

Introduction au PCR en temps réel

Par Philippe Lampron, M.Sc.

Université 
de Montréal

Résumé



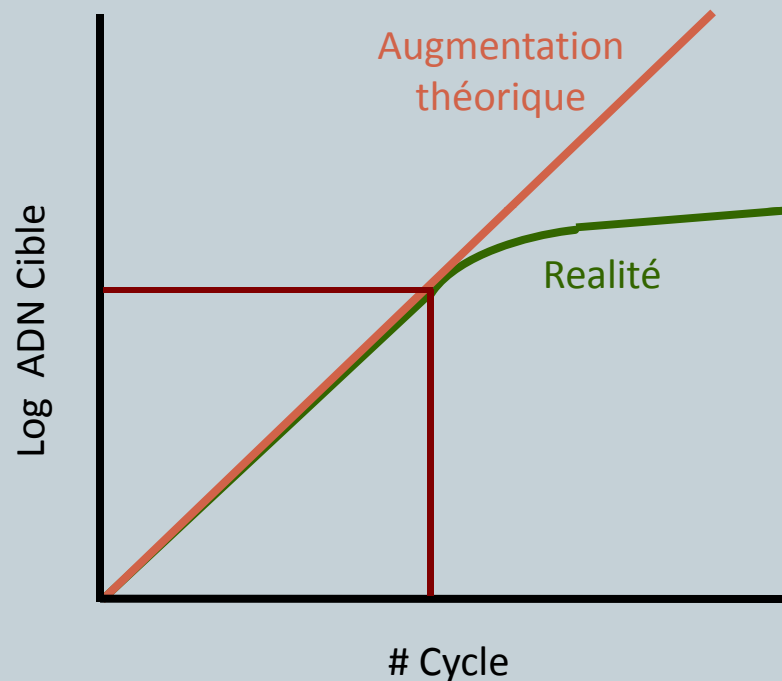
- **Fondements du PCR en temps réel (qPCR)**
 - Théorie du PCR en temps réel
 - Types de chimies
 - Méthode de quantification
- **Acquisition de résultats optimaux**
 - Design expérimental
 - Optimisation et validation

Qu'est que le PCR en temps réel?



- Détection de l'amplification d'un produit basée sur la fluorescence durant une réaction de PCR
- Mesure la quantité initial d'un acide nucléique en déterminant le nombre de cycle requis pour atteindre un niveau déterminé de produit
- Le PCR traditionnel (end point) est utilisé pour amplifier l'ADN et l'analyse au point terminal de la réaction sera utilisée pour distinguer des produits.

PCR: Theorie vs. Réalité

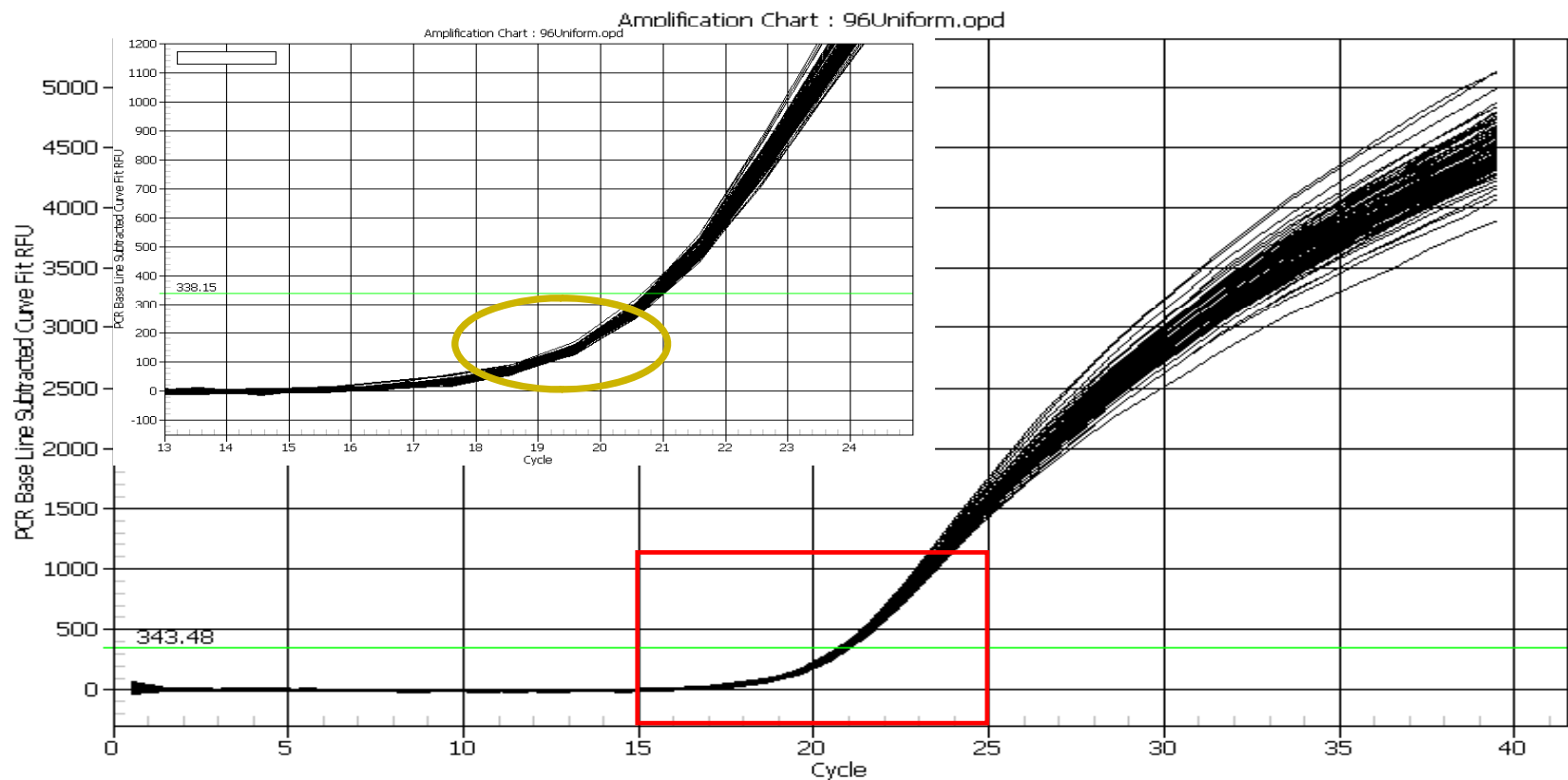


- L'augmentation exponentielle du produit est limitée; L'atteinte d'un plateau est incontournable
- Le PCR traditionnel (end point) n'est pas approprié pour la quantification
- Le PCR en temps réel permet la quantification durant la phase exponentielle de l'amplification

Analyse des données: Ajuster le seuil de référence



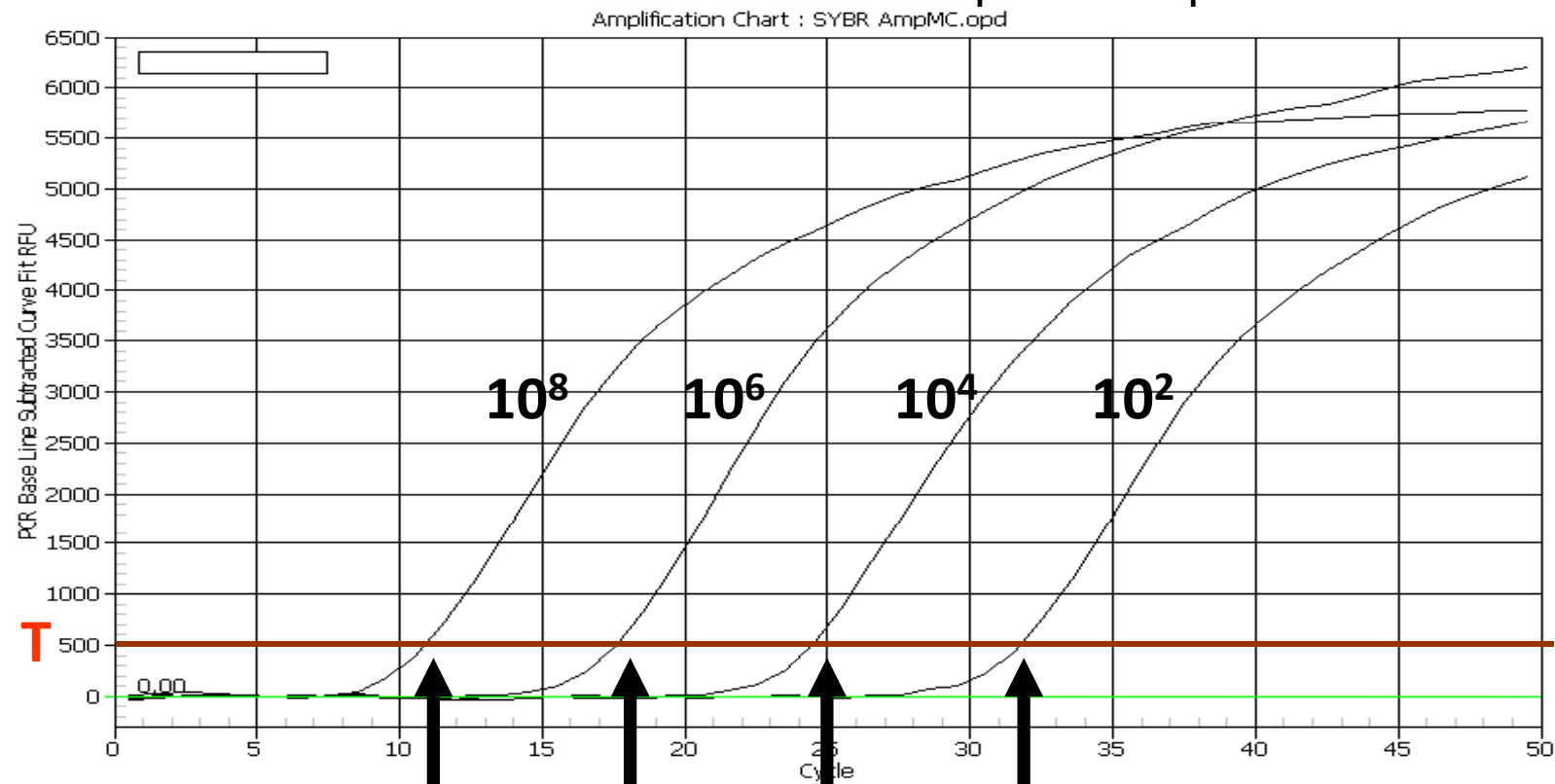
- Le seuil de référence (threshold line) est une valeur de fluorescence à laquelle les courbes sont comparées
- Réglé empiriquement ou par un calcul statistique au dessus du background (méthode de la dérivée seconde)



Analyse des données: Déterminer le C_p (crossing point)



- Le C_p = nombre de cycles requis pour qu'une réaction de fluorescence atteigne le seuil de référence (T)
- Corrèle fortement avec le nombre de copie de départ



Analyse des données: Déterminer le C_p (crossing point)



Le C_p est linéaire avec le log du nombre de copie initiale

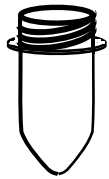


La pente de la courbe standard peut être directement corrélée à l'efficacité de la réaction :

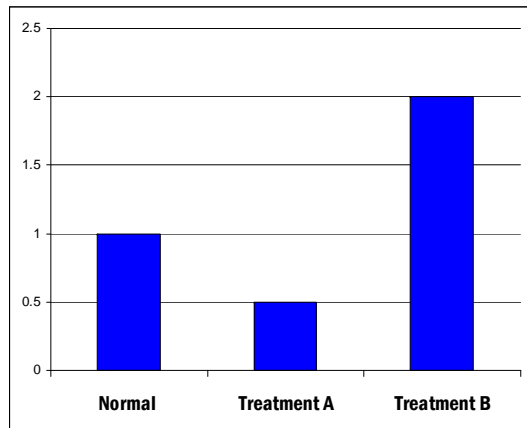
$$\text{Efficiency } (\eta) = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

Lorsque la pente = -3.32, Efficiency = 100%

Types de quantification



14500 copies



- *Absolute*

- Détermine une quantité initiale d'un acide nucléique cible
- Requiert une courbe standard

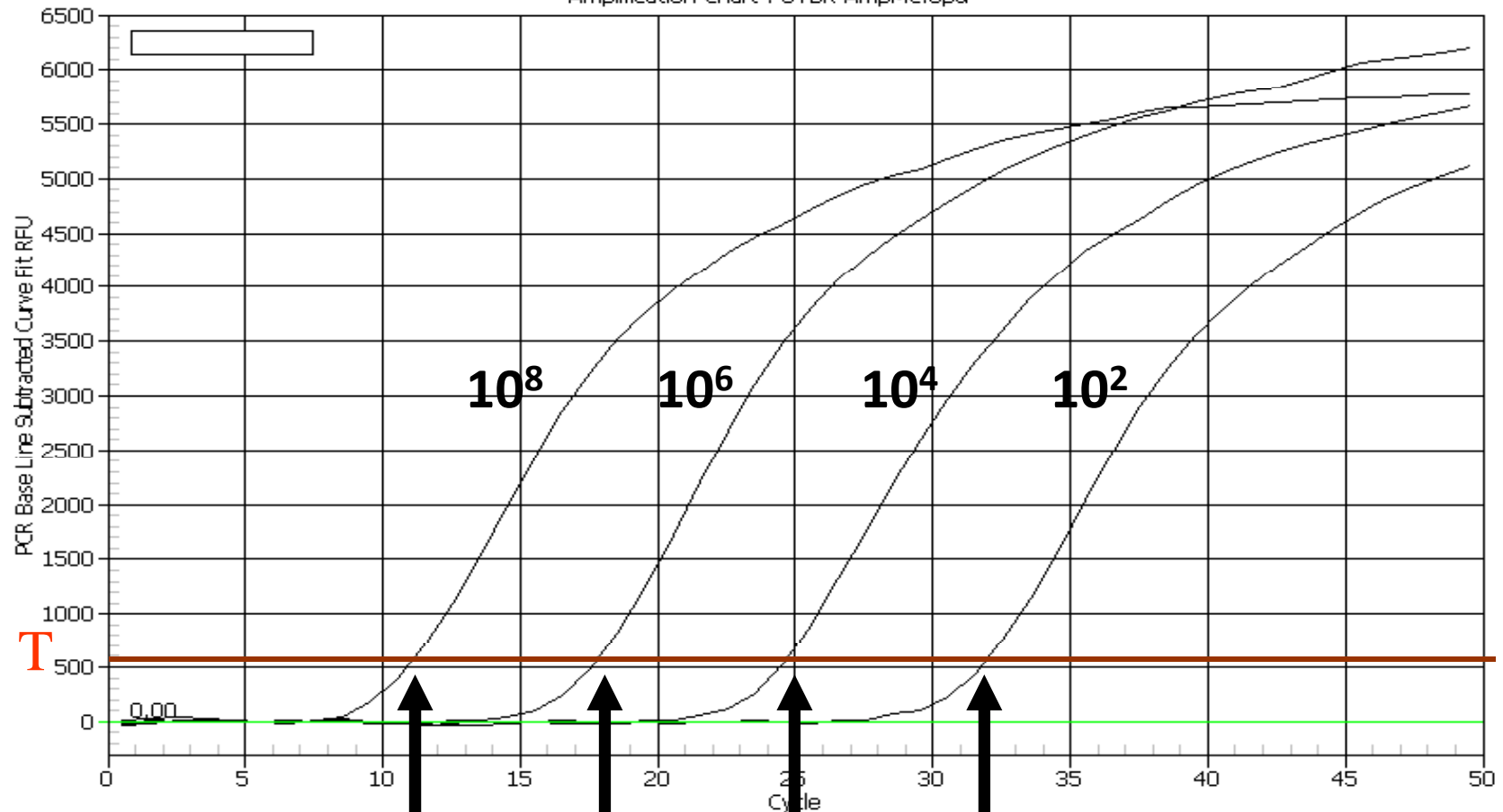
- *Relative*

- Détermine la différence (en nombre de fois) d'une quantité initiale d'acides nucléiques entre les différents échantillons
- Performée avec ou sans courbe standard
- Utilisée pour l'analyse de l'expression de gènes avec un gène cible normalisé par un gène de référence

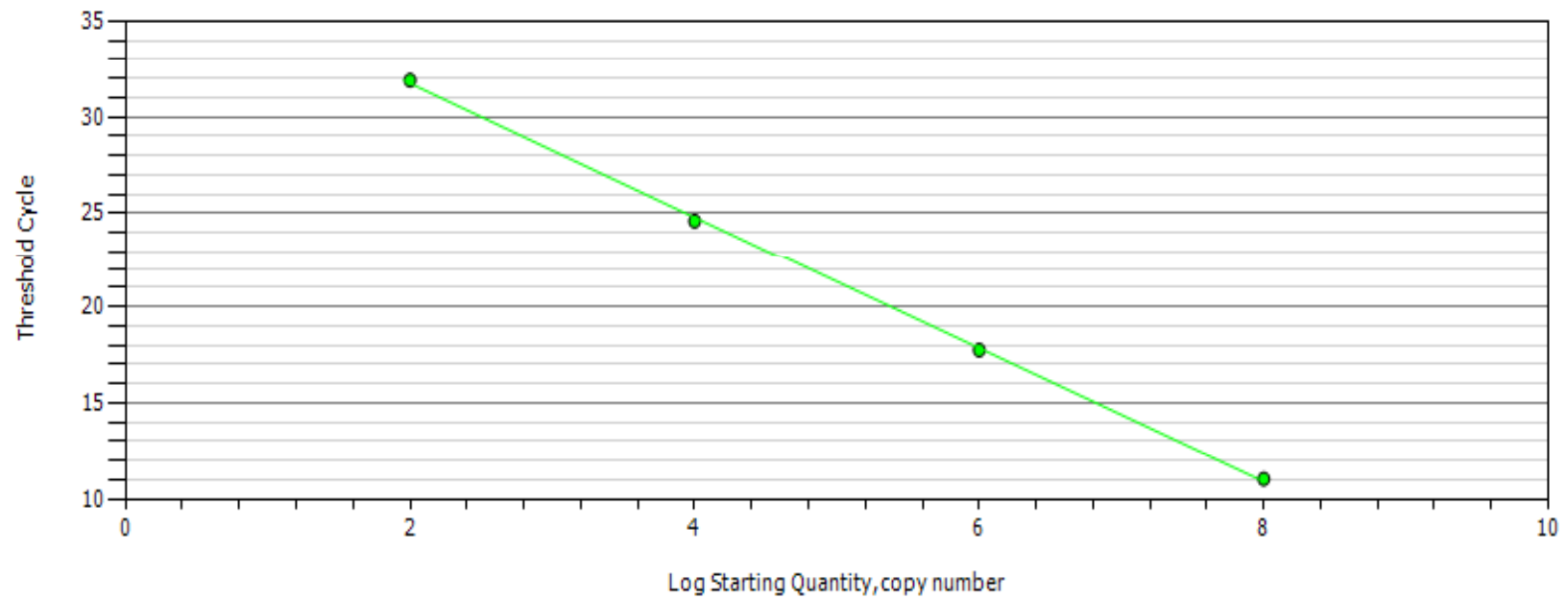
Quantification absolute



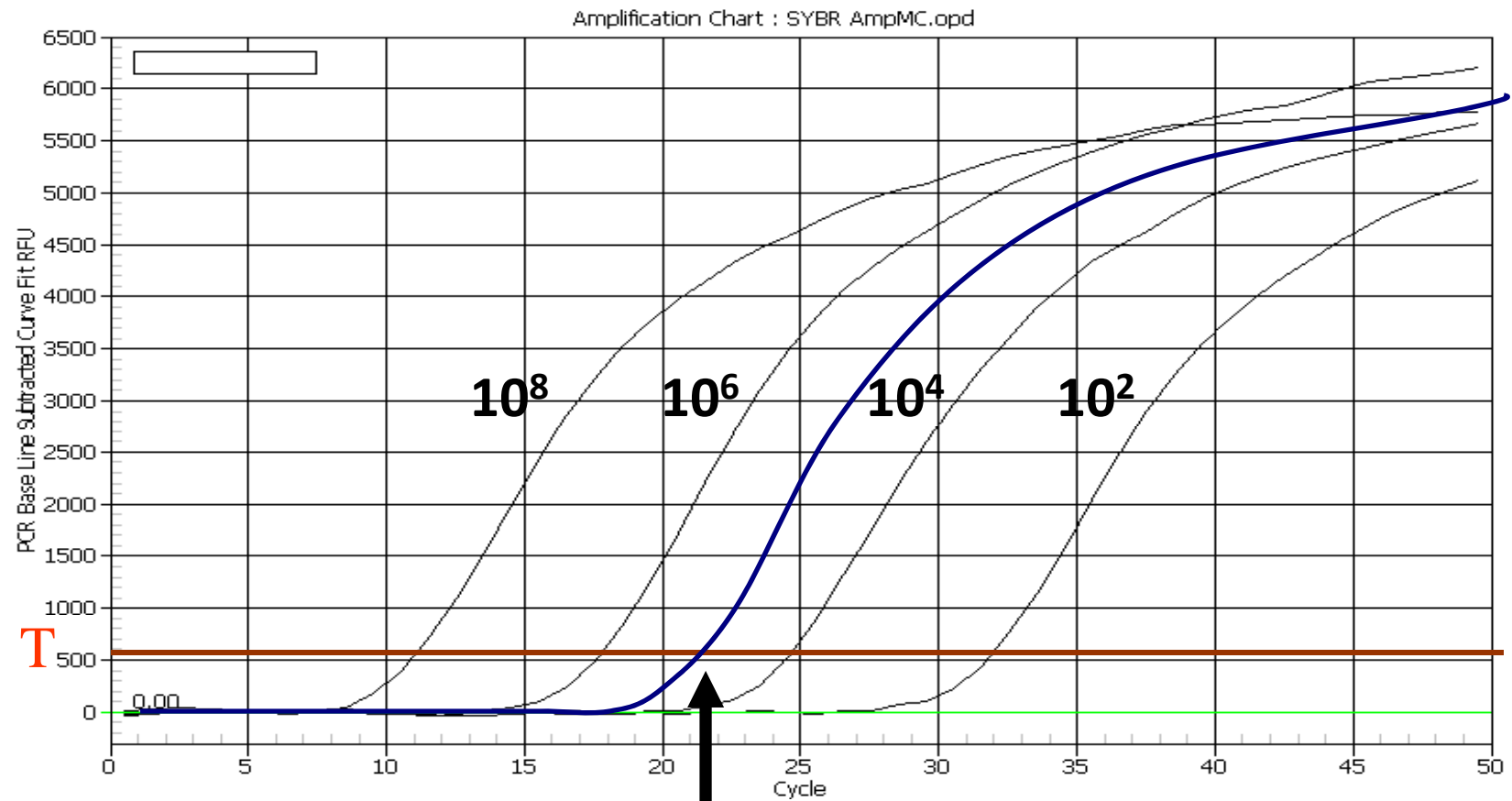
Amplification Chart : SYBR AmpMC.opd



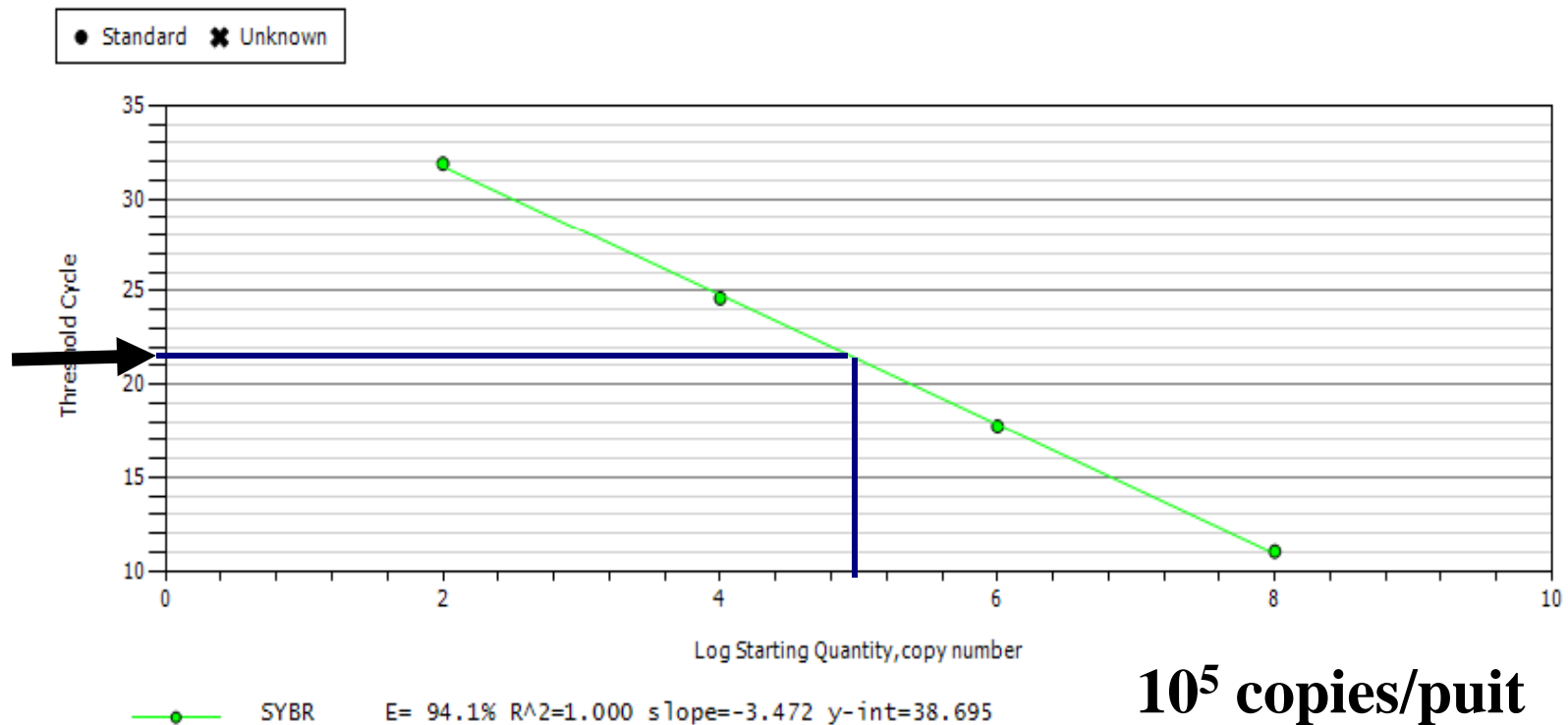
Quantification absolute



Quantification absolute



Quantification absolute

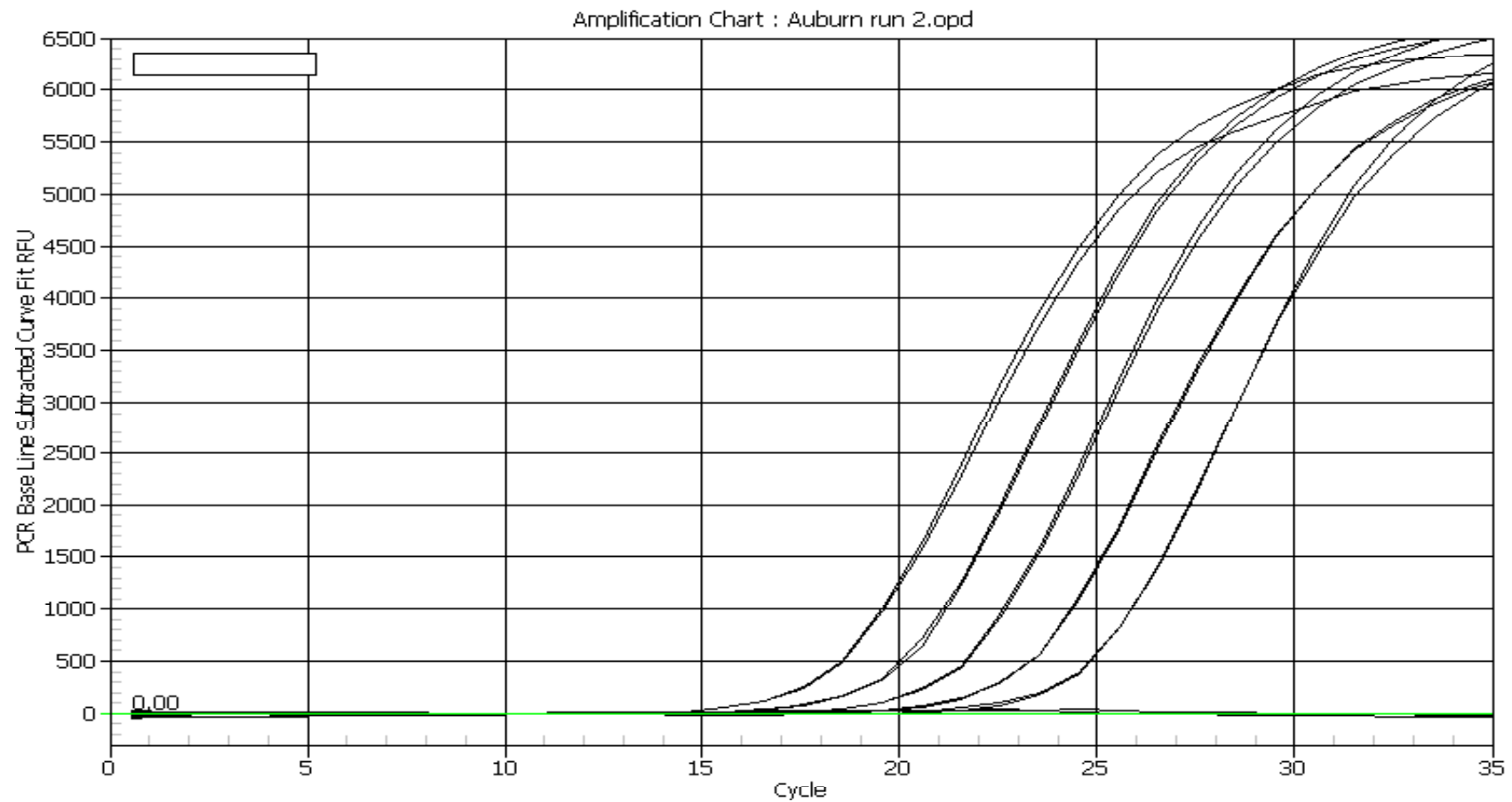


Quantification relative

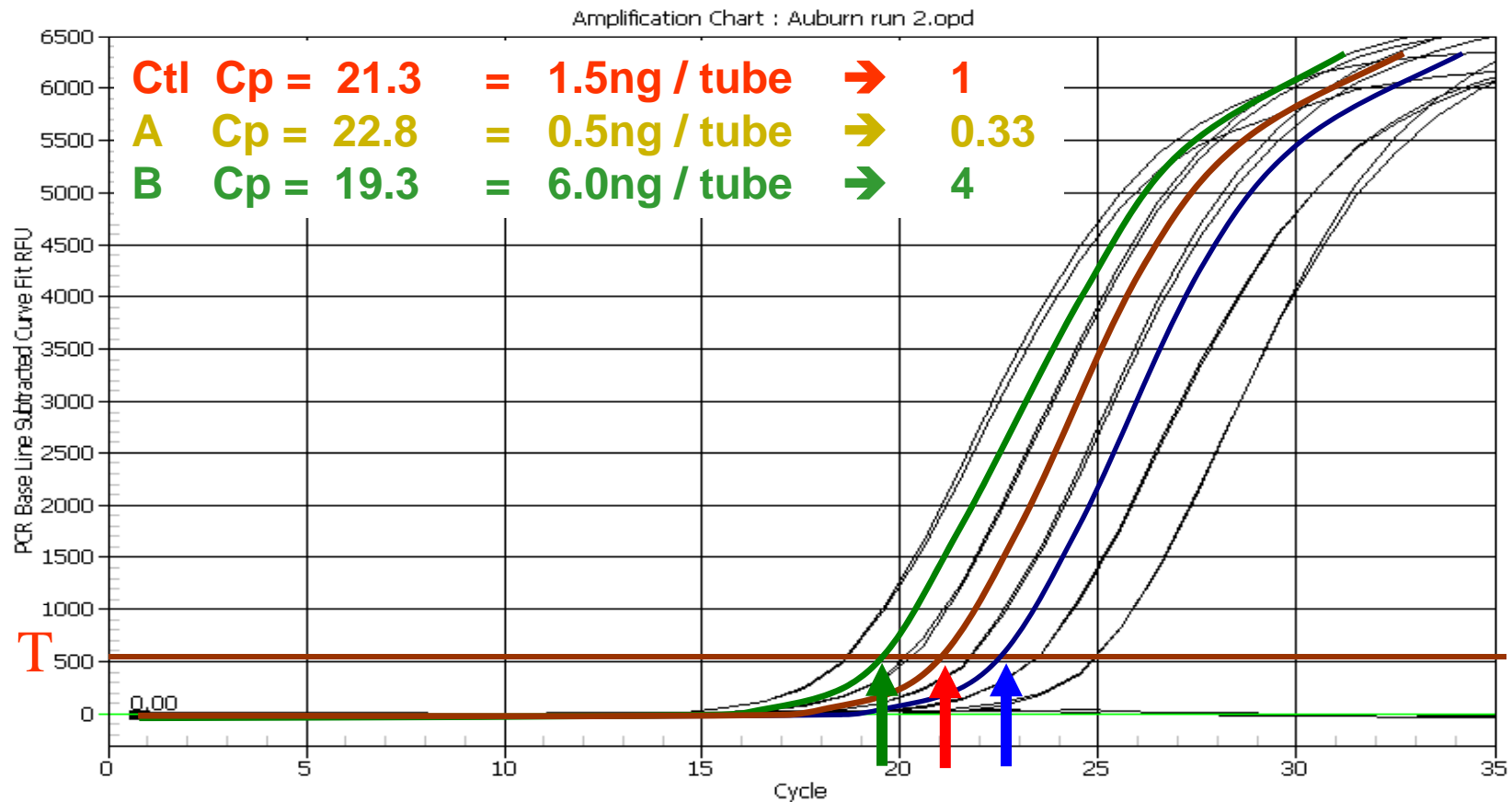


- **Avec courbe standard**
 - Quantités utilisées pour mesurer la différence (en nombre de fois) d'un acide nucléique cible et d'un acide nucléique référence
 - Ratio du gène cible sur gène de référence utilisé pour normaliser
- **Avec la méthode comparative de Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ ou C_p)**
 - C_t ou C_p est utilisé pour mesurer la différence en quantité d'un acide nucléique cible entre les différents échantillons

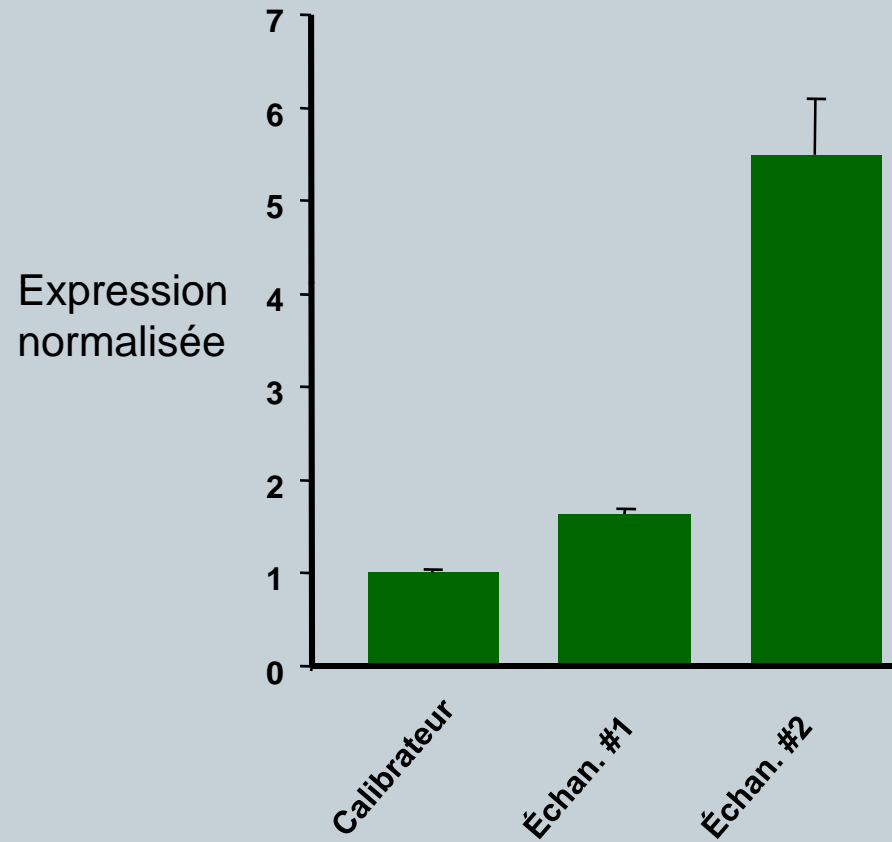
Quantification relative



Quantification relative



Quantification relative: Résultats



Considérations en quantification relative



- L'expression des gènes de référence doit être constante entre les différents échantillons
- Efficacité de réaction de la cible et de la référence doivent être calculée
 - Méthode qui requiert une validation

Les chimies en PCR en temps réel



- **Basées sur la fluorescence**
 - Après l'absorbance de certaines longueurs d'ondes de la lumière (excitation), le fluorophore émet de la lumière à une longueur d'onde plus grande (émission)
 - La fluorescence est proportionnelle au produit amplifié
- **2 chimies couramment utilisées:**
 - SYBR[®] Green I
 - Sondes TaqMan[®]

Chimie SYBR Green I



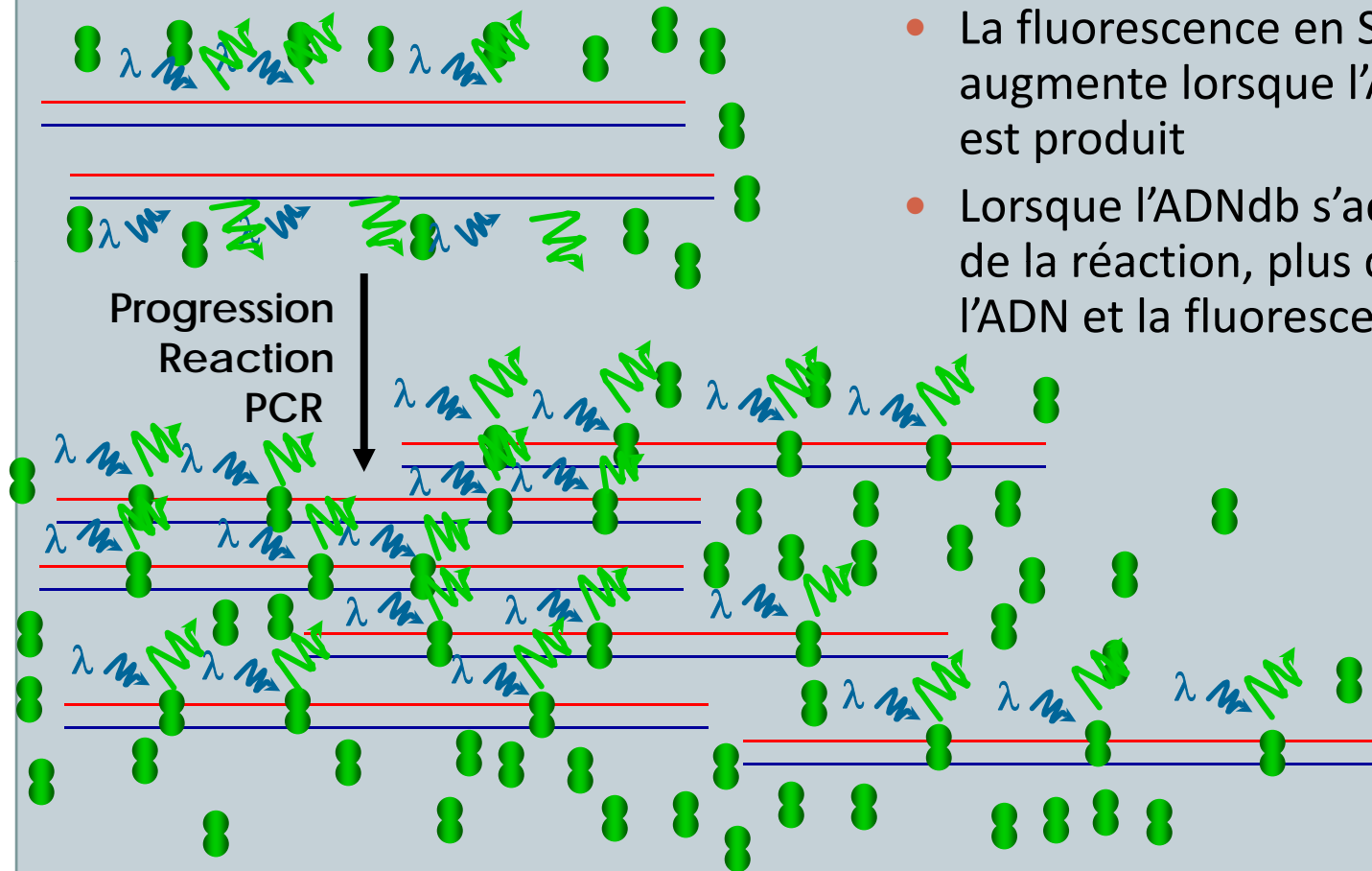
- **Avantages**

- L'expérience ne requiert que des amorces
- Analyse de courbe de melting post-amplification

- **Désavantages**

- Potentiel de contribution à la fluorescence provenant de produits non spécifiques (primer-dimers)
- Pas de multiplex possible

SYBR Green I



- La fluorescence en SYBR Green I (SGI) augmente lorsque l'ADN double brin est produit
- Lorsque l'ADNdb s'accumule au cours de la réaction, plus de SGI se lie à l'ADN et la fluorescence augmente

Analyse de courbe de Melting avec SGI

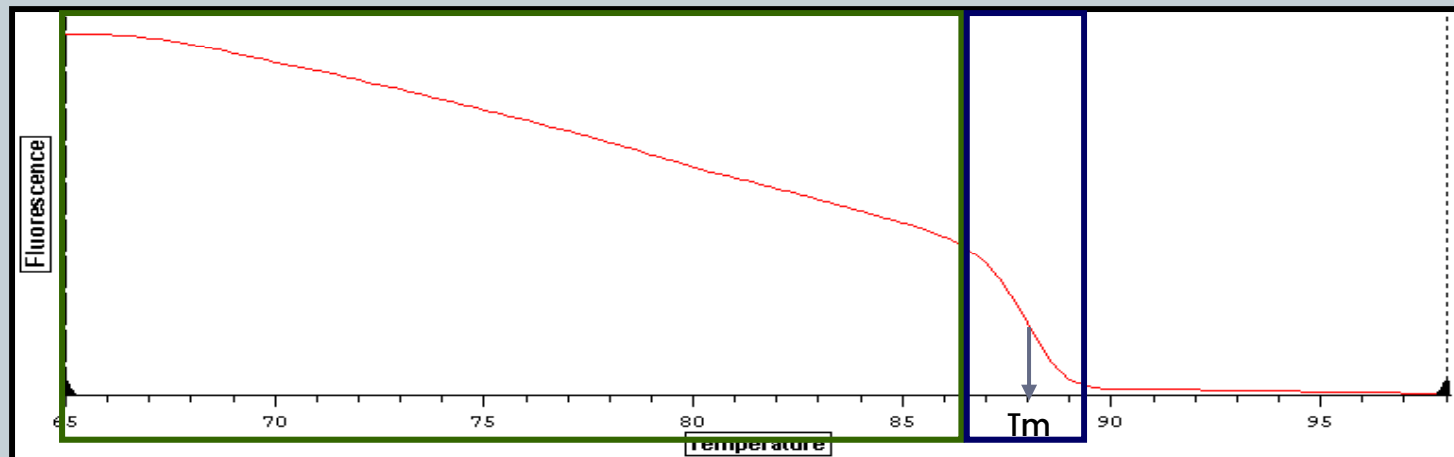


- Utilisée pour vérifier la spécificité de la réaction après amplification
- Complémentaire au fait d'utiliser un gel d'agarose seulement que le T_m est utilisé pour distinguer les produits
- Lorsque la température augmente, l'ADNdb se dénature, le SGI est libéré et la fluorescence diminue
- Température de dénaturation (melting) (T_m) de l'ADNdb
 - Température à laquelle la moitié de l'AND est double brin et l'autre est simple brin
 - Dépend du contenu en nucleotides et de la longueur

Analyse de courbe de Melting avec SGI

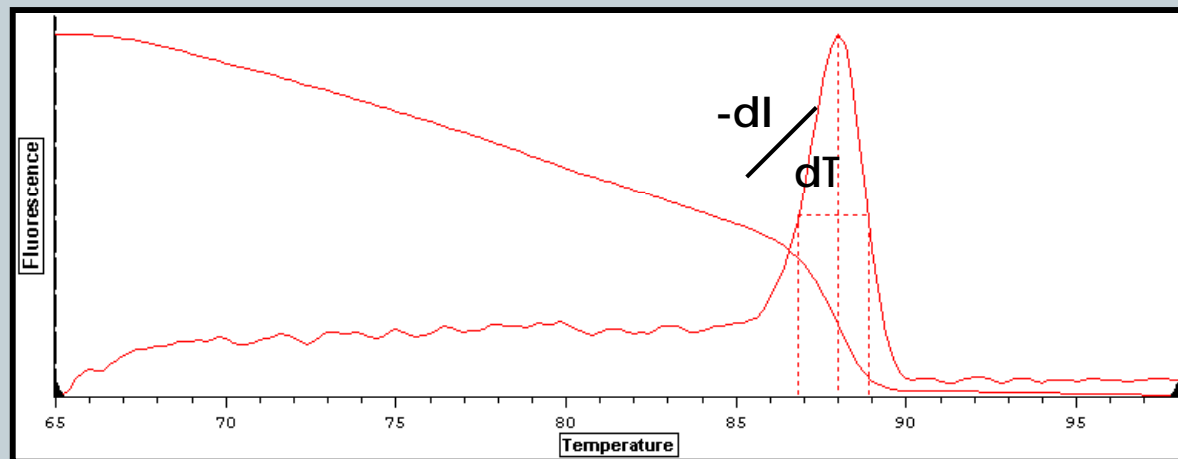


- Diminution de fluorescence
 - Due à l'augmentation de température
 - Due à la dénaturation et à la libération du SGI
- T_m est le point d'inflexion de la courbe de melting



Analyse de courbe de Melting avec SGI

- Graphique du taux de changement négatif de la fluorescence vs température ($-dI/dT$)
- Pour nouveaux amplicons, lancer une analyse de la courbe de melting suivie d'une analyse sur gel d'agarose (et séquençage) for validation



Paramètres à optimiser pour la spécificité d'une réaction et l'efficacité

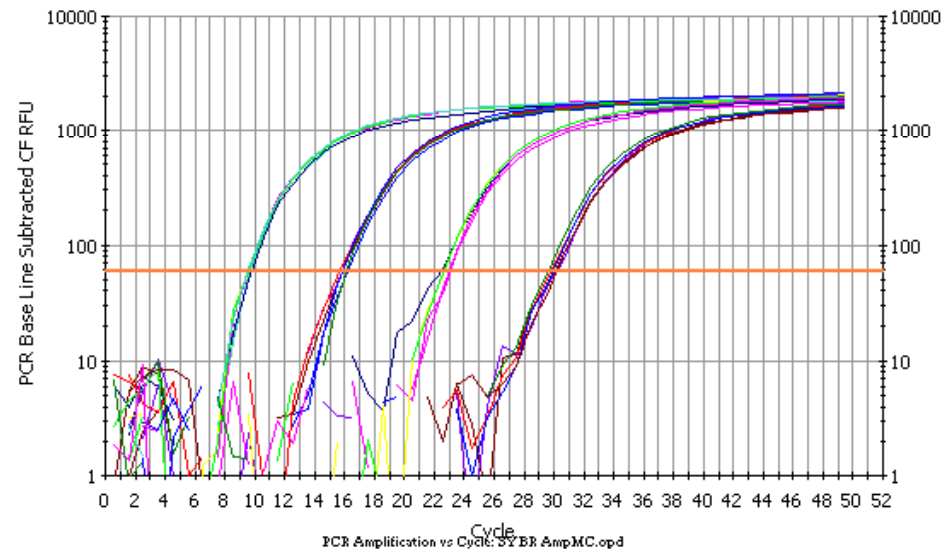
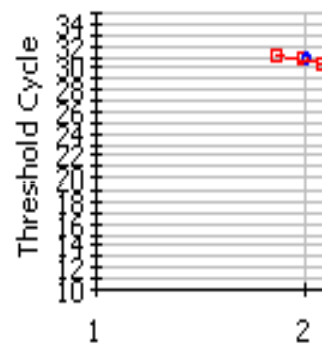


- Design d'expérience
 - Amplicon
 - Amorces
- Approches expérimentales
 - Conditions de cycles
 - ✦ Températures de réaction
 - Reaction de validation
 - Réactifs pour la préparation du template (ADNc) et expérience en qPCR
 - Technique de laboratoire

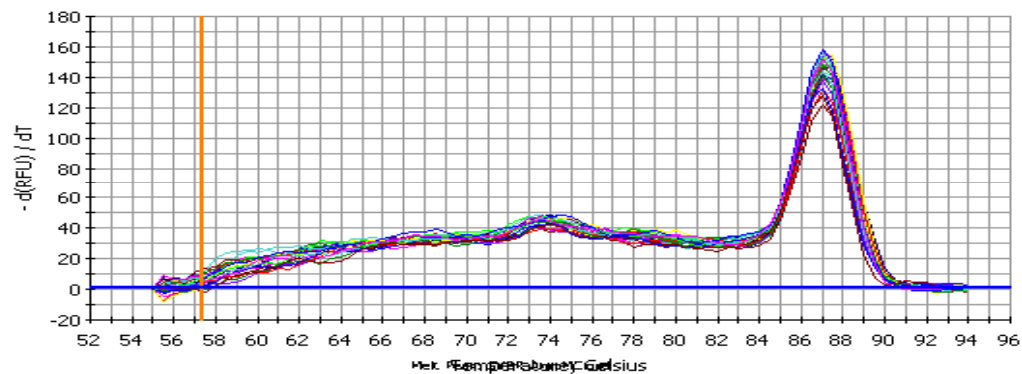
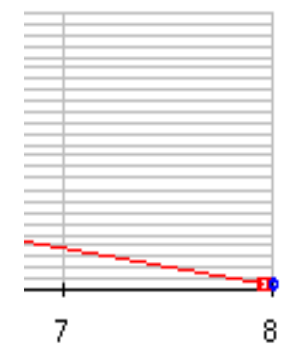
Réaction de validation avec SGI



Correlation Coefficient: 0.9
PCR Efficiency: 97.1 %



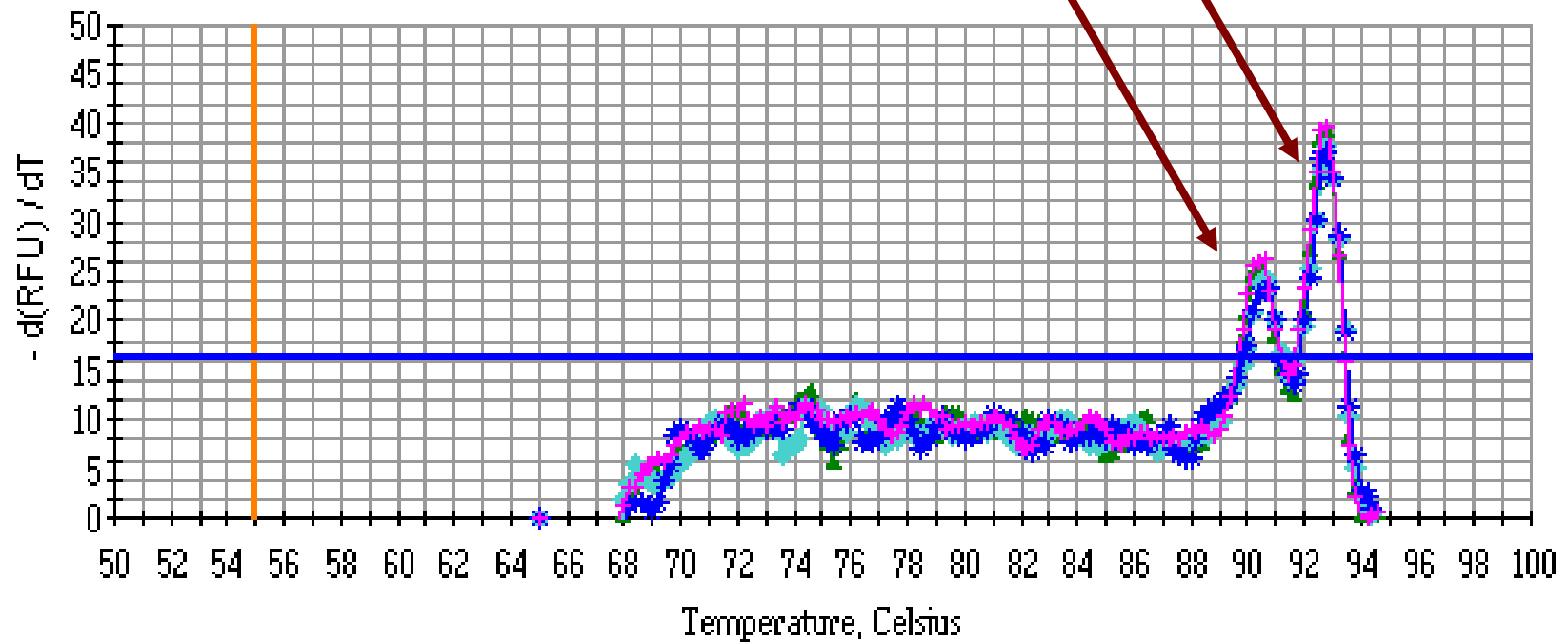
□ Unknowns
○ Standards



Analyser la spécificité : L'utilité des courbes de melting



2 produits d'amplification



Tester les variables PCR



- **Specificité**
 - Analyse de courbe de melting et gel d'agarose
- **Efficacité de PCR**
 - Pente de la courbe standard
- **Reproductibilité**
 - Déviation standard entre les réplicats
- **Sensibilité et dynamic range**
 - Validation expérimentale

Amélioration de la reproductibilité



- **Techniques de laboratoires**
 - Bench propre (hotte)
 - Utiliser des tubes à bouchons vissables
 - Utiliser embouts filtrés
 - Utiliser des micropipettes calibrées
 - Utiliser volumes assez grands (5 μ L et +)
 - Pipetter dans chaque contenant une seule fois

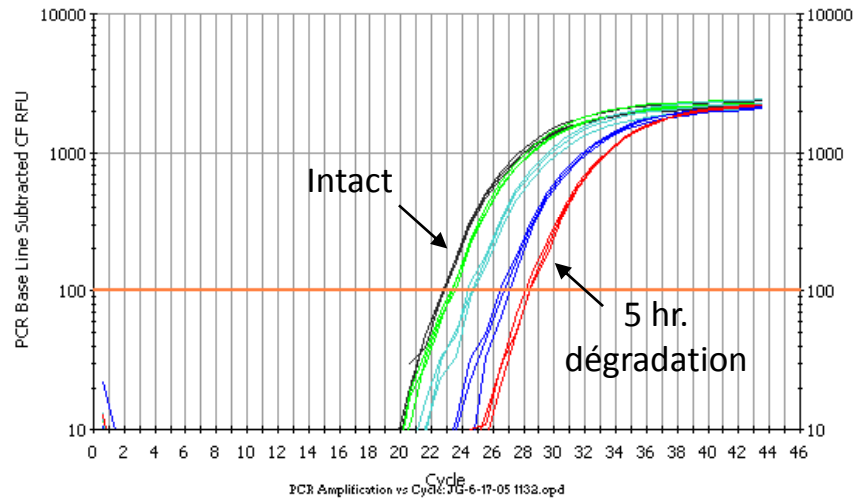
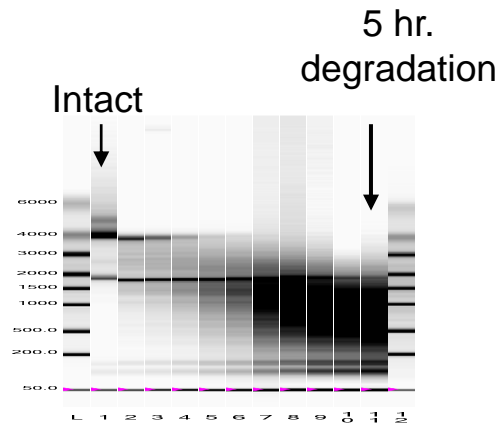
Design expérimental



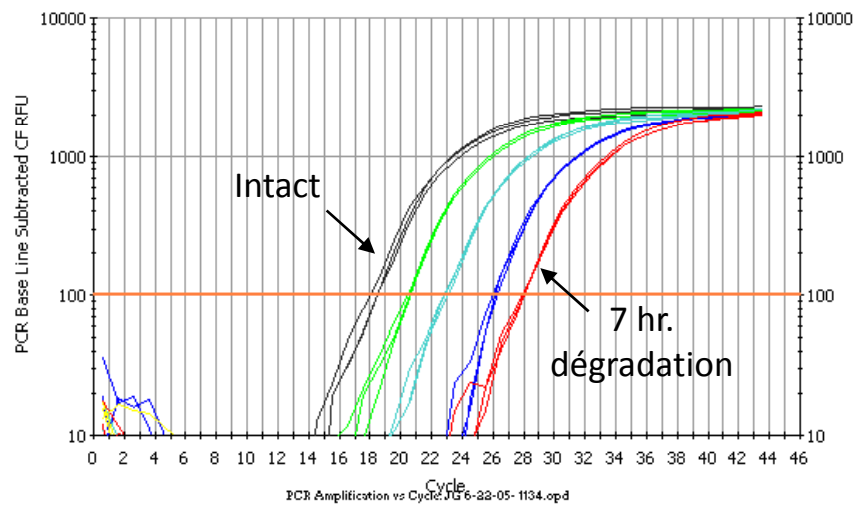
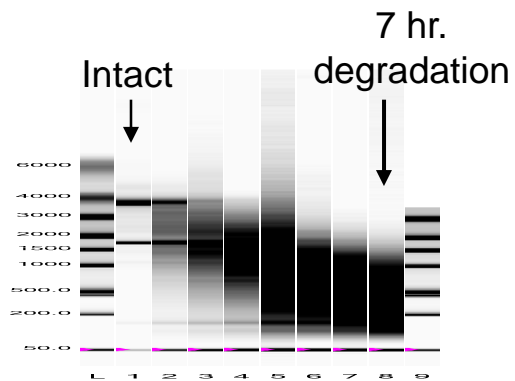
- Amorces:
 - 1 courbe standard par paire d'amorces par organisme/ type cellulaire
 - ✦ Enregistrer la courbe standard d'ADN – pour les autres essais , utiliser seulement un point comme calibrateur
 - Designer toutes les amorces à une T_m approx. semblable
- Prenez le temps de designer!
 - Utiliser les programmes virtuels (bases de donnée) pour le design des amorces (ex. Primer3)
 - Tester les amorces avec AND en utilisant un gradient de temp.
 - ✦ Examiner la courbe de melting et les produits finaux pour la pureté
 - Développer un protocole standard d'utilisation du PCR en temps réel

Analyse d'ARN total pour analyse par Microarrays

ARN normal de foie



ARN cancéreux de foie



qPCR: gène GAPDH

Merci de votre attention!



Bonne chance dans vos
expériences!

Matériel supplémentaire



OVERVIEW



tissue



extract RNA



**copy into cDNA
(reverse transcriptase)**



do real-time PCR



analyze results

OVERVIEW



tissue



extract RNA



copy into cDNA
(reverse transcriptase)



do real-time PCR



analyze results

IMPORTANCE OF RNA QUALITY



- Should be free of protein (absorbance 260nm/280nm)
- Should be undegraded (28S/18S ~2:1)
- Should be free of DNA (DNAse treat)
- Should be free of PCR inhibitors
 - Purification methods
 - Clean-up methods

OVERVIEW



tissue



extract RNA



copy into cDNA
(reverse transcriptase)



do real-time PCR



analyze results

Importance of reverse transcriptase primers

37

- Oligo (dt)
- Random hexamer (NNNNNN)
- Specific

REVERSE TRANSCRIPTION

38

- adds a bias to the results
- efficiency usually not known

OVERVIEW



tissue



extract RNA



copy into cDNA
(reverse transcriptase)



do real-time PCR



analyze results

Importance of primers in PCR



- specific
- high efficiency
- no primer-dimers
- Ideally should not give a DNA signal
 - cross exon/exon boundary



How are you going to measure the PCR product



- **Directly**
 - SYBR green
 - Quality of primers critical
- **Indirectly**
 - In addition to primers, add a fluorescently labeled hybridization probe
 - Many different approaches to this, see Bustin J.Mol.Endocrinol. (2000) 25:169

Importance of controls

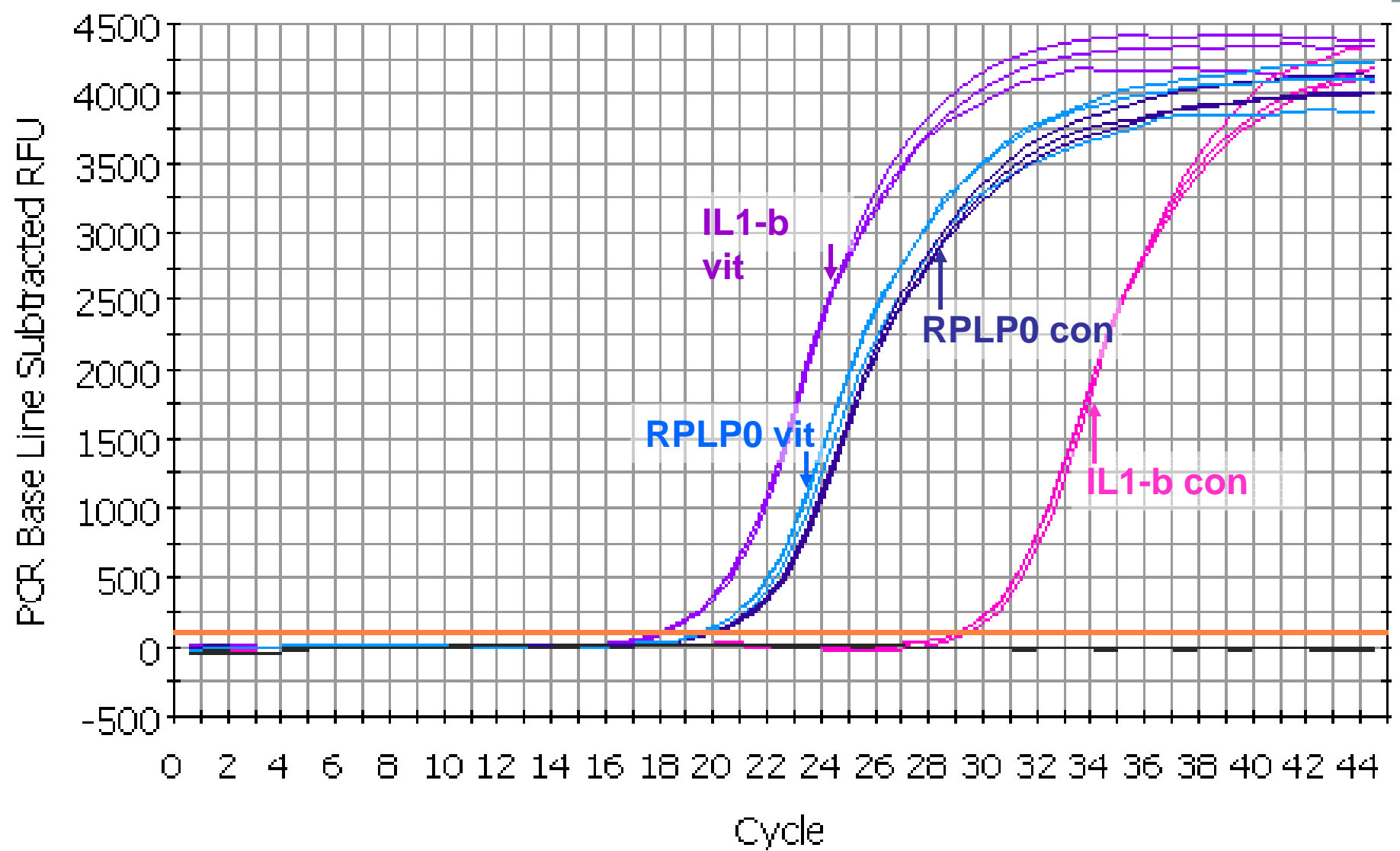


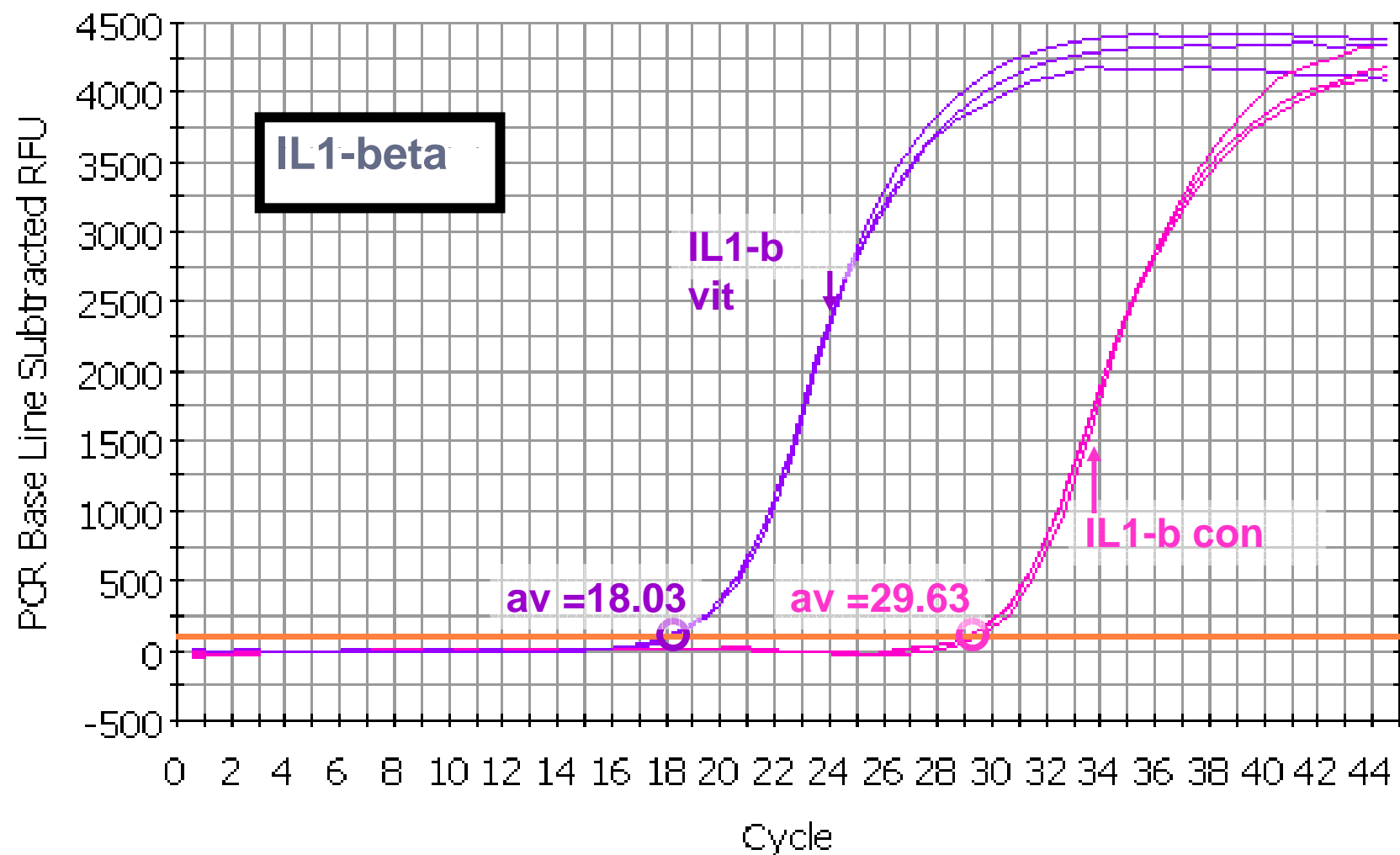
- **negative control (no DNA)**
 - checks reagents for contamination
- **no reverse transcriptase control**
 - detects if signal from contaminating DNA
- **positive control**
 - checks that reagents and primers work
 - especially important if trying to show absence of expression of a gene

Standards (References)



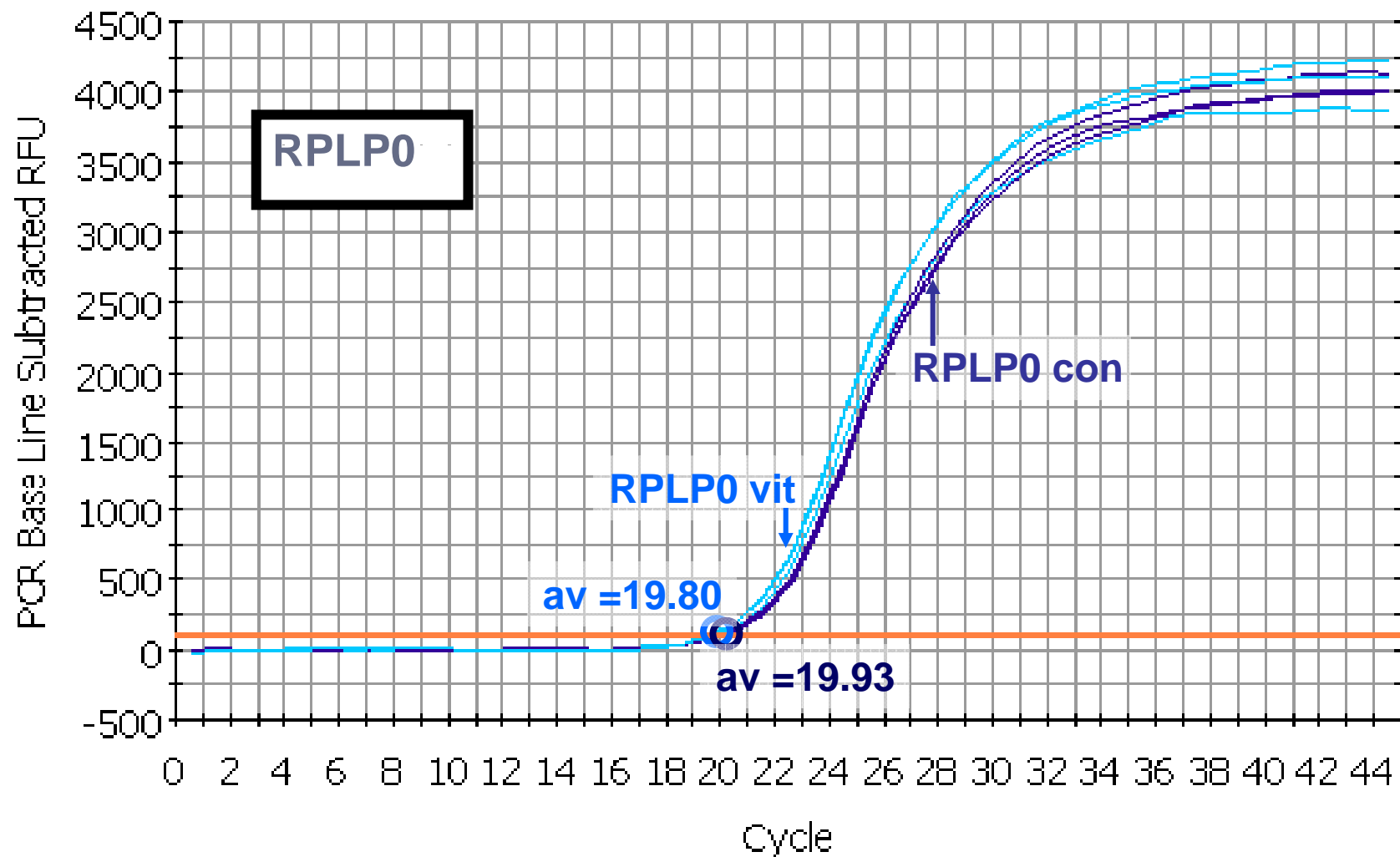
- same copy number in all cells
- expressed in all cells
- medium copy number advantageous
 - correction more accurate
- reasonably large intron
- no pseudogene
- no alternate splicing in region you want to PCR





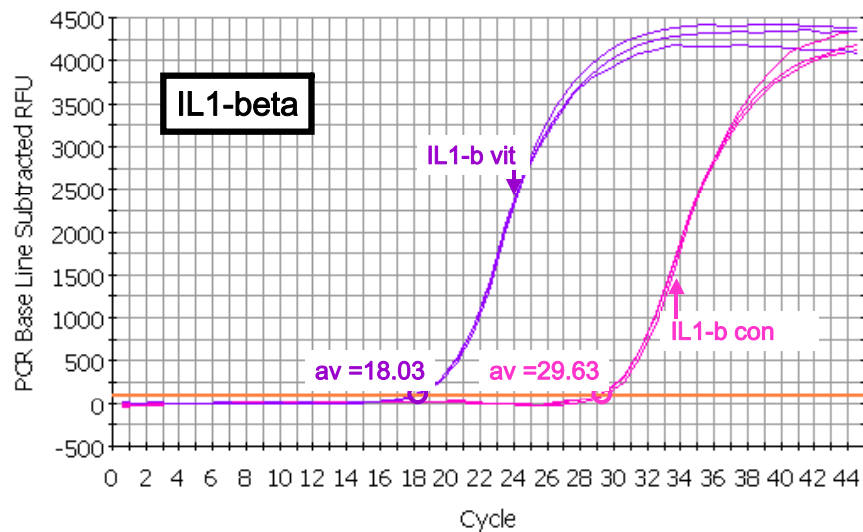
AFTER N CYCLES: change = (efficiency)ⁿ

AFTER N CYCLES: ratio vit/con = $(1.93)^{29.63-18.03} = 1.93^{11.60} = 2053$



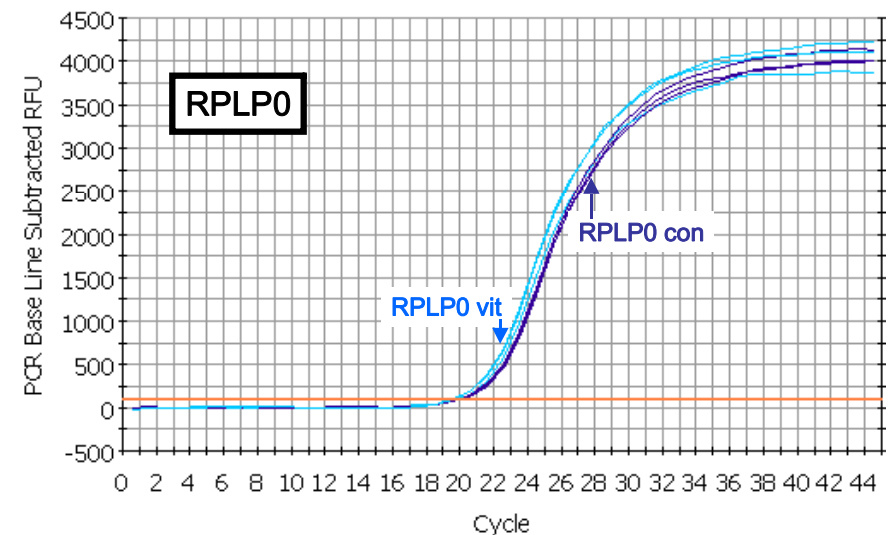
AFTER N CYCLES: change = (efficiency)ⁿ

AFTER N CYCLES: ratio vit/con = $(1.87)^{19.93-19.80} = 1.87^{0.13} = 1.08$



AFTER N CYCLES: increase = (efficiency)ⁿ

$$\text{Ratio vit/con} = (1.93)^{29.63-18.03} = 1.93^{11.60} = 2053$$



AFTER N CYCLES: increase = (efficiency)ⁿ

$$\text{Ratio vit/con} = (1.87)^{19.93-19.80} = 1.87^{0.13} = 1.08$$

$$\text{ratio} = \frac{\text{change in IL1-B}}{\text{change in RPLP0}} = 2053/1.08 = 1901$$

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta \text{Ct target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta \text{Ct ref (control-treated)}}}$$