

PCR und QPCR



Prinzipien und Anwendungsgebiete der PCR und Real-time QPCR

Dr. Steffen Müller
Sr. Field Application Scientist

Die Entwicklung der Polymerasen-Kettenreaktion

Die PräPCR Ära

Reinigung und Beschreibung der ersten Polymerasen:

- ⇒ 1955 DNA Polymerase I aus *Escherichia coli*
- ⇒ 1970 Klenow Fragment der *E. coli* DNA Polymerase I
- ⇒ 1976 Hitzestabile Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq)

Möglichkeiten der PräPCR Ära:

- ⇒ Aufreinigung von DNA und Analyse (Gel oder Sequenzierung)
- ⇒ Analyse von Restriktionsfragmenten sowie Plasmid basierte Vervielfältigung über Bakterienkulturen (Klonierung)
- Arbeitsintensiv, langwierig, Probleme bei geringen [DNA], Probleme durch Komplexität der DNA



Proceedings of the National Academy of Sciences
Vol. 65, No. 2, pp. 168-175, January 1970

Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from *Escherichia coli* B by Limited Proteolysis*

H. Klenow and I. Henningsen

UNIVERSITETETS BIOKEMISKE INSTITUT B, KØBENHAVN, DENMARK

Communicated by Herman M. Kalckar, November 10, 1969

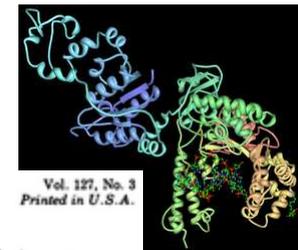
JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Sept. 1976, p. 1550-1557
Copyright © 1976 American Society for Microbiology

Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*

ALICE CHIEN, DAVID B. EDGAR, AND JOHN M. TRELA*

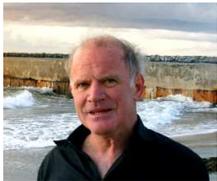
Department of Biological Sciences, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio 45221

Received for publication 12 April 1976



Vol. 127, No. 3
Printed in U.S.A.

Die Entwicklung der Polymerasen-Kettenreaktion



Dr. Kary Mullis
Nobelpreisträger für Chemie 1993

1983:

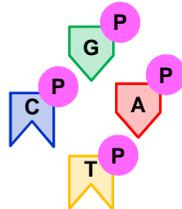
Wie kann man ein unbekanntes Basenpaar im Anschluss an eine bekannte Sequenz bestimmen?



Die Lösung:



E. Coli Polymerase
Klenow Fragment



Radiaktiv markierte
Nukleotide



Primer



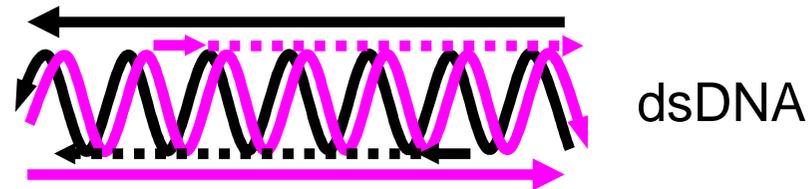
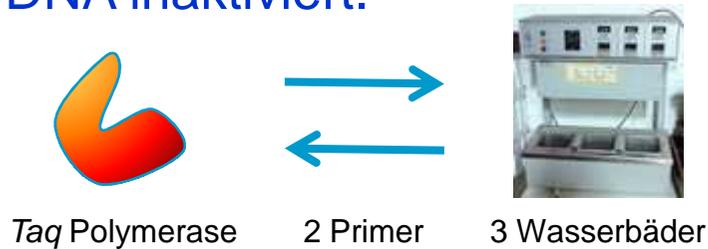
Die Entwicklung der Polymerasen-Kettenreaktion



Was mit einer Base geht muss auch mit mehr gehen:

Problem: Klenow wird beim erneuten Denaturieren der DNA inaktiviert.

Lösung:



RESEARCH ARTICLE

Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia

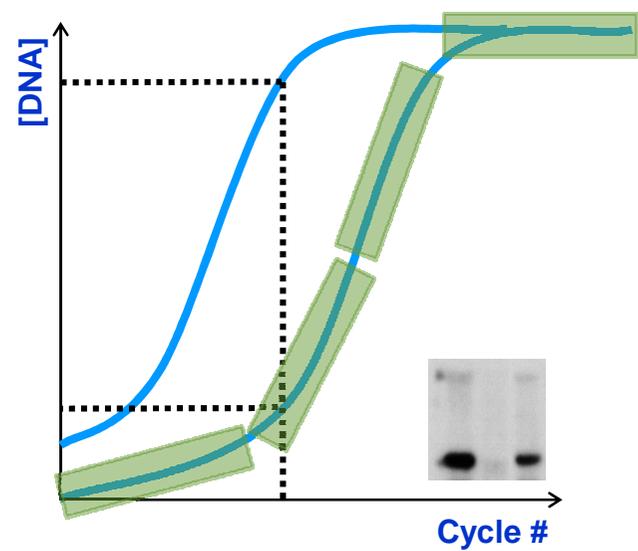
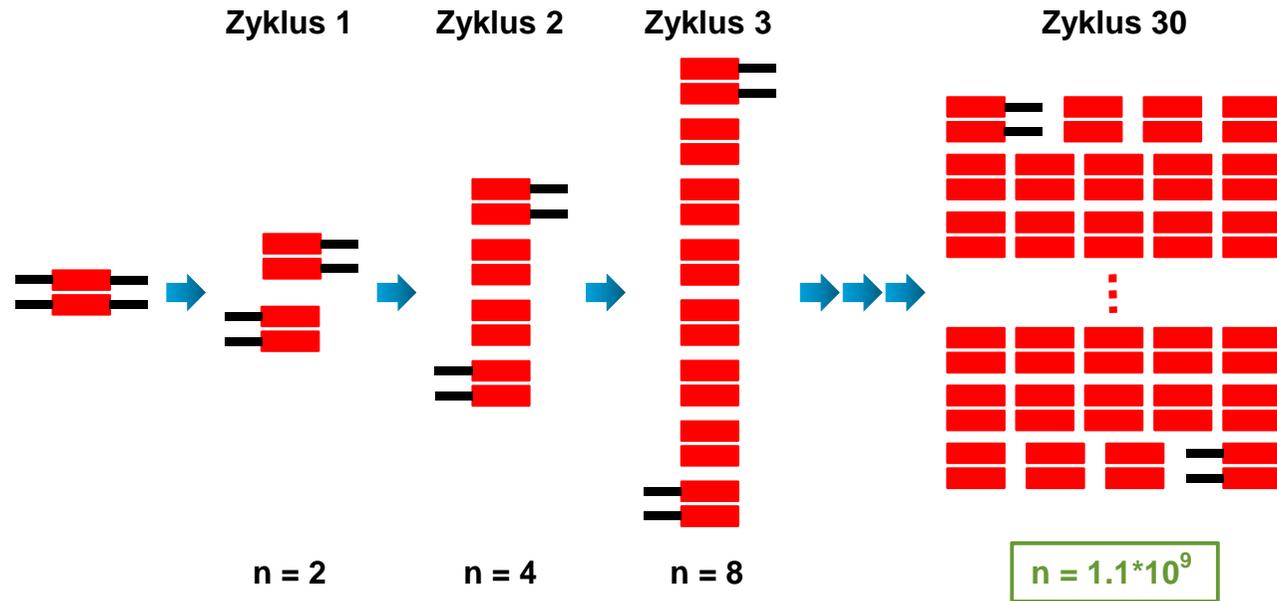
Randall K. Saiki, Stephen Scharf, Fred Faloona, Kary B. Mullis, Glenn T. Horn, Henry A. Erlich, Norman Arnheim

Science 230 (1985)

Elektrothermung



Die PCR – die Grundlagen



Lag Phase: Veränderung [DNA] unterhalb der Detektionsschwelle

Exponentielle Phase: [DNA] verdoppelt sich jeden Zyklus

Limitierte Phase: Einzelne Komponenten der Reaktion limitierend

Plateau Phase: Keine weitere Amplifikation mehr möglich

PCR – Das Tor zu neuen Anwendungen

Die PräPCR
Ära

Die Erfindung der PCR ermöglichte erstmals:

- ⇒ Die zielgerichtete Amplifikation eines Abschnitts der DNA
- ⇒ Arbeiten mit geringsten Ausgangsmengen an Material
- ⇒ Ermöglichte die Sequenzierung im Hochdurchsatz und war somit Wegbereiter für das Humangenom



Die PCR
Ära

PCR ist in der Forschung und vielen Anwendungen heute ein wichtiges Standardverfahren:

- ⇒ Pathogendetektion und Quantifizierung 
- ⇒ Forensik 
- ⇒ Nahrungsmittelanalytik, GVO Detektion 
- ⇒ Forschungsbezogene Anwendungen (z.B. Mutagenese, Detektion von Polymorphismen, Analyse von Genexpression, Sequenzierung, u.v.m.)



Der Anfang



Die Weiterentwicklung

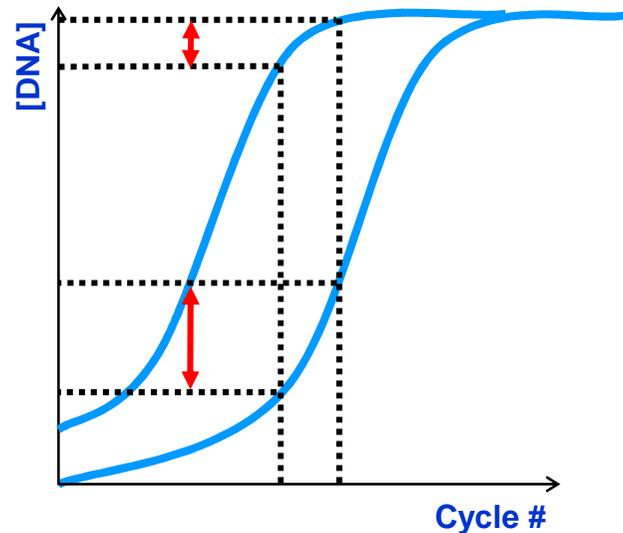


Heute

Die Entwicklung der Real-time QPCR



Die Probleme der traditionellen PCR:



Problem 1:

- ⇒ Keine quantitative Bestimmung möglich:
 - Vergleich von Proben in unterschiedlichen Stadien der PCR
 - Veränderung des Endpunktes resultiert in unterschiedlichen [DNA] Veränderungen

Problem 2:

- ⇒ Zeit bis zum Endresultat
 - Für ein Ergebnis muss bis zum Ende der PCR und der anschließenden Gelauswertung gewartet werden



Die Entwicklung der Real-time QPCR



⇒ 1991 Die Nutzung eines 5'–3' Nukleaseassays zur Detektion von PCR Produkten wird beschrieben:
→ Radioaktiv gelabelte Sonde

⇒ 1992 Higuchi beschreibt Echtzeitdetektion der PCR mittels EtBr

⇒ 1996 Fluoreszenzbasierte Echtzeitdetektion mit Hilfe von doppelgelabelten Sonden
→ Taqman[®]

⇒ Mitte der 90'er Einführung des 1. kommerziellen Real-time PCR Instrumentes

⇒ 2001 erstes QPCR Instrument von Stratagene/Agilent: Mx4000

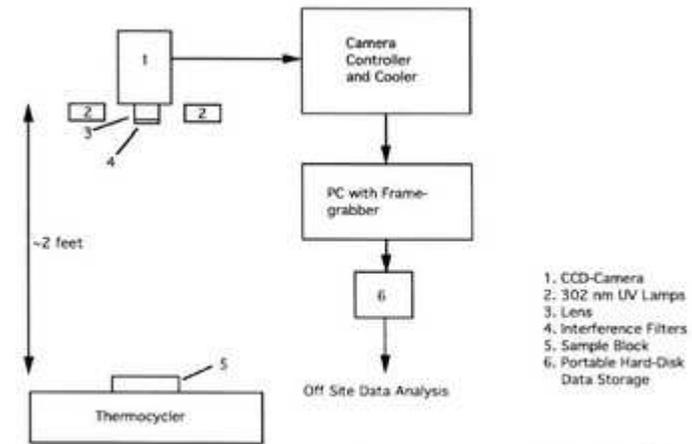


FIGURE 1. Block diagram of video camera system used to monitor amplifications in thermocycler. See Experimental

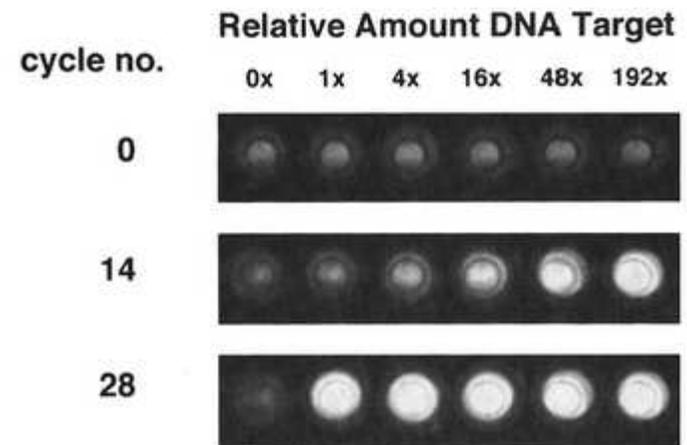


FIGURE 2. Composite of portions of video images taken using the set-up shown in Figure 1. These images are of EtBr-containing PCRs in the thermocycler block (Perkin-Elmer Model

Higuchi et al., Biotechnology 11 (1993)

Real-time QPCR – Die Theorie



⇒ Real-time QPCR benutzt Fluoreszenzfarbstoffe für die Detektion der Amplifikation

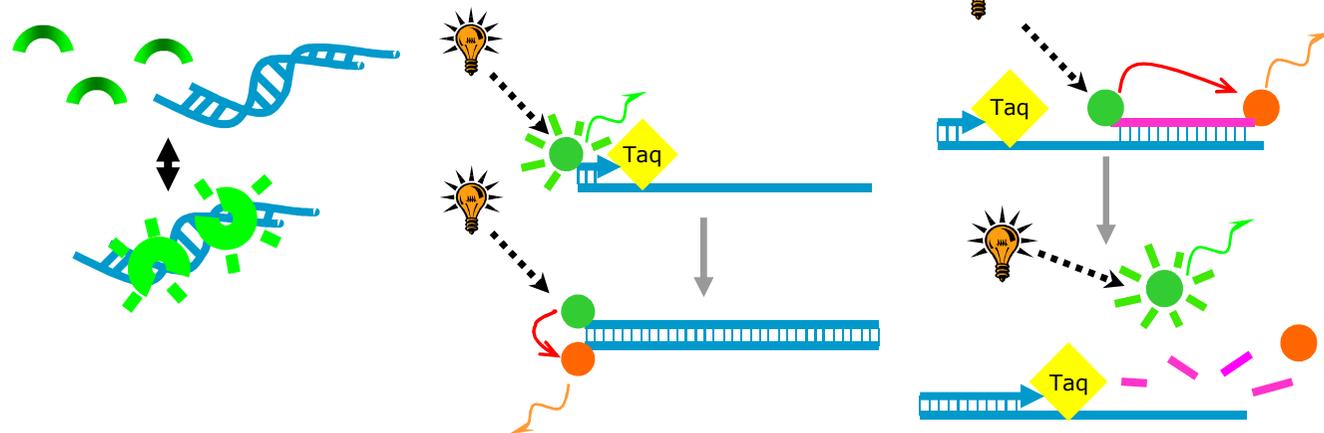
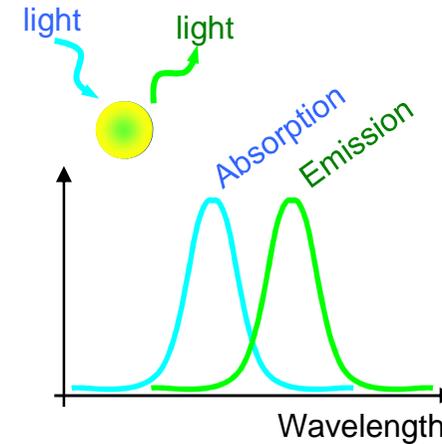
⇒ Detektion erfolgt:

→ **Sequenzunspezifisch:**

DNA bindende Farbstoffe
z.B. SYBR Green[®], EvaGreen[®]

→ **Sequenzspezifisch:**

Gelabelte Primer oder Sonden
z.B. Plexor[™] Chemie, Taqman[®]
Sonden, Molecular Beacons



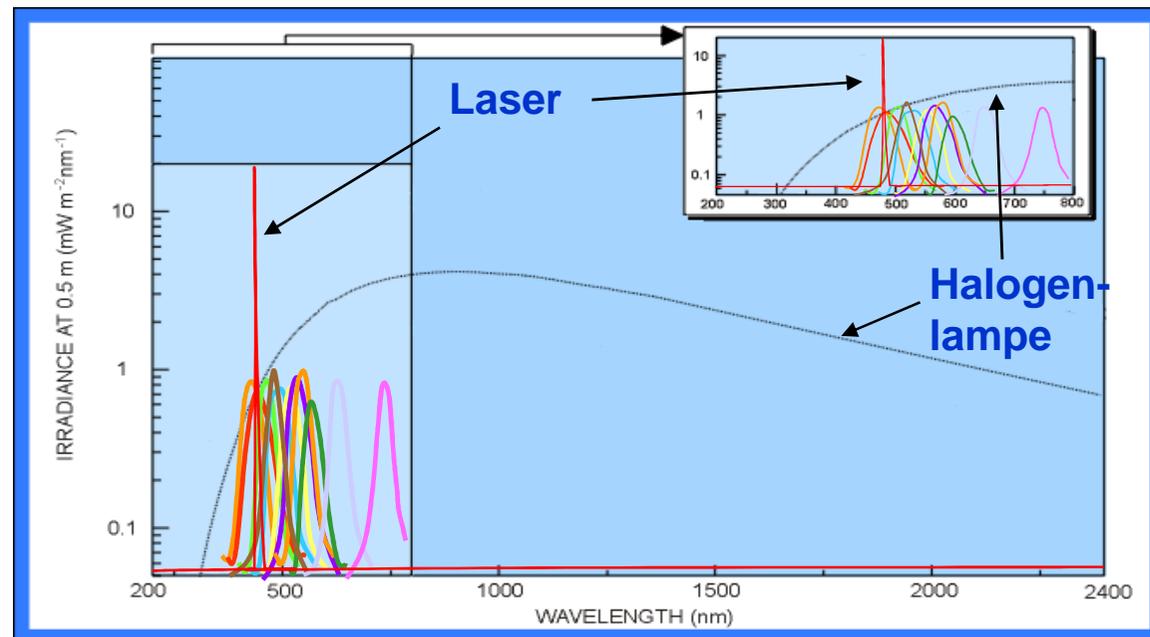
Real-time QPCR – Die Theorie: Anregungstechniken



Der Laser: Hohe Anregungsenergie, monochromatische Lichtquelle, sehr enges Anregungsspektrum
→ Eingeschränkte Farbauswahl

Die Halogenlampe: Breites Anregungsspektrum

Die LED: Eine einzige definierte Wellenlänge
→ Anregung verschiedener Farben erfordert mehrere LEDs



Real-time QPCR – Die Theorie: Messtechniken

Die PräPCR
Ära

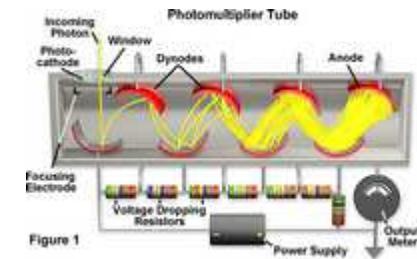
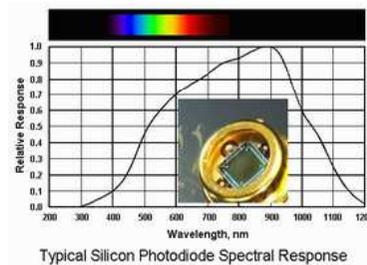
Die PCR
Ära

Die
real-time
QPCR

Die Photodiode: Lichtempfindlicher Halbleiter

CCD Kamera: Array aus Photodioden, Digitalkameraprinzip

Photomultiplier: Signalamplifikation



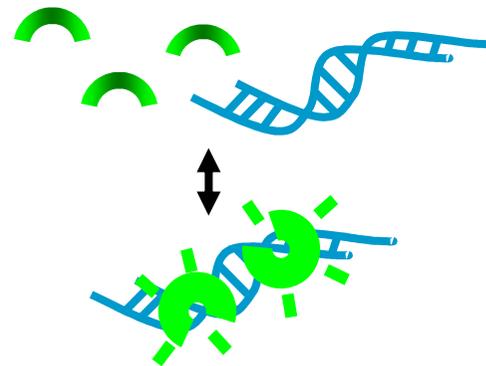
Sensitivität

Real-time QPCR – Die Theorie: SYBR[®] Green



SYBR[®] Green:

- Farbstoff bindet an kleine Furche doppelsträngiger DNA
- Sehr niedrige Fluoreszenz wenn nicht gebunden
- 1000x Fluoreszenzzunahme bei Bindung an DNA
- Sequenz unspezifisch:
Alle doppelsträngigen Moleküle werden detektiert (spezifisches Amplikon, Primer Dimere etc.)



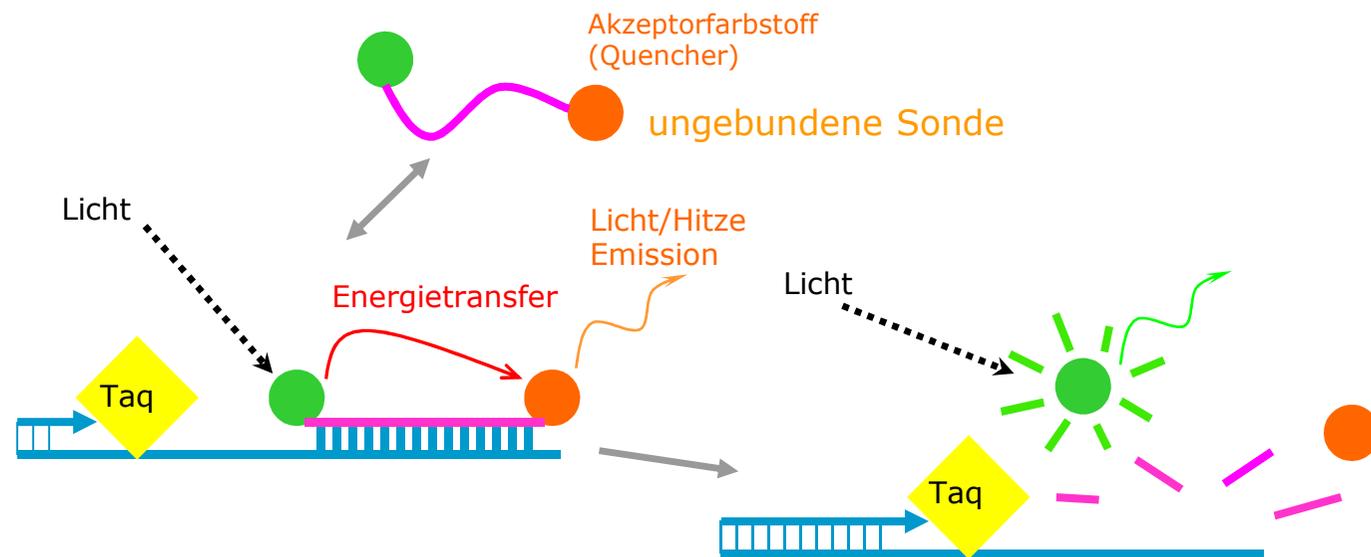
SYBR[®] Green ist eine gute Chemie um mit QPCR zu beginnen, sowie zur Assay Validierung und zum Analysieren von Problemen

Real-time QPCR – Die Theorie: Taqman[®] Chemie



Taqman[®] Chemie:

- Benutzt Exonukleaseaktivität der Taq in Verbindung mit einem zweifach gelabelten Oligonukleotid – Der Sonde.
- Höhere Spezifität: Detektion nur wenn Primer und Sonde auf selbem DNA Strang in enger Nachbarschaft gebunden haben
- Ermöglicht Multiplexing mehrerer Zielsequenzen in der selben Reaktion



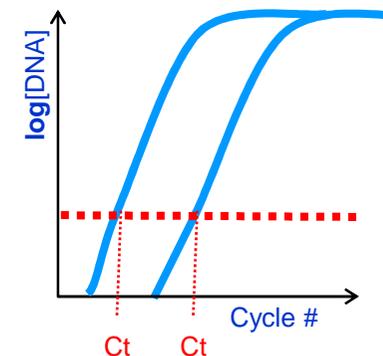
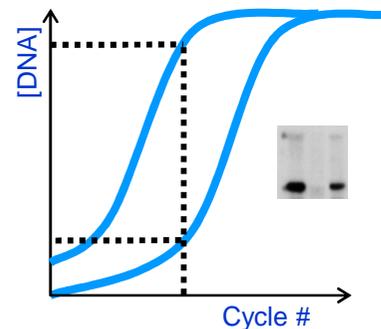
Real-time QPCR – Die Theorie: Threshold und Ct



Größtes Problem traditioneller PCR: Nicht quantitativ, Vergleich von Proben in unterschiedlichen Reaktionsstadien!

Der Threshold – Eine Methode zur Analyse von QPCR Proben:

- Ein **willkürlich** gewähltes Fluoreszenzniveau das den Vergleich der Proben ermöglicht.
 - Saubere Trennung von Signal und Rauschen
 - Ermöglicht Vergleich aller Proben im gleichen Stadium der Reaktion.
- Muss zwingend in der **exponentiellen Phase** sein
 - Ideal wo Plots parallel sind ⇨ Gleiche Reaktionseffizienz
- Muss **relevant in Beziehung auf die Daten** sein:
 - Sollte alle Reaktionen betreffen die Amplifikation zeigen

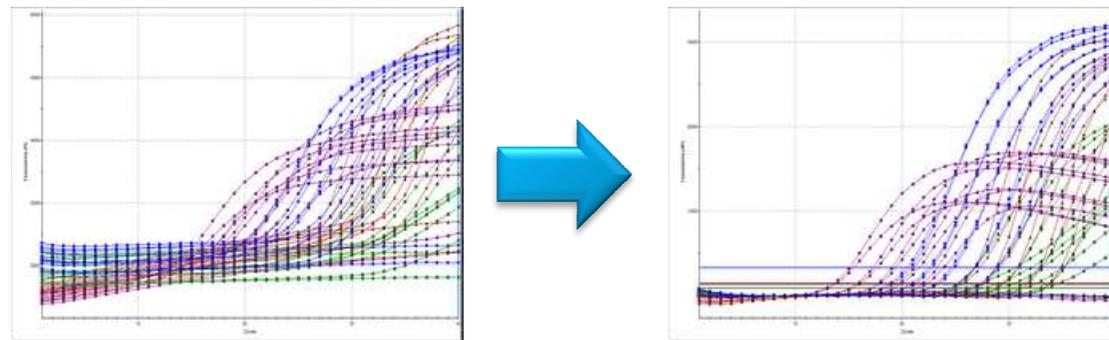


Real-time QPCR – Die Theorie: Hintergrundkorrektur



Baseline Korrektur/Entfernen des Hintergrundsignals:

- ⇒ Hintergrundsignal variiert in verschiedenen Wells und für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe
 - Unterschiede beim Pipettieren des MM oder der Sonden
 - Unterschiede des +/- Signalanteils von Komponenten aus den Proben
 - Unterschiedliche Signalverstärkung und Quantenausbeute der verwendeten Farben
- ⇒ Hintergrundkorrektur ermöglicht in Verbindung mit dem Threshold ein Vergleich von Proben über verschiedene Wells und bessere Analyse des durch die Amplifikation generierten Signals

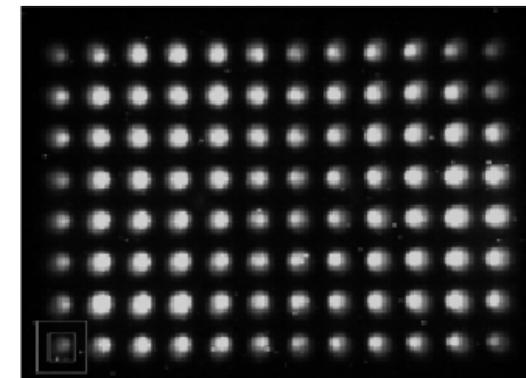
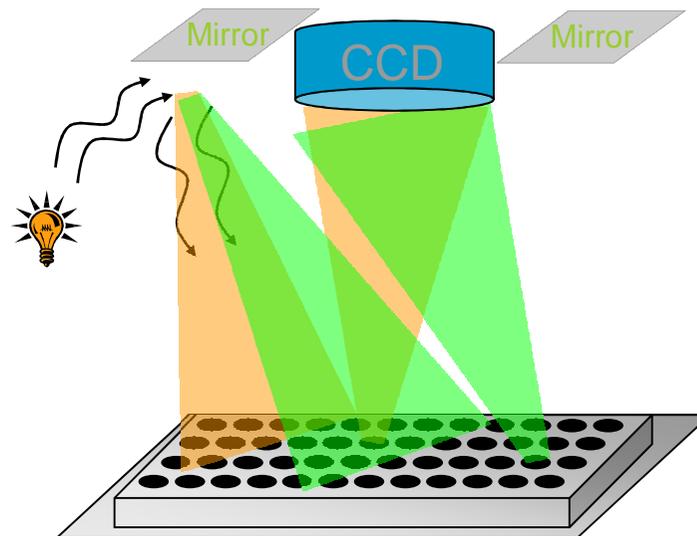


Real-time QPCR – Die Theorie: Referenzfarbstoff



Der Referenzfarbstoff ROX wird hauptsächlich benötigt:

- ⇒ Um für den physikalischen Effekt der winkelabhängigen Intensität auszugleichen
- ⇒ Dieser Effekt tritt bei gleichzeitiger Ausleuchtung bzw. Messung des kompletten Blocks auf.



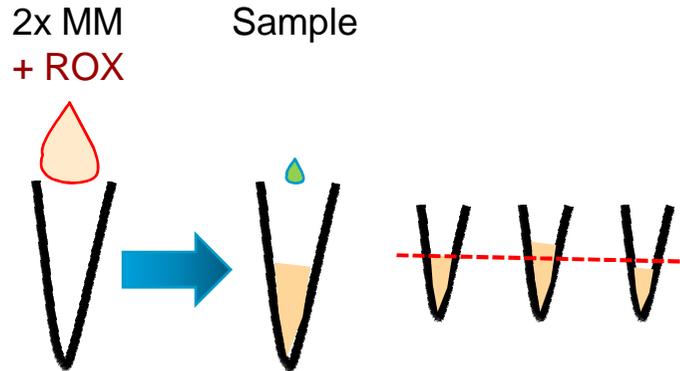
- ⇒ **Kalibrierung erforderlich für jeden einzelnen Kanal und bei Änderungen der Plastikware.**
- ⇒ **ROX zur Normalisierung von Schwankungen des optischen Systems**

Real-time QPCR – Die Theorie: Referenzfarbstoff



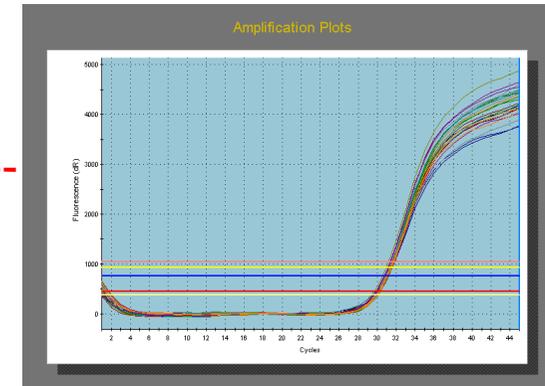
Wobei kann Normalisierung auf ROX helfen:

- ROX erlaubt **Gesamtvolumenunterschiede** zu normalisieren
- Normalisierung auf das ROX-Signal führt zu **niedriger Varianz bei Replikaten**
- ROX-Normalisierung kann zur **Reduktion des Signal-Rausch-Verhältnisses** und zu einer **Verschiebung von Cts** führen



$$dR_n = d \frac{R_{\text{TargetSignal}}}{R_{\text{ROXSignal}}}$$

1000 Kopien: ~~Mit ROX Normalisierung:~~



- <0.016 µM
- 0.016 µM
- 0.031 µM
- 0.063 µM
- 0.125 µM
- 0.25 µM
- 0.5 µM

Standardkurve mit Triplikaten 10⁴ Kopien bis 10 Kopien, 8 unterschiedliche ROX Konz.

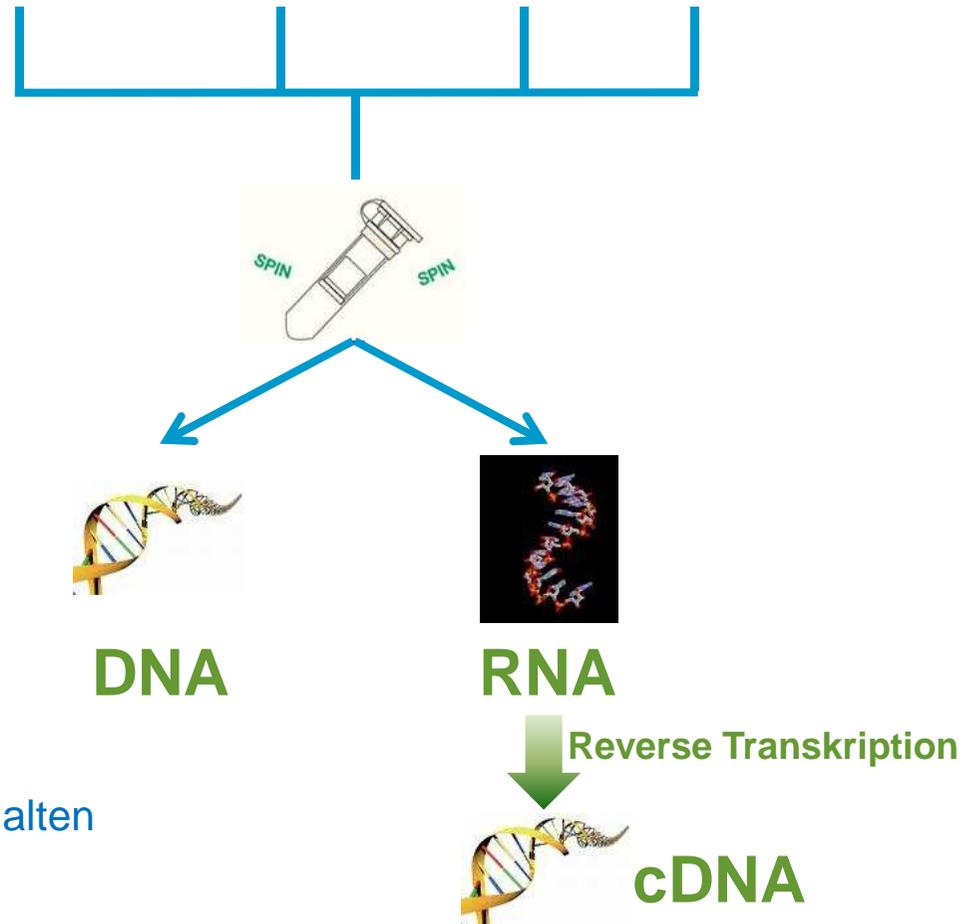
Arbeitsablauf PCR/Real-Time QPCR

Probenaufarbeitung



Probenqualität entscheidet über Erfolg oder Misserfolg der PCR:

- ⇒ Unversehrtheit der DNA/RNA:
Ist Zielregion noch vollständig vorhanden?
- ⇒ Konzentration von PCR Inhibitoren
Inhibitoren behindern PCR Reaktion und können zu falschnegativen Ergebnissen führen
- ⇒ Konzentration von Salzen
Zusätzliche Salze verändern Bindungsverhalten von Primern und Sonden



Arbeitsablauf PCR/Real-Time QPCR

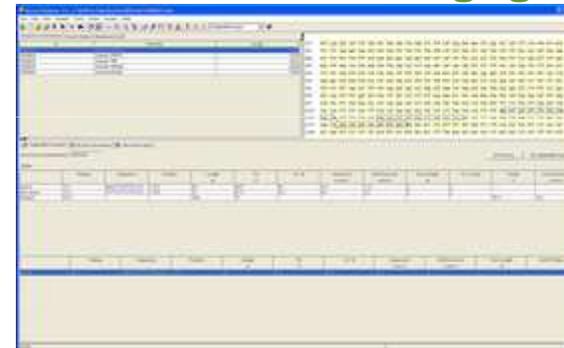
Probenaufarbeitung

Assay Design

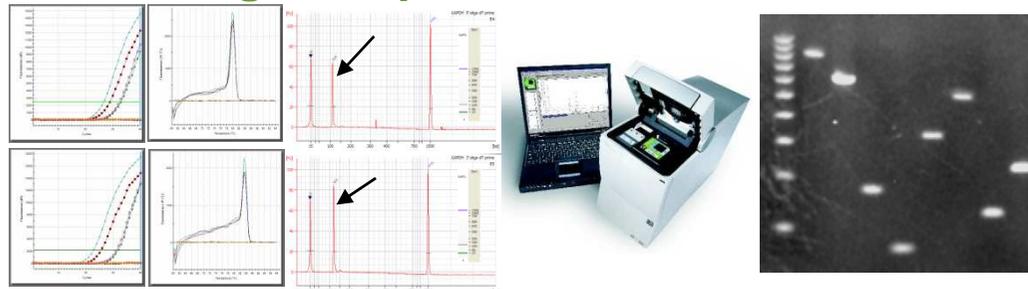
⇒ Suchen der Sequenzinformation in Datenbanken



⇒ Design von Primern und Sonden gegen die Region von Interesse



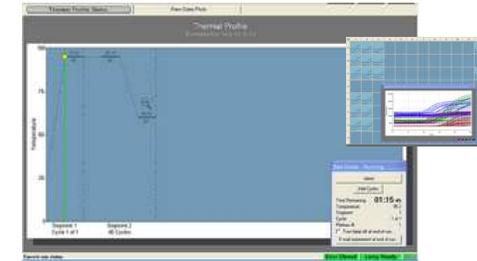
⇒ Validierung der Spezifität von Primer und Sonden



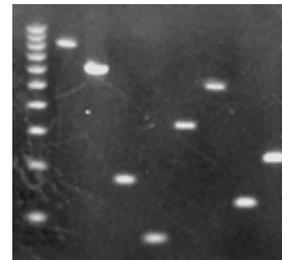
Arbeitsablauf PCR/Real-Time QPCR



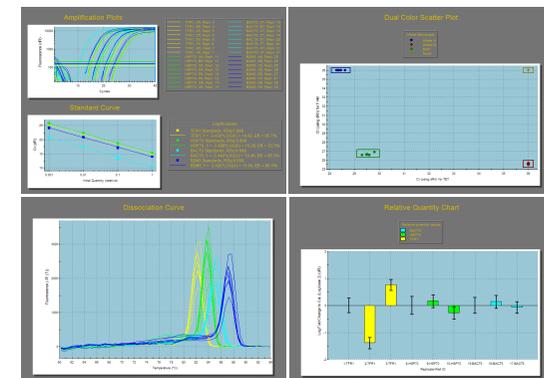
PCR



Real-Time QPCR



Gel Analyse



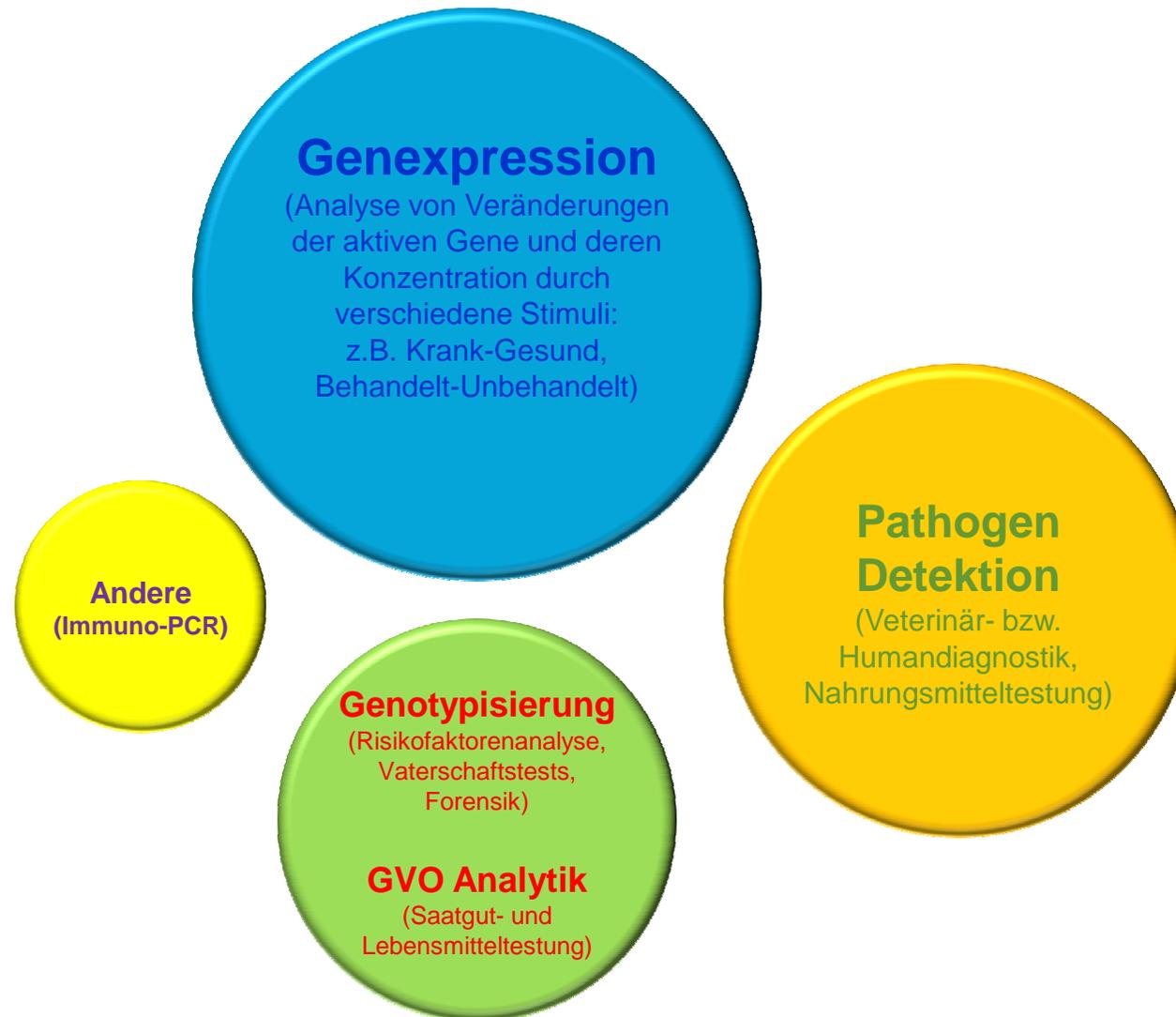
Datenanalyse mit
Gerätesoftware

PCR und QPCR

10 Minuten Pause

Als nächstes:
Anwendungen der PCR

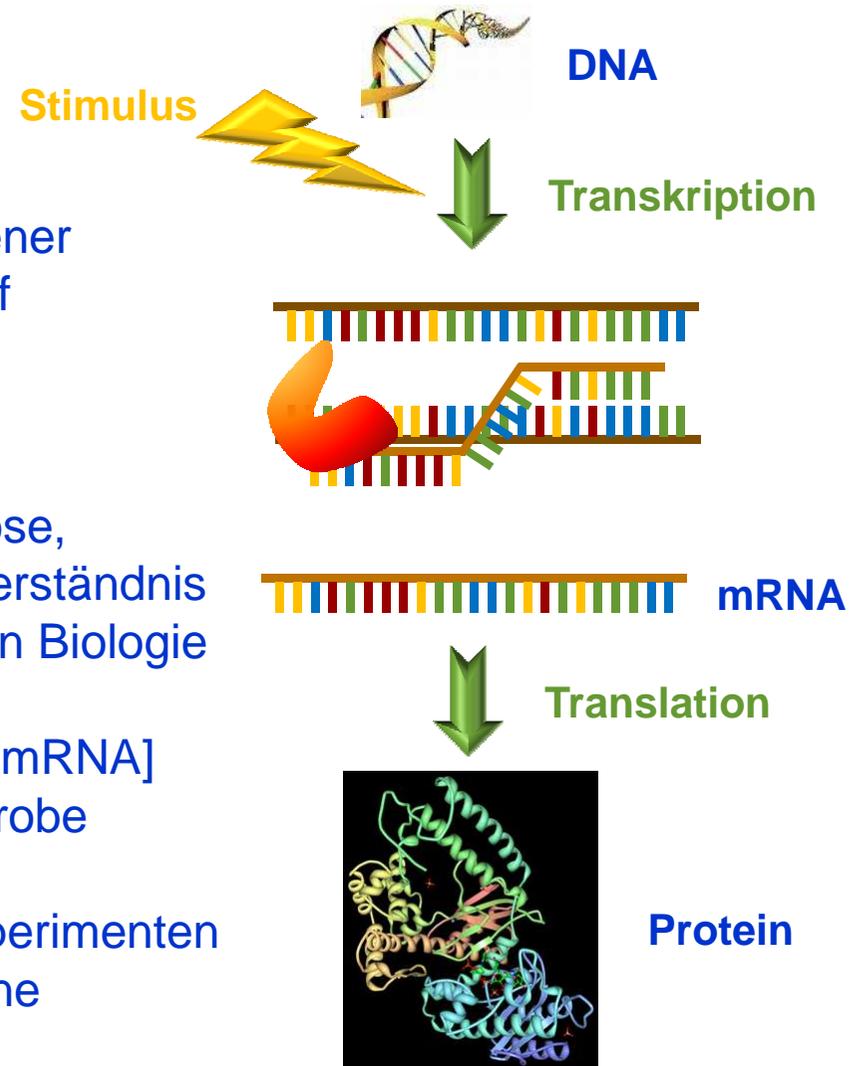
Anwendungen der PCR und QPCR - Beispiele



Anwendungen der PCR und QPCR: Genexpression

Genexpressionsanalyse:

- ⇒ Untersuchung der Auswirkung verschiedener Stimuli (z.B. Krankheit, Medikamente) auf die Menge an RNA eines oder mehrerer Gene
- ⇒ Ziel: Finden von Markergenen zur Prognose, Zielgene/Proteine für Therapieansätze, Verständnis von Prozessen innerhalb einer bestimmten Biologie
- ⇒ In der Regel relative Quantifizierung von [mRNA] Änderungen bezogen auf eine Referenzprobe
- ⇒ QPCR als Validierung von Microarray Experimenten oder für fokussierte Studien einzelner Gene



Anwendungen der PCR und QPCR: Genexpression

Variabilität ist ein Problem bei allen Experimenten....

Unterschiede im Endergebniss aufgrund von....

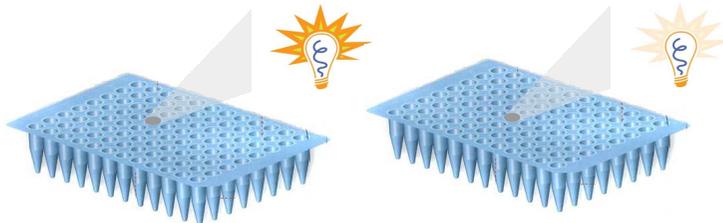
⇒ Unterschiedlichen Ausgangsmengen an RNA/DNA



- Unterschiedliche Ausgangsmengen an Probenmaterial
- Unterschiede bei der Effizienz der Probenaufarbeitung,
- Pipettierfehler
- Unterschiedliche Ausgangsmengen RNA oder cDNA
- Unterschiede bei der RT Effizienz

→ Normalisierung auf eine Referenzsequenz (Referenzgen)

⇒ Lauf-zu-Lauf Unterschiede



- Variabilität in der Hardware
- Variabilität der Plastikware oder Reagenzien
- Variabilität der Analyseinstellungen

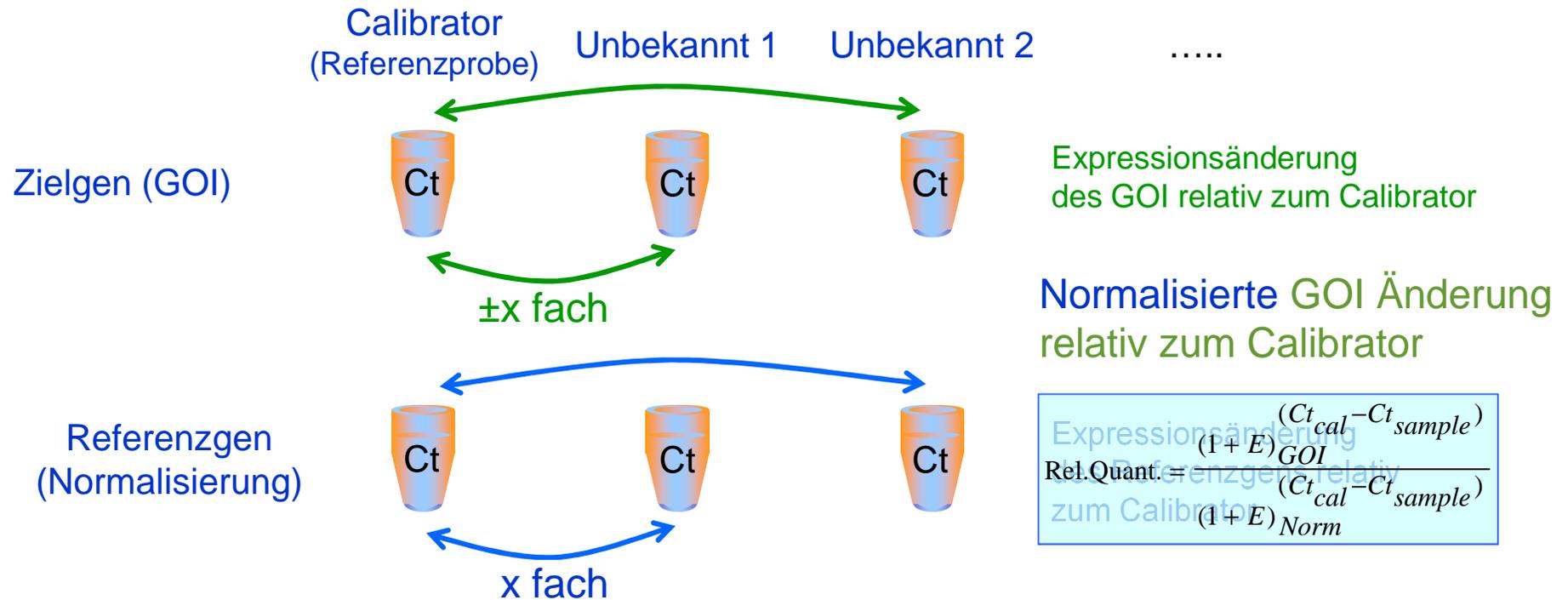
→ Benutzung von Inter-Run-Normalisierung

Interessant ist nur der Unterschied aufgrund von Veränderungen der Genexpression!

Anwendungen der PCR und QPCR: Genexpression

Vergleich von 2 unterschiedlichen Proben:

Welcher Unterschied existiert in der Expression eines Gens?



Setzt Vergleichbarkeit von Referenzprobe und Unbekannten voraus!

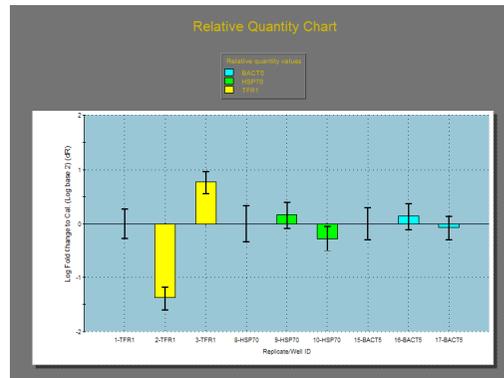
Referenzprobe häufig Probe am Rand der Datenpopulation (Unbehandelte Kontrolle, Nullzeitpunkt, o.ä.). **Besser:** Probe aus der Mitte der Datenpopulation:

→ geringere Varianz der Ergebnisse

Anwendungen der PCR und QPCR: Genexpression



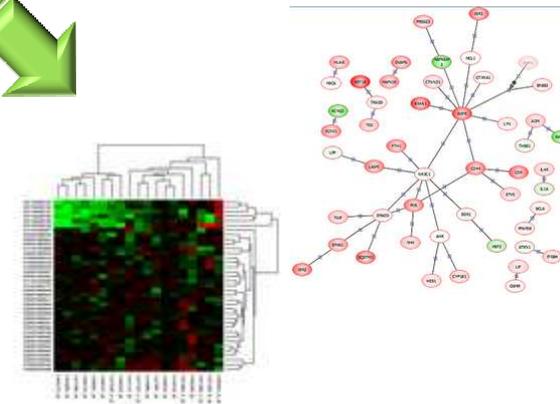
Globale oder fokussierte Studie der Genexpression über Microarrays oder QPCR



Analyse der Quantitativen Daten. Messung des Ausmaßes der Veränderung



Verständnis größerer Zusammenhänge
→ Systembiologie



Anwendungen der PCR und QPCR: Pathogene

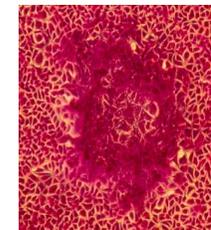
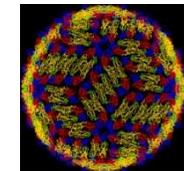
Pathogendetektion:

- ⇒ Nachweis von Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten) in Tier oder Mensch
→ Veterinär- und Humandiagnostik

- ⇒ Nachweis von Pathogenen in Lebensmitteln
→ Produktionskontrolle, Gesundheitsämter

- ⇒ Bioterrorismusabwehr

- QPCR zum sensitiven und spezifischen Nachweis von Pathogenen
 - Präsenz von Pathogenen (+/-)
 - Subtypisierung
 - Quantifizierung über weiten dynamischen Bereich
 - Multiplexdetektion mehrerer Keime

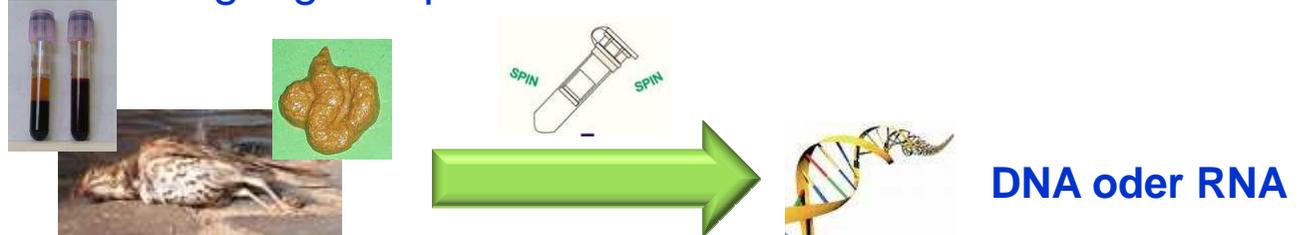


Anwendungen der PCR und QPCR: Pathogene

**Herausforderungen
&
Assay Design**

Probenaufarbeitung:

- ⇒ Oft schwierige Probenmatrix (Boden, Blut, Stuhl, o.ä.)
- ⇒ Limitierende Probenmenge
- ⇒ Abreinigung von potentiellen PCR Inhibitoren



→ **Optimierung auf Ausbeute, Qualität und geringe [Inhibitoren]**

Experiment und Assay Design:

- ⇒ Höchste Spezifität und Sensitivität sind kritische Faktoren
- ⇒ Vermeiden von möglichen falschpositiven oder –negativen Proben – Verwendung interner Positivkontrollen (IPC)

→ **Vergleich von Sequenzen vieler Isolate, Serotypen und verwandter Arten um spezifische Regionen zu finden**



Matero P. et al., 2009

Anwendungen der PCR und QPCR: Pathogene

Herausforderungen
&
Assay Design

Validierung
&
Optimierung

Assay Validierung:

- ⇒ Testen der Oligos gegen verschiedene Isolate und verwandte/nicht verwandte Stämme
→ **Spezifität**
- ⇒ Bestimmung des linearen dynamischen Bereichs
- ⇒ Bestimmung des Detektionslimits
→ **Sensitivität**
- ⇒ Bestimmung der Varianz zwischen verschiedenen Positionen auf der Platte und verschiedenen Läufen
- ⇒ Validierung der Präzision der Quantifizierung mit bekannten Konzentrationen
→ **Reproduzierbarkeit**

Assay Optimierung:

- ⇒ Verschiedene Stufen der Optimierung möglich:

Probenaufarbeitung:
Ausbeute & Qualität

Primer & Sonden:
Titration der Oligos
→ höhere Affinität

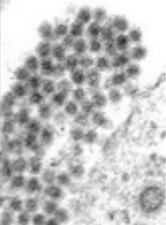
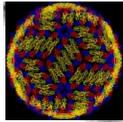
Optimierung des
Thermoprofils

- ⇒ Ziel immer >Spezifität, >Sensitivität, >dyn. Bereich, Schnellere Resultate

Anwendungen der PCR und QPCR: Pathogene

Dengue Fieber:

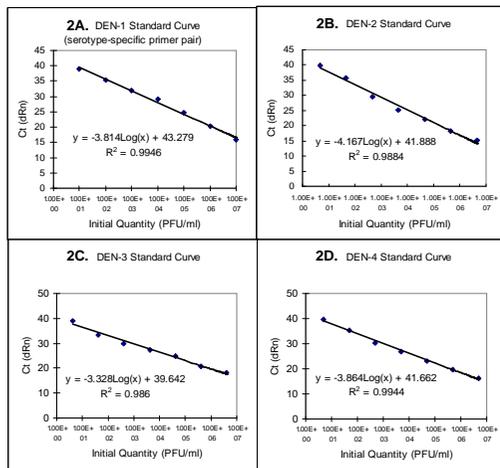
- ⇒ RNA Virus aus der Gruppe der Flaviviren (Westnilvirus, Japanische Enzephalitis, u.a.)
- ⇒ ~50 Mio. Fälle pro Jahr, 500K davon mit der gefährlichen Ausprägung Hämorrhagisches Fieber oder Dengue Schocksyndrom



CDC, Atlanta



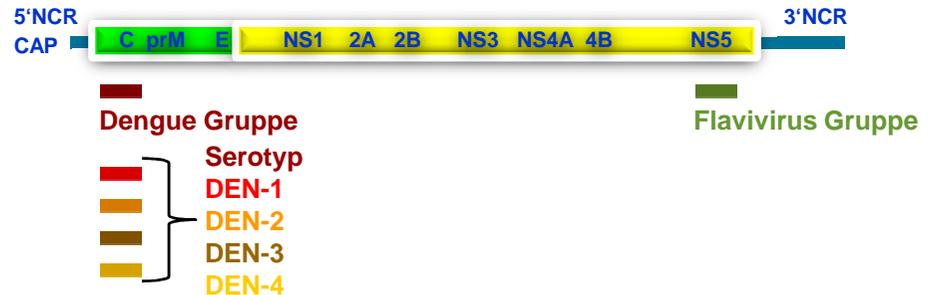
CDC Atlanta, Dengue Risikogebiete 2008



CDC Taiwan: (Shu P.-Y. et al., J. Clin. Microbiol. 2003)

- Standard Diagnose über Nachweis von Antikörpern per ELISA
 → langwierig, erst nach mehreren Tagen möglich
- Etablierung eines QPCR Assays zum Nachweis von Flaviviren deren Subtypisierung und Feststellen der Dengue Serotypen

Flavivirus Genom



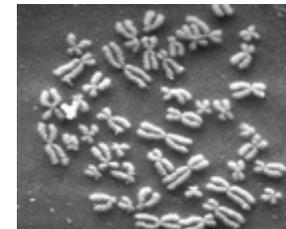
	No. of confirmed cases	Virus isolation	Group-specific primer pair
Total	193	129 (67%)	160 (83%)

Anwendungen der PCR und QPCR: Genotyping

Genotypisierung:

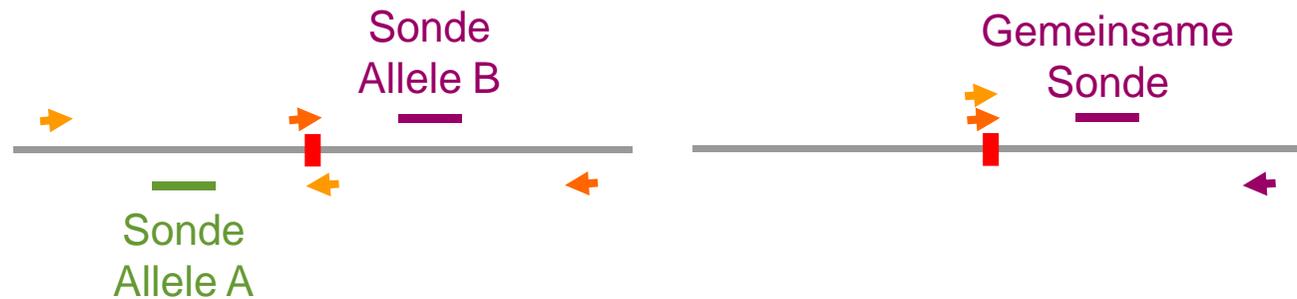


- ⇒ Nachweis von Polymorphismen wie Basenaustauschen (SNPs), Längenunterschiede von Mikrosatelliten, Verlust oder Vervielfältigung bzw. Translokation von Regionen auf der gDNA
- ⇒ Assoziation bestimmter Polymorphismen mit verschiedenen Krankheiten bekannt
- ⇒ Anwendung für Vaterschaftsanalysen, in der Züchtungsforschung



Anwendungen der PCR und QPCR: Genotyping

Allelespezifische PCR



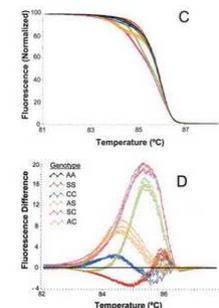
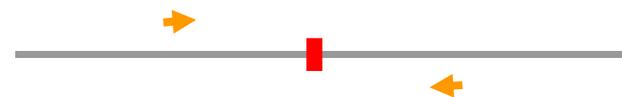
→ Getrennter Ansatz, kann mit Schmelzkurvenanalyse verbunden werden

Allele-diskriminierung über Sonde



→ Gemeinsames Primerset
→ Hohe Spezifität
→ Möglichkeit zum Multiplexen

Schmelzkurvenanalyse (HRM)



→ Gemeinsamer Primerset
→ Sehr schwierig zu Optimieren
→ Optimal mit sehr kleinen Amplikons

Anwendungen der PCR und QPCR: GVO Analyse

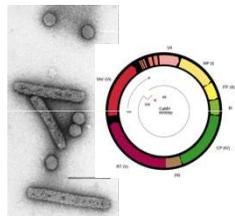
Nachweis Genetisch Veränderter Organismen (GVO):



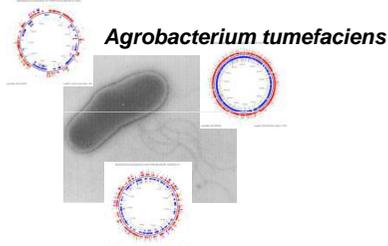
⇒ Nachweis von GVO Anteilen in Nahrungsmitteln

→ EU: Kennzeichnungspflicht wenn mehr als 0.9% erlaubter GVO (0.5% nicht erlaubter GVO)

⇒ Test auf das Transgen (z.B. Resistenz), auf Sequenzen spezifisch für die Pflanze und Sequenzen aus den benutzten Vektoren (Blumenkohlmosaikvirus oder Agrobacterium)



Blumenkohlmosaikvirus

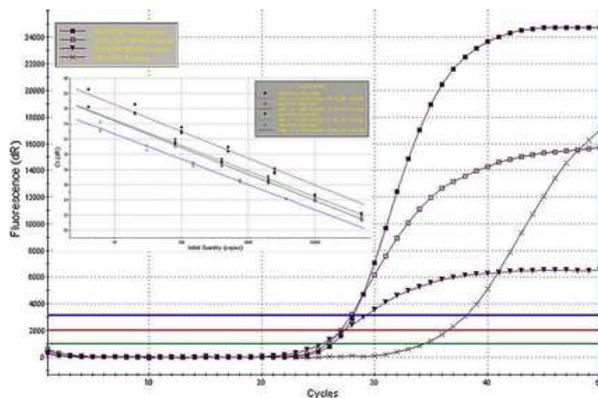


Agrobacterium tumefaciens

Multiplex Nachweis von Mais und Soja Referenzgenen und Vektor Sequenzen:

⇒ Screening von Nahrungsmittelproben für die in der EU am häufigsten auftretenden Vektoren und Pflanzen

⇒ Positives Ergebnis zeigt genet. Veränderung an und Pflanzenart (Mais oder Soja)



Gaudron et al., Eur. Food Res. Technol. 229 (2009)

QPCR: Assay Design Richtlinien

Amplikon

Amplikonlänge beeinflusst Assayperformance:

- Für QPCR Amplikonlänge von 70 – 300 bp optimal
- Genotypisierung mit QPCR: Sehr kleine Amplikons (70 – 150 bp)

Primer/Sonden

Vermeiden langer Primer (> 25 bp) oder Sonden (>30 bp):

Erhöht Spezifität und vermeidet partielle Bindung bzw. Dimere

Vermeiden von Regionen mit starker Sekundärstruktur:

Affinität zur Zielsequenz niedrig in Bereichen mit Sekundärstruktur

Alignment (BLAST) aller Oligos

Spezifität ist einer der Schlüssel für effiziente PCR/QPCR

Primer

Design mit Tm von 60°C und einer Tm Differenz < 2°C

Reduziert Wahrscheinlichkeit von Primerdimeren, Erhöht Spezifität/Effizienz

Für Genexpression: Design von Primern über Exon-Grenzen:

Vermeidet Amplifikation von genomischer DNA

Allelespezifische PCR: SNP sollte zum 3' Ende positioniert sein:

Erhöht Spezifität und verbessert Diskriminierungseigenschaften

Sonden

Taqman Sonden nahe beim Primer des selben Stranges:

- 4 – 15 bp Distanz zwischen 3' Ende des Primers und 5' Ende der Sonde.

Tm der Sonde muss größer als der der Primer sein:

- 5 – 10°C höher ermöglicht Binden der Sonde vor Prim er

QPCR: Multiplexing



Sondenbasierte Detektionstechniken ermöglichen Multiplexing:

⇒ Multiplexing – Nachweis mehrerer Sequenzen in der selben Reaktion



⇒ Erhöht Durchsatz: Analyse von mehr Zielsequenzen mit mehr Proben

⇒ Erhöht Zahl der Tests mit limitierenden Proben

⇒ Robustere Ergebnisse durch Nachweis mehrerer Zielsequenzen wie z.B. IPC oder Referenzgen in der selben Reaktion

QPCR: Multiplexing



Erfolgreiches Multiplexen startet beim Assaydesign:

Amplikon

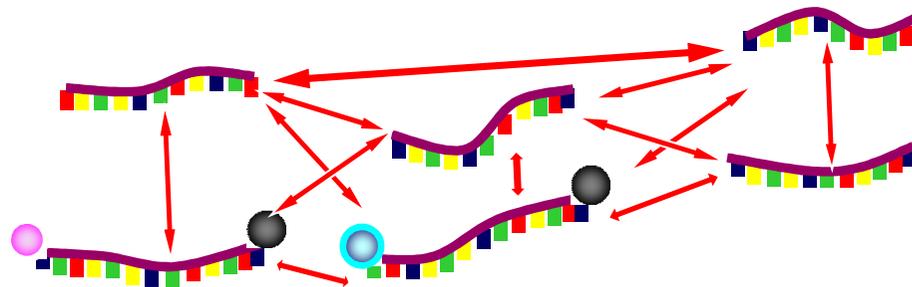
Kompetition vermeiden:

- Ähnliche Amplikonlänge (± 10 bp) und GC-Gehalt ($\pm 2\%$)

Primer/Sonden

Kompetition vermeiden:

- Primersets und Sonden sollten Schmelzpunkte mit wenig Abweichung haben (max. 1°C)
- Einzelassays sollten vorher individuell auf maximale Leistung optimiert worden sein
- Nur solche Assays kombinieren die ähnliche Effizienzen haben ($\pm 3\%$)

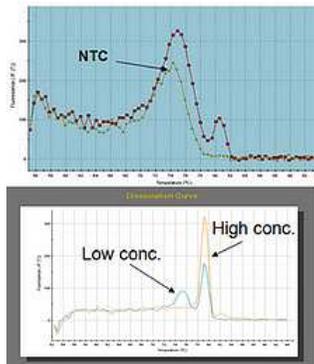


QPCR Troubleshooting

Die Lösung von Assayproblemen ist nur mit Hilfe der notwendigen Kontrollen möglich!

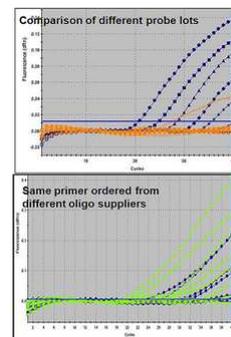
- ⇒ No Template Kontrolle – Kontamination von Oligos, Reagenzien oder Pipetten
- ⇒ No RT Kontrolle – Kontamination mit genomischer DNA
- ⇒ Interne Postivkontrolle (IPC) – Inhibition
- ⇒ Optional: Negative Probe – Unspezifische Bindung von Primer/Sonde

Primer Dimere



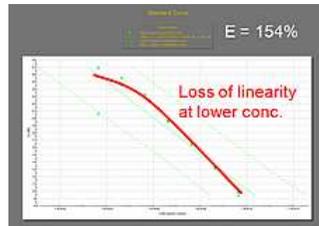
- ⇒ Nur in SYBR Green sichtbar, Schmelzpunkt 72°C-78°C
- ⇒ Führen zu Kompetition innerhalb der Reaktion
→ Verhindert Amplifikation der spezifischen Ziel-DNA
- ⇒ Lösung: Richtiges Primerdesign und Optimierung der Affinität zum Template durch Matrixtitration

Neue Primer/Sonden

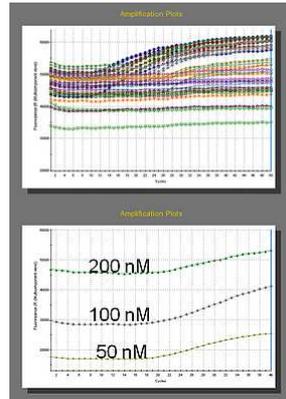


- ⇒ Neue Chargen von Oligos können zu Veränderungen der Assayleistung führen
- ⇒ Neue Primer/Sonden sollten vor Ende der existierenden Charge bestellt werden
- ⇒ Qualitätskontrolle der neuen Oligos gegen alte Oligos mit Hilfe einer Positivkontrolle

QPCR Troubleshooting



- ⇒ Eigenschaften eines guten Assays:
Effizienz: <80% 80-90% **90 -100%** 100-110 >110%
Korrelationskoeffizient $R^2 > 0.98$
- ⇒ **Niedrige Effizienz:** Inhibition, niedrige Affinität von Primern/Sonde, Variabilität/Verlust der Linearität bei hohen Konzentrationen der Standardkurve
- ⇒ **Hohe Effizienzen:** Amplifikation von mehr als einem Produkt, Template-unabhängige Sondendegradation, Variabilität/Verlust der Linearität bei niedrigen Konzentrationen der Standardkurve



- ⇒ Zuviel SYBR Green und/oder zu viel Template
- ⇒ Quencher passt nicht zum Reporterfarbstoff
- ⇒ Sondenkonzentration zu hoch
- ⇒ Freier Farbstoff in der Reaktion/Sonde degradiert
- ⇒ Komponenten der Probe die Eigenfluoreszenz haben
- ⇒ Keine optisch klare Folie/Deckel

Anwendungen der PCR und QPCR

Vielseitige Technologie:

Sensitive Detektion und Quantifizierung von DNA/RNA

- Pathogen Detektion
- GVO Analytik
- Qualitätskontrolle
- Forensik

Genexpressionsanalyse

- Validierung von Microarrays
- Fokussierte Studien einzelner Gene
- ChIP
- Kopienzahlvarianten
- miRNA Detektion

Detektion von Sequenzvarianten

- SNP Detektion/ Alleldiskriminierung
- Methylierung/ Epigenetik

Neue Techniken (keine DNA/RNA Ziele)

- Immuno-PCR: Detektion von Protein durch PCR

PCR und QPCR

10 Minuten Pause

Als nächstes:
**Vorstellung der
Agilent Geräteplattform**

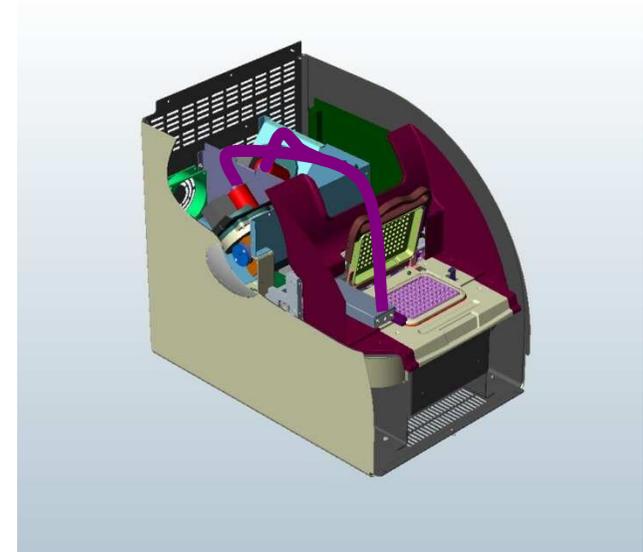


Agilent Real-Time QPCR Lösungen - Überblick

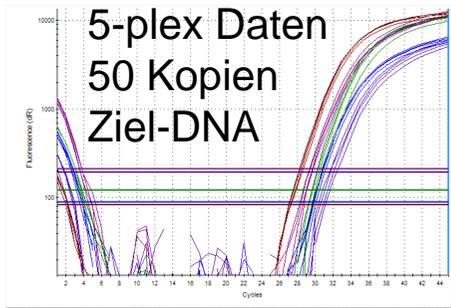


- Mehr als 8 Jahre Erfahrung mit Real-Time QPCR Instrumentierung
- Größtmögliche Flexibilität: Konfiguration des optischen Systems (Filter) nach Kundenwünschen

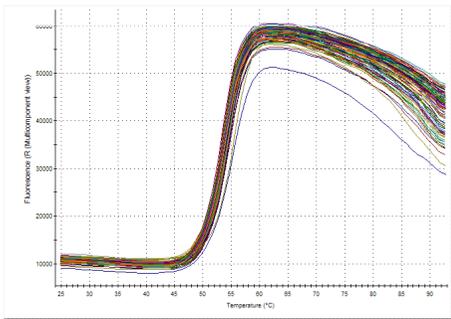
- Halogenlampen basierte Anregung
- Scanning Optisches Design: Keine Positionseffekte
- 4 Kanäle (Mx3000P™) oder 5 Kanäle (Mx3005P™)
- Photomultiplier erlaubt sensitive Fluoreszenzmessung
- Interner Computer mit Datenspeicher verhindert Datenverlust bei Problemen des externen Computers.



Agilent Real-Time QPCR Lösungen - Überblick



Kanäle: Atto425, FAM,
HEX, TxRd, Cy5



Proteinschmelzkurve
SYPRO Orange (ex: FAM
em: ROX)

- **Mehr Möglichkeiten durch Multiplexing:**
Von Beginn an Instrumentdesign für Multiplexanwendungen, dadurch herausragende Leistung bei multiplex QPCR Experimenten.
- **Flexible Messoptionen:**
Roter Kanal (ROX) steht für die Sequenzdetektion zur Verfügung da kein Referenzfarbstoff benötigt wird. Mx3005P kann Anregungs- und Emissionsfilter beliebig kombinieren.
- **Hervorragende Uniformität des Heizblocks:**
Gleichförmige Temperatur über den gesamten Block ermöglicht Messwerte mit niedriger Variabilität für verlässliche und hochsignifikante Ergebnisse.

Agilent Real-Time QPCR Lösungen – Optik

Entwickelt für best mögliche Leistung auch bei Multiplexanwendungen!

Halogenlampe

Wellenlängenbereich
350-750 nm

Anregungsfilterrad

4 oder 5 Filter mit geringem
Bandpass (~10 nm)*

Emissionsfilterrad

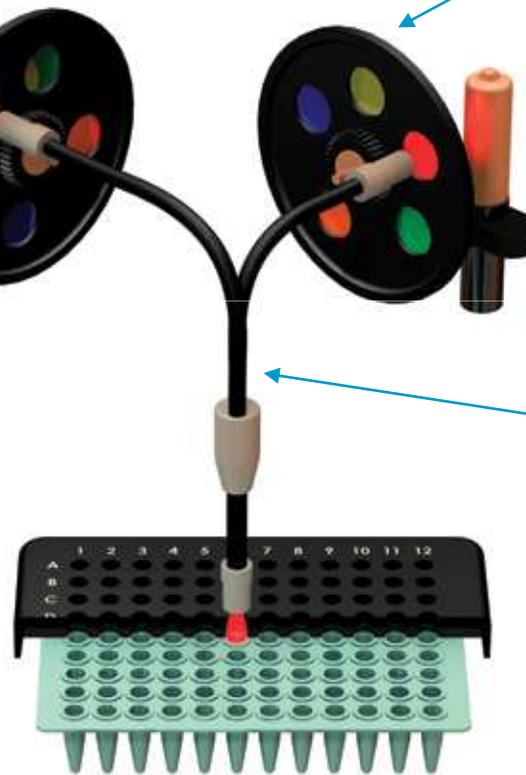
4 oder 5 Filter mit geringem
Bandpass (~10 nm)*

Photomultiplier

Hochsensitive
Fluoreszenzdetektion
350-700 nm

Glasfaseroptik

*Mx3000P™ synchronisierte Filterräder
Mx3005P™ erlaubt freie Kombination
von Anregungs- und Emissionsfiltern



Agilent Real-Time QPCR Lösungen - Optik

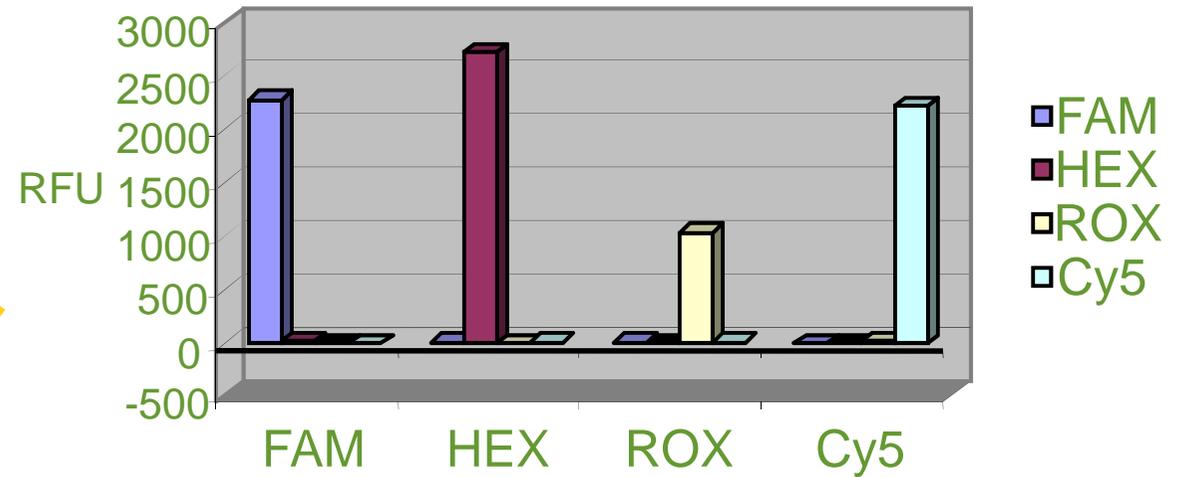
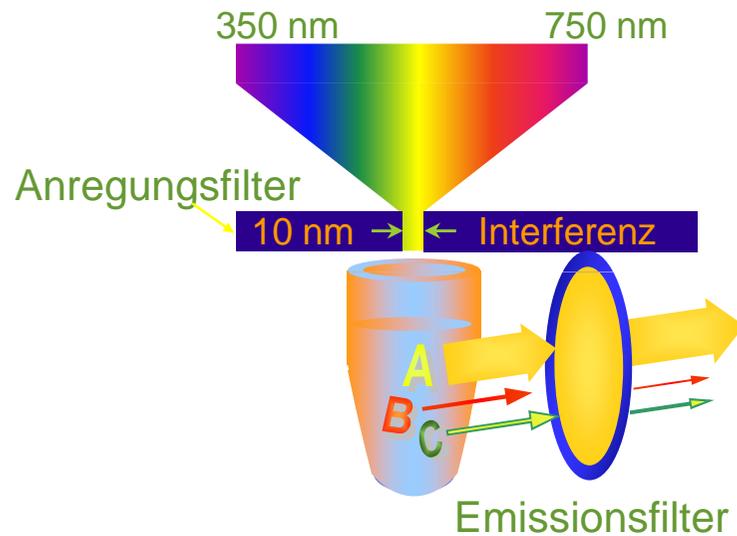


- ➔ Scan benötigt ca. 4 Sekunden pro Kanal für den gesamten Block
- ➔ Scan wird gegen Ende des Temperaturschrittes für die Messung durchgeführt.



Agilent Real-Time QPCR Lösungen - Optik

Eckdaten zur Kanaltrennung

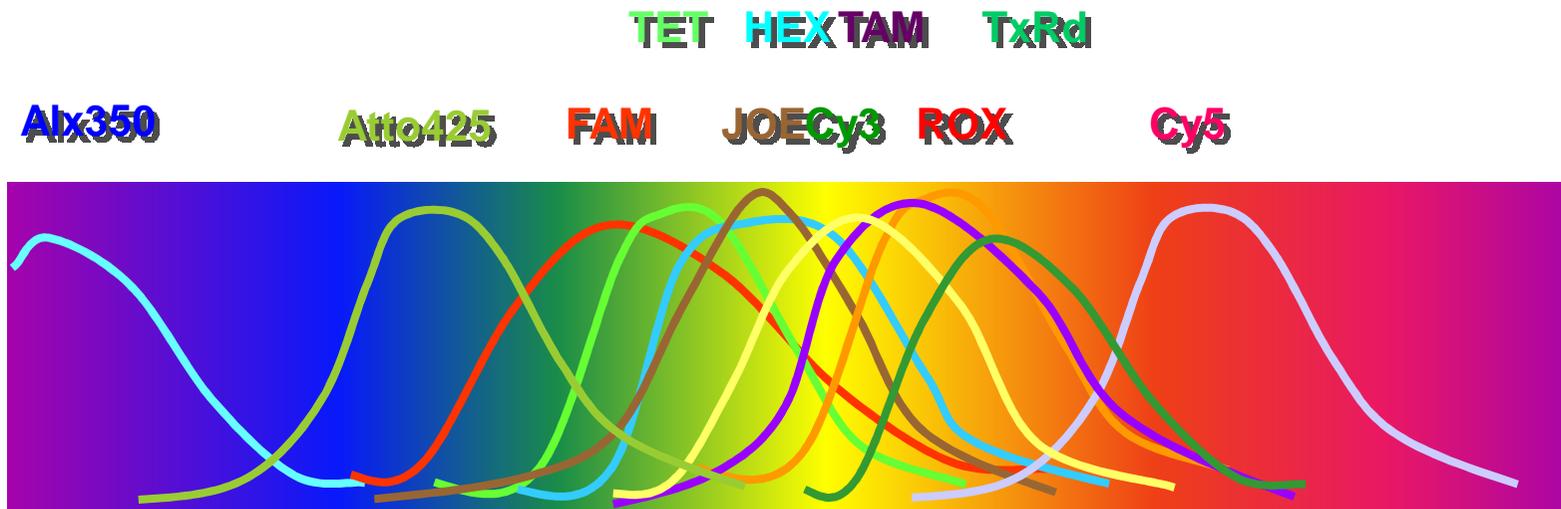


Optimierte Filterkombinationen

Agilent Real-Time QPCR Lösungen - Optik

Anregungsbereich: 350 to 750 nm

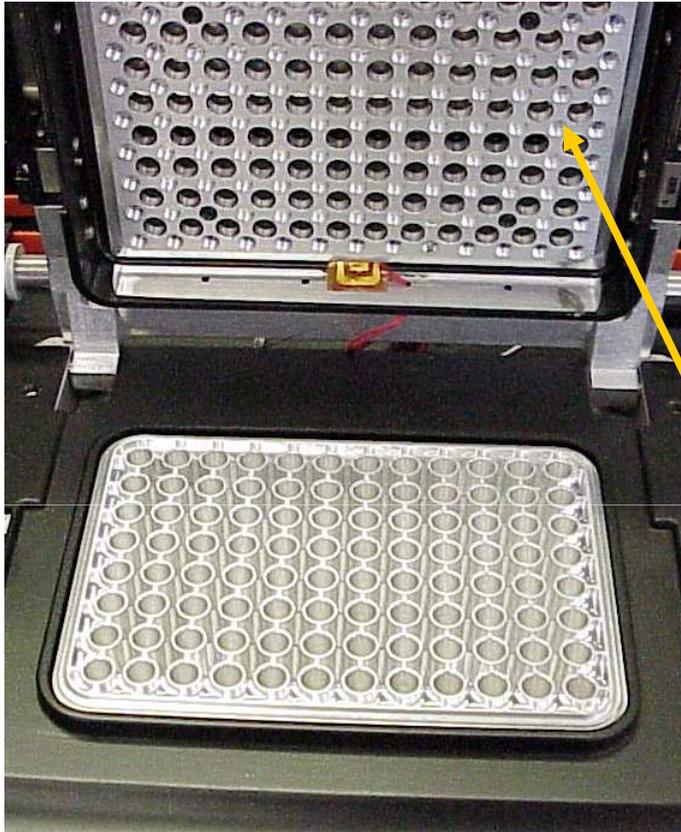
Messbereich: 350 to 700 nm



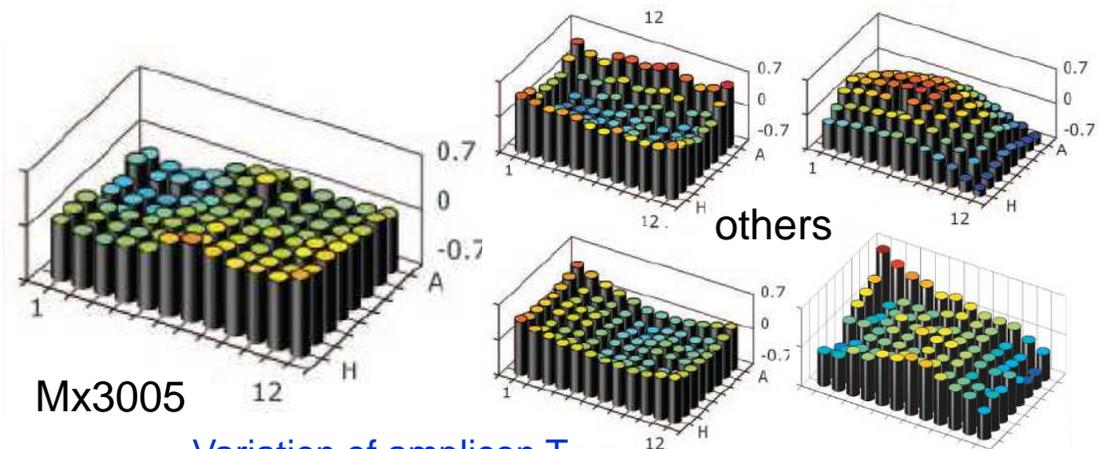
Vorhandene Filter können mit anderen Farbstoffen ähnlicher Spektraleigenschaften genutzt werden

Wahlmöglichkeit: Auswahl der passenden Filterkombination spezifisch für die eigenen Anwendungen

Agilent Real-Time QPCR Lösungen - Heizblock



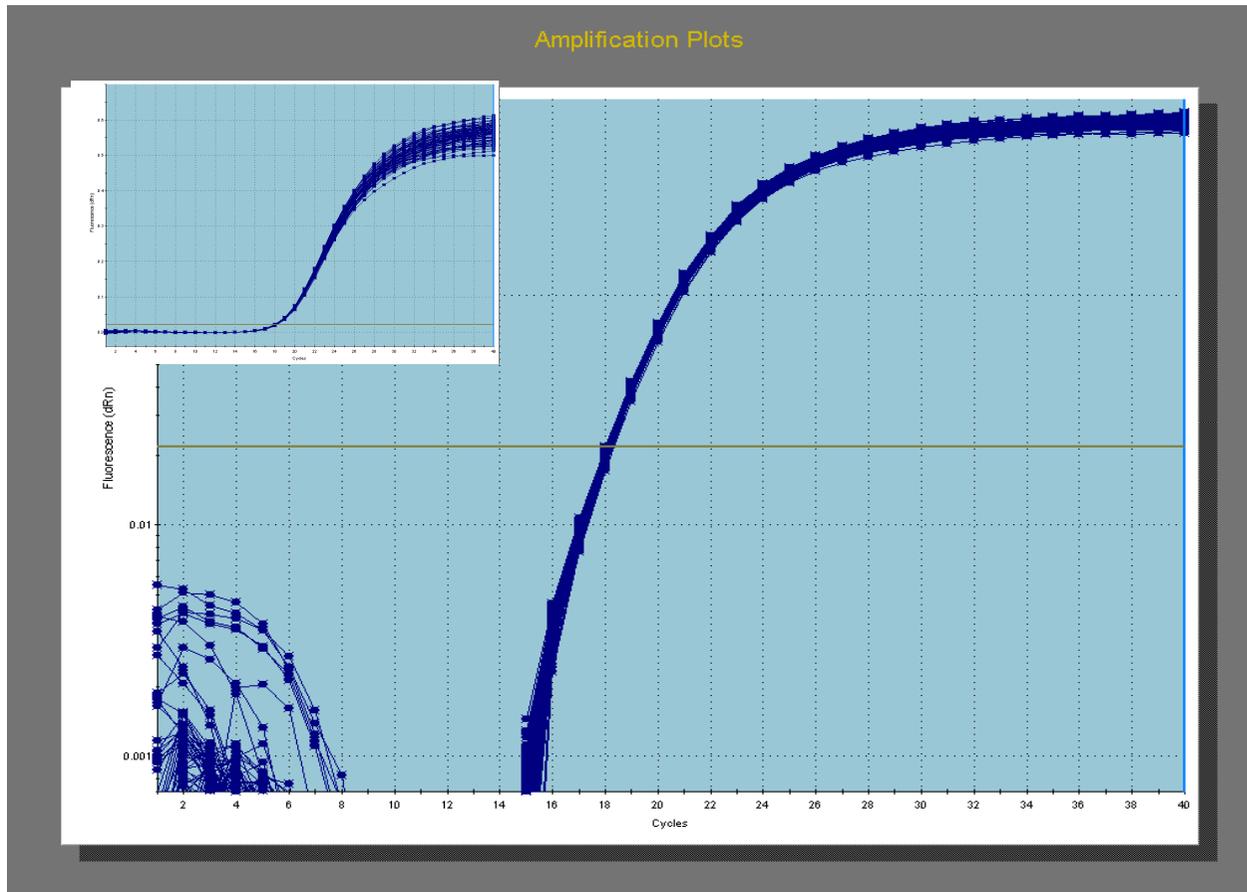
- **Temperaturuniformität:**
($\pm 0.25^{\circ}\text{C}$ @ 72°C über den Block).
- **Peltier-basiertes thermisches System**
- **Heiz-/Kühlrate: Bis zu 2.5°C/s**
- **Heizdeckel**



Variation of amplicon T_m
Herrmann et al., Clin. Chem. 52 (2006) and 53 (2007)

Agilent Real-Time QPCR Lösungen - Uniformität

96 Well Uniformitätstest. SYBR Green I Detektion



96 Wells

$\bar{Ct} = 18.1$

Stdabw. = 0.05

C.V. = 0.3%

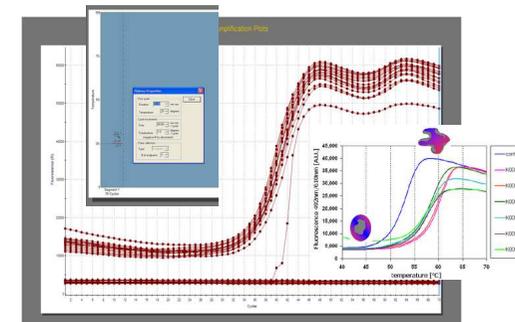
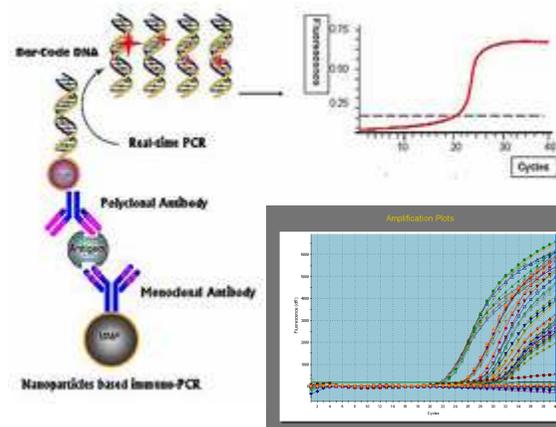
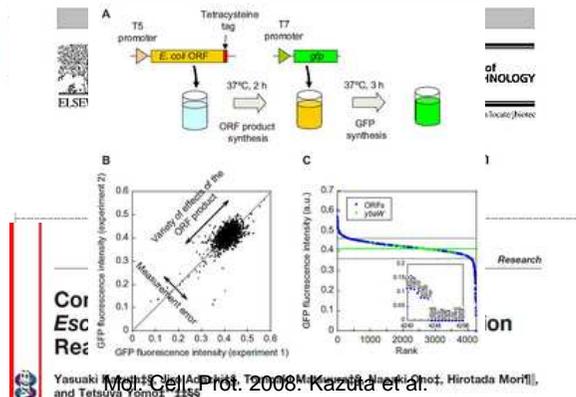
Ct Varianz =
0.26 Zyklen

Keine Trends/Positionseffekte sichtbar, hohe Uniformität der Ct

Agilent Real-Time QPCR Lösungen - Flexibilität

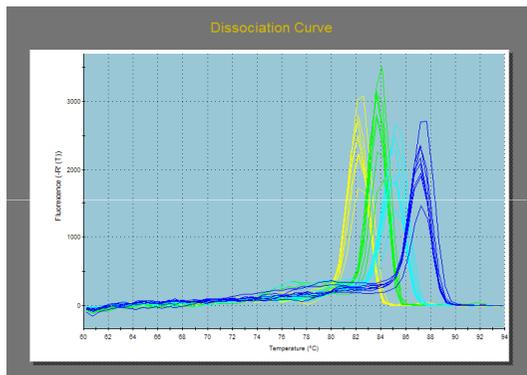
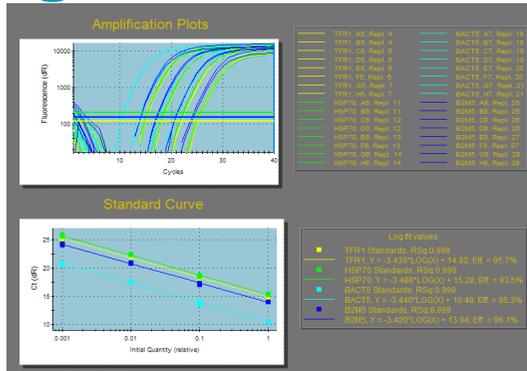
Die Technik der Mx Produktlinie ermöglicht verschiedenste Anwendungen:

- ⇒ Messung von [DNA] oder [RNA] mittels DNA bindender Fluoreszenzfarbstoffe
- ⇒ Detektion von Reportergenexpression mittels fluoreszierender Substrate oder fluoreszierender Proteine
- ⇒ Detektion von Proteinen durch Immuno-PCR mit Antikörpern die ein DNA-Label tragen
- ⇒ Untersuchungen zur Proteinstabilität und Ligandenbindung



Frank Niesen @ CESG 2009
see also PNAS **103**, 15835 (2006): Vedadi et al.
and Nat. Prot. **9**, 2212 (2007): Niesen et al.

Agilent Real-Time QPCR Lösungen – MxPro Software



New Options

Select experiment / project type

Real-time:

- Quantitative PCR (Multiple Standards)
- Comparative Quantitation (Calibrator)
- SYBR® Green (with Dissociation Curve)
- EvaGreen™ (with Dissociation Curve)
- Allele Discrimination / SNP's Real-Time
- Molecular Beacon Melting Curve

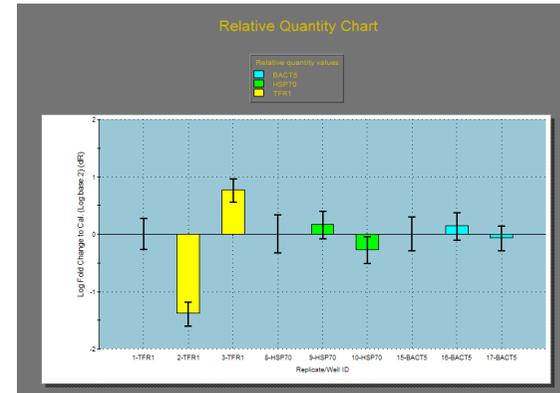
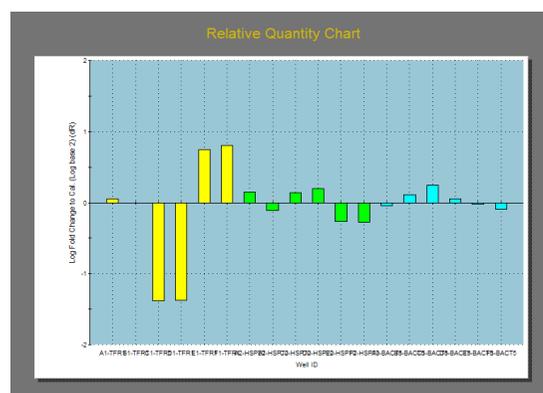
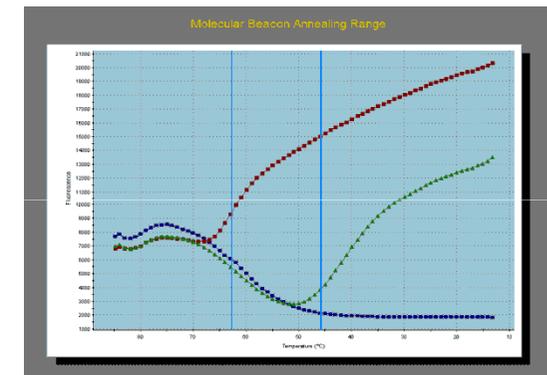
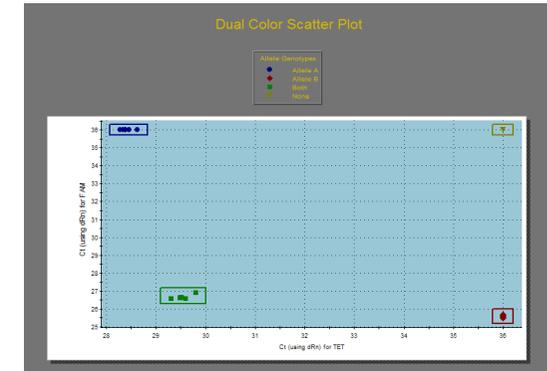
Plate read:

- Quantitative Plate Read
- Plate Read / Allele Discrimination

Project type:

- Multiple Experiment Analysis

Turn lamp on for warm-up? Don't show this again



MxPro Software – Alles unter einem Dach

Quantifizierung → Quantitative PCR (Multiple Standards)

Genexpression → Comparative Quantitation (Calibrator)

Schmelzkurven-analyse → SYBR® Green (with Dissociation Curve)

Genotypisierung → EvaGreen™ (with Dissociation Curve)

Endpunktanalysen → Allele Discrimination / SNP's Real-Time

Projekt Modus → Molecular Beacon Melting Curve

Plate read:

- Quantitative Plate Read
- Plate Read / Allele Discrimination

Project type:

- Multiple Experiment Analysis

Turn lamp on for warm-up? Don't show this again

Experimenttypen können nach Messung jederzeit in jeden anderen Typ umgewandelt werden

Setup

Well type: Unknown

Collect fluorescence data:

- CY5 HEX ALEXA
- ROX FAM

Reference dye: <none> All wells

Assign Assay Names...

Normalizing assay: <none>

Standard quantity: CY5

Auto-Increment: 10x

Identify replicates:

Replicate symbol: <none>

Auto-Increment

Identify associations:

Assoc. symbol: <none>

Auto-Increment

Clear Selected Wells

Plate setup comments:

Full-Screen Plate Next >

Analyse

Area to analyze:

- Amplification plots
- Dissociation curve (no melt data)
- Plate sample values
- Standard curve
- Relative quantity chart
- Relative quantity plate
- Text report
- Consolidated reports

Relative quantity based on:

dRn

Show fold change

Show error bars

Select replicate/well assays to plot

Rep...	Assay	Type	Quan...
1	FAM	Standard	6.08
2	FAM	Standard	1.55
3	FAM	Standard	0.402
4	FAM	Standard	0.102
5	FAM	Standard	2.53e...
6	FAM	Standard	5.56e...
7	FAM	NAC	No Ct
15	HEX	NAC	No Ct
17	FAM	Calibrator	Calibr...
18	FAM	Unknown	0.902
19	FAM	Unknown	1.76
20	FAM	Unknown	1.52
21	FAM	Unknown	1.95
C6	HEX	Standard	No C...
D6	HEX	Standard	No C...

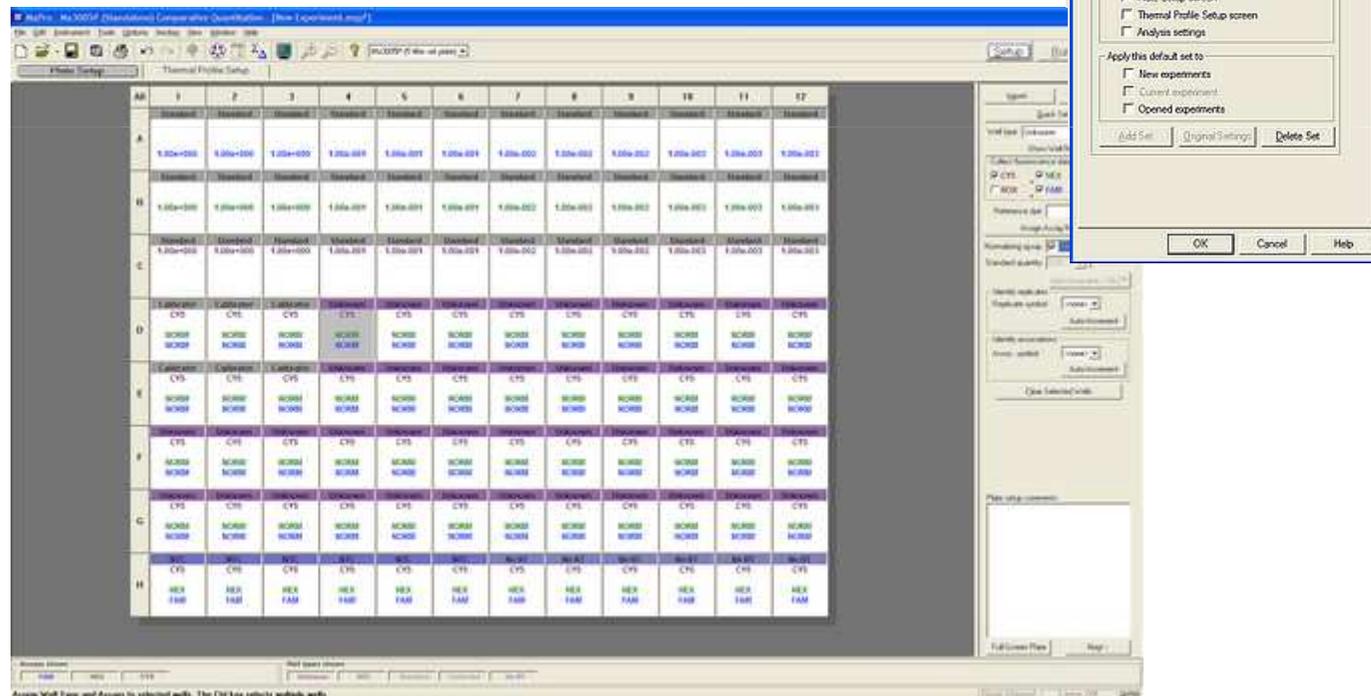
Select All

Workflows

Abhängig vom Experimenttyp

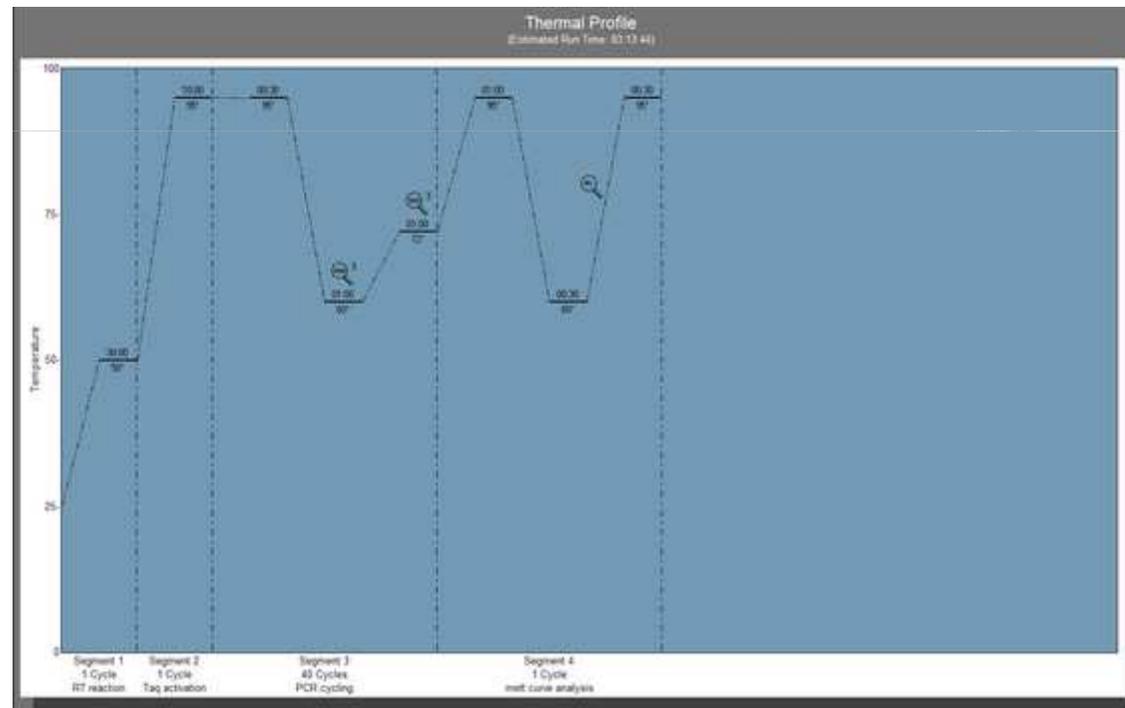
MxPro Software – Einfache Programmierung

- ⇒ Einfache Welldefinition
- ⇒ Schnelle und simple Zuweisung von Standardmengen
- ⇒ Verwendung mehrerer Referenzsequenzen zur Normalisierung
- ⇒ Speicherung von Vorlagen für wiederkehrende Aufgaben



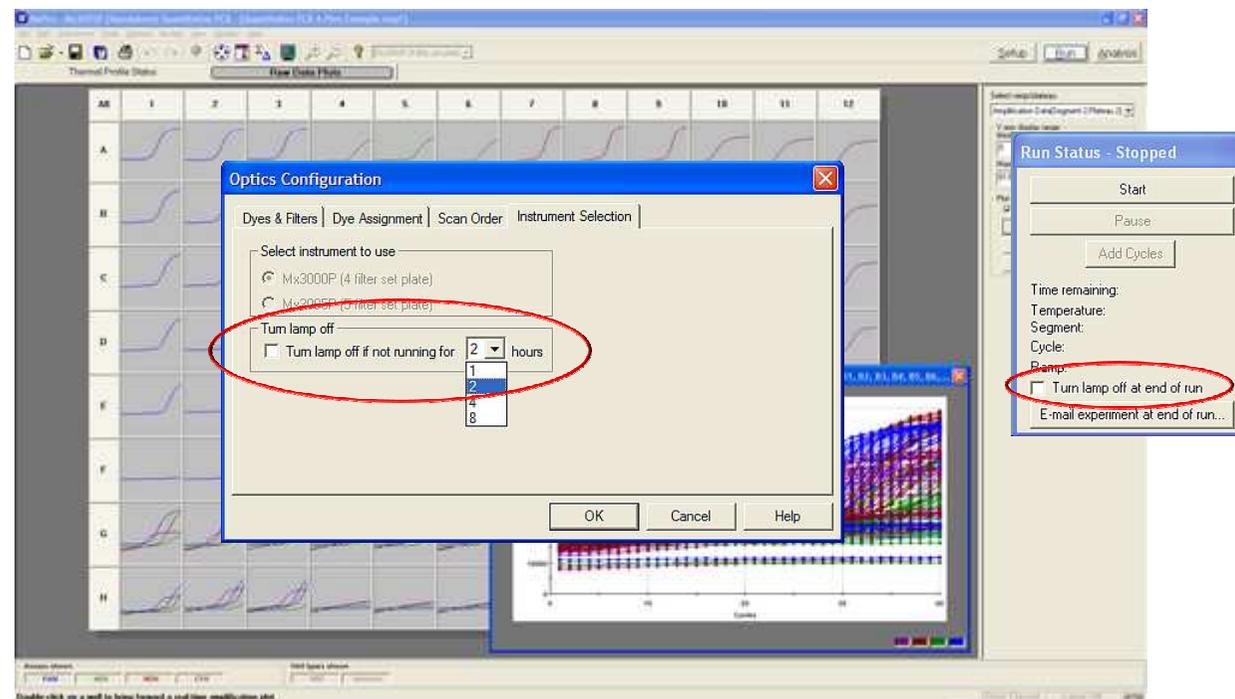
MxPro Software – Einfache Programmierung

- ⇒ Point und Klick Thermoprofilprogrammierung....
- ⇒ Möglichkeiten zur Programmierung komplexer Profile
- ⇒ Messungen so oft und an so vielen Positionen wie gewünscht



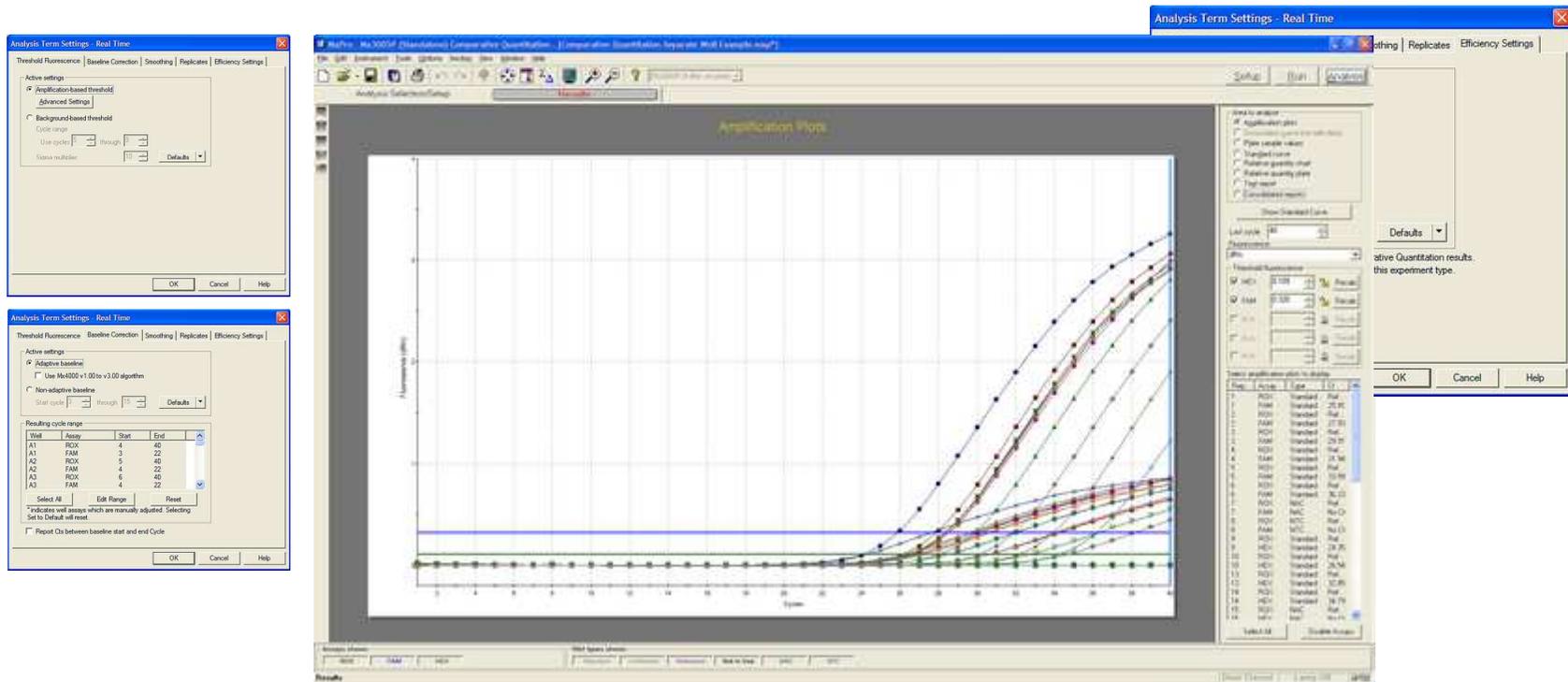
MxPro Software – Echtzeitanzeige der Messdaten

- ⇒ Echtzeitanzeige der gemessenen Rohdaten
- ⇒ Einfache Möglichkeit zum Hinzufügen von Zyklen oder zum Pausieren während des Laufs
- ⇒ Automatisches Ausschalten der Lampe am Ende des Experiments oder bei Nichtbenutzung



MxPro Software – Analysefunktionen

- ⇒ **Alle benötigten Analysemöglichkeiten in einer Software:**
Frei konfigurierbare automatische Algorithmen zu Threshold-Bestimmung und Hintergrundkorrektur
- ⇒ **Effizienzkorrektur für korrekte Auswertung von Vergleichender Quantifizierung**
- ⇒ **Analyse des Experiments während der Datenerfassung möglich**



MxPro Software – Analysefunktionen

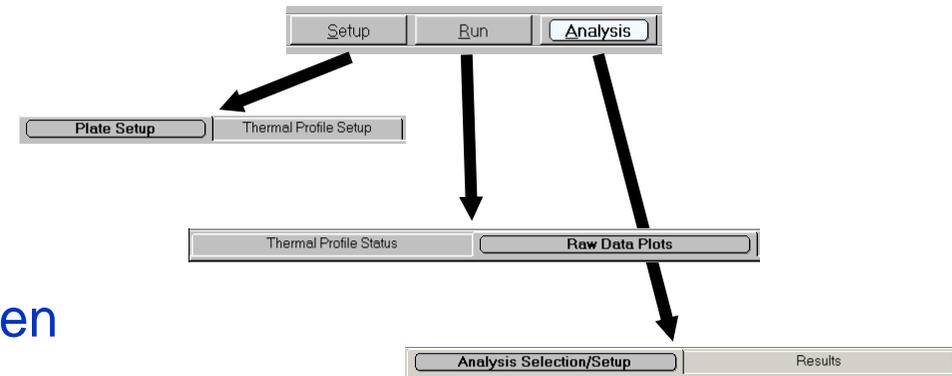
- ⇒ Entscheiden Sie welche Ansicht der Rohdaten Sie Auswerten
- ⇒ Einfacher Export von Grafiken und Tabellen
- ⇒ Consolidated Report als Dokumentation für das Laborbuch
- ⇒ Multiexperimentanalyse für größere Projekte mit automatischer Normalisierung der Experimente

The screenshot displays the MxPro software interface with several key components:

- Project Results:** The main window shows three bar charts representing analysis results for different assays. The top-left chart shows blue bars, the top-right chart shows orange bars, and the bottom-left chart shows red bars. A note at the bottom of the red bar chart states: "Some error bars not shown due to values out of range."
- Settings Panels:**
 - Cross-experiment threshold calculation:** A dialog box with options: "Calculate thresholds for individual experiments" (unchecked), "Use common threshold" (unchecked), and "Use inter-run calibrators" (checked) with a "Select IRC wells..." button.
 - Select IRC wells:** A dialog box with a table for selecting wells. The table has columns for "Assay" and "IRC wells".
 - Areas to include:** A panel with checkboxes for "Plate Setup" and "Thermal Profile Setup", both of which are checked.
 - Area to analyze:** A panel with various options for analysis, including "Amplification only", "Quantification only", "Plate setup only", "Change curve", "Relative quantity plot", "Absolute quantity plot", and "No plot".
- Export Options:** A panel on the right side of the main window lists various export options: "Plots", "Table", "Table/Setup", "Table/Setup-Term Settings", "View on Plots", "Table Curves", "Table Values", "Table Curve", "Table Quantity Chart", "Table Quantity Plate", and "Table".

MxPro Software – Alles unter einem Dach

- Eigenentwicklung, Einbeziehung von Kundenanfragen und -vorschlägen
- Kostenfreie Updates
- Erlaubt mehrere Programminstanzen
- Analyse von aktuell gemessenen Daten
- Rohdaten in Echtzeit und bei der Analyse sichtbar
- Einfache Benutzung – Experimentelle Workflows
- Umfangreiche Analysefunktionen für alle Experimenttypen
- Einfacher Export zu Excel, PowerPoint, Text oder Bildformaten
- Analyse größerer Projekte:
Multiexperiment-Analyse für alle verfügbaren Experimenttypen



PCR und QPCR

**Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit!**

Literatur

Saiki R.K. et al., Science 230 (1985):

Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia

Saiki R.K. et al., Science 239 (1988):

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

Holland P.M. et al. PNAS 88 (1991):

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' \rightarrow 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase

Higuchi R. et al., (Nature) Biotechnology 10 (1992):

Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences

Higuchi R. et al., (Nature) Biotechnology 11 (1993):

Kinetic PCR analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions

Heid C.A., Gen. Res. 6 (1996):

Real Time Quantitative PCR

Pfaffl M.W., Nucl. Ac. Res. 29 (2001):

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR

Nolan T. et al., Nat. Prot. 1 (2006):

Quantification of mRNA using real-time RT-PCR

Hellemans J. et al., Genome Biol. 8 (2007):

Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses

Literatur

Shu P.-Y. et al., J. Clin. Microbiol. 41 (2003):

Development of Group- and Serotype-Specific One-Step SYBR Green I-Based Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Dengue Virus

Leparc-Goffart I. et al., J. Clin. Virol. 45 (2009):

Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses

Matero P. et al., Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 117 (2009):

Real-time multiplex PCR assay for detection of Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis

Lo C.-C. et al., J. Agric. Food Chem. 55 (2007)

Use of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) and Transformation Assay To Monitor the Persistence and Bioavailability of Transgenic Genes Released from Genetically Modified Papaya Expressing npt II and PRSV Genes in the Soil

Gaudron T. et al., Eur. Food Res. Technol. 229 (2009):

Development of a quadruplex-real-time-PCR for screening food for genetically modified organisms

