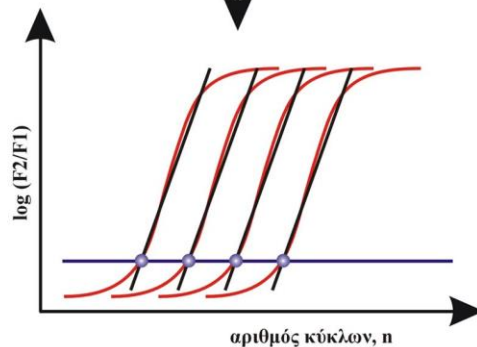
# ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Γονίδιο - Στόχος

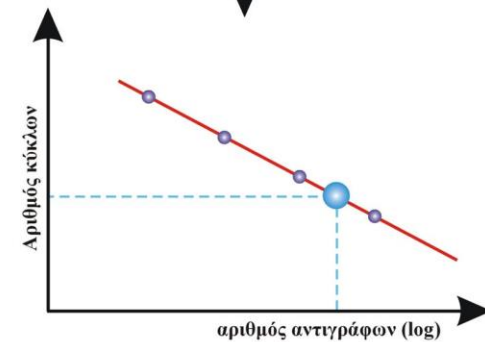
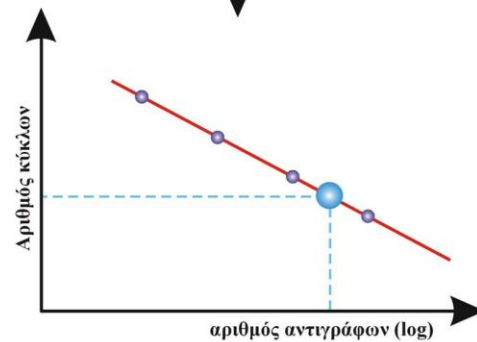
Γονίδιο Βασικής Λειτουργίας



Άγνωστο δείγμα



Διαδοχικές αραιώσεις των προτύπων



Καμπύλη βαθμονόμησης



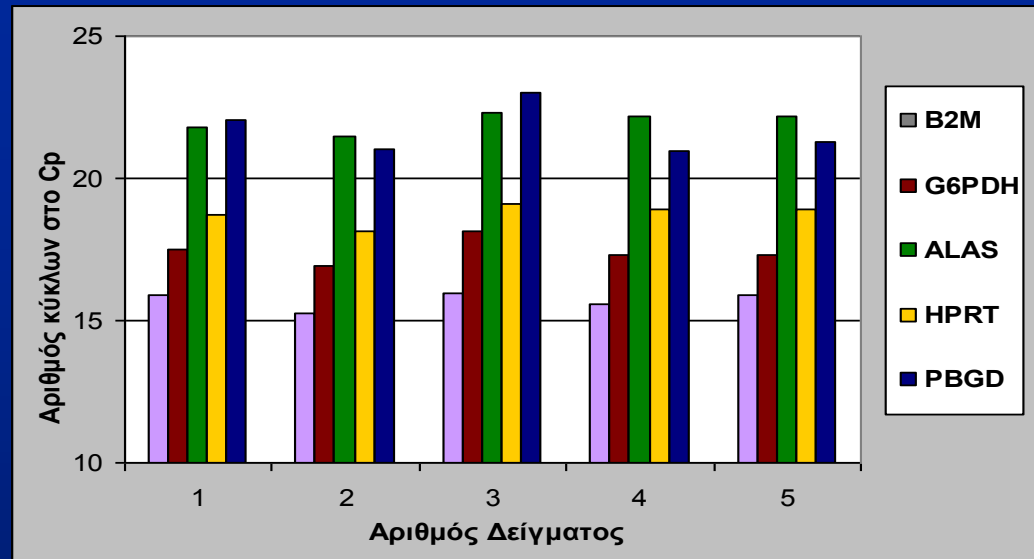
## Η χρήση εσωτερικού προτύπου (γονίδιο αναφοράς) διορθώνει διαφορές που οφείλονται σε :

- Διακυμάνσεις στις αρχικές ποσότητες των δειγμάτων
- Διακυμάνσεις στα ποσοστά ανάκτησης των νουκλεϊκών οξέων
- Πιθανή ποιοτική υποβάθμιση του υλικού του δείγματος
- Διακυμάνσεις στη φόρτωση των δειγμάτων ή σφάλματα πιπεταρίσματος
- Διακυμάνσεις στην απόδοση κατά τη σύνθεση του cDNA (κυμαίνεται από 5% έως 90%)

### Προϋποθέτει :

- Σταθερή έκφραση του γονιδίου αναφοράς
- Να μη διαφέρει η απόδοση στην αντίδραση του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου-αναφοράς

# ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 5 ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ MCF-7 (n=5)



Γονίδιο	B2M	G6PDH	ALAS	HPRT	PBGD
Αριθμός Δειγμάτων (n)	5	5	5	5	5
Μέση τιμή Cp	15,70	17,43	22,00	18,76	21,66
Ελάχιστη τιμή Cp	15,25	16,94	21,47	18,12	20,93
Μέγιστη τιμή Cp	15,93	18,15	22,33	19,11	23,00
Ενδιάμεση τιμή Cp	15,89	17,29	22,19	18,93	21,31
Τυπική Απόκλιση(SD)	0,30	0,45	0,35	0,38	0,87
Επαναληψιμότητα (CV)	1,5	1,9	2,6	2,0	4,0

# qPCR Efficiency

## 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

# Εφαρμογές της ποσοτικής (real time) PCR



- Ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης γονιδίων
- Μέθοδος αναφοράς για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με άλλες μεθόδους (πχ μικροσυστοιχίες)
- Ανάλυση GMOs (genetically modified organisms)
- Ανάλυση Single nucleotide polymorphisms
- Ανάλυση DNA mutations

