



Diagnostics

La Quantification Relative



LightCycler®
Roche Applied Science



Real-Time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences

Stephen A Bustin

Expert Rev. Mol. Diagn. 5 (4), 493-498 (2005)

- Third qPCR Symposium held in London, UK, April 25-26, 2005
- Sondage sur les pratiques de laboratoire inhérentes à la quantification relative
- 93 laboratoires/ 21 pays d'Europe , Australie, Canada et États-Unis

Bonnes pratiques de laboratoire / Démarche rigoureuse

Analyse d'expression génique

Buts et Pré-requis

- Détection de changements subtiles des quantités d' ARNm
- Obtention de données fiables, comparables sur une longue période de temps et/ou entre différents systèmes expérimentaux.

Pré-requis:

- Mesures précises et reproductibles
- Démarche analytique rigoureuse

Quantification Relative

Étude des changements d'expression génique

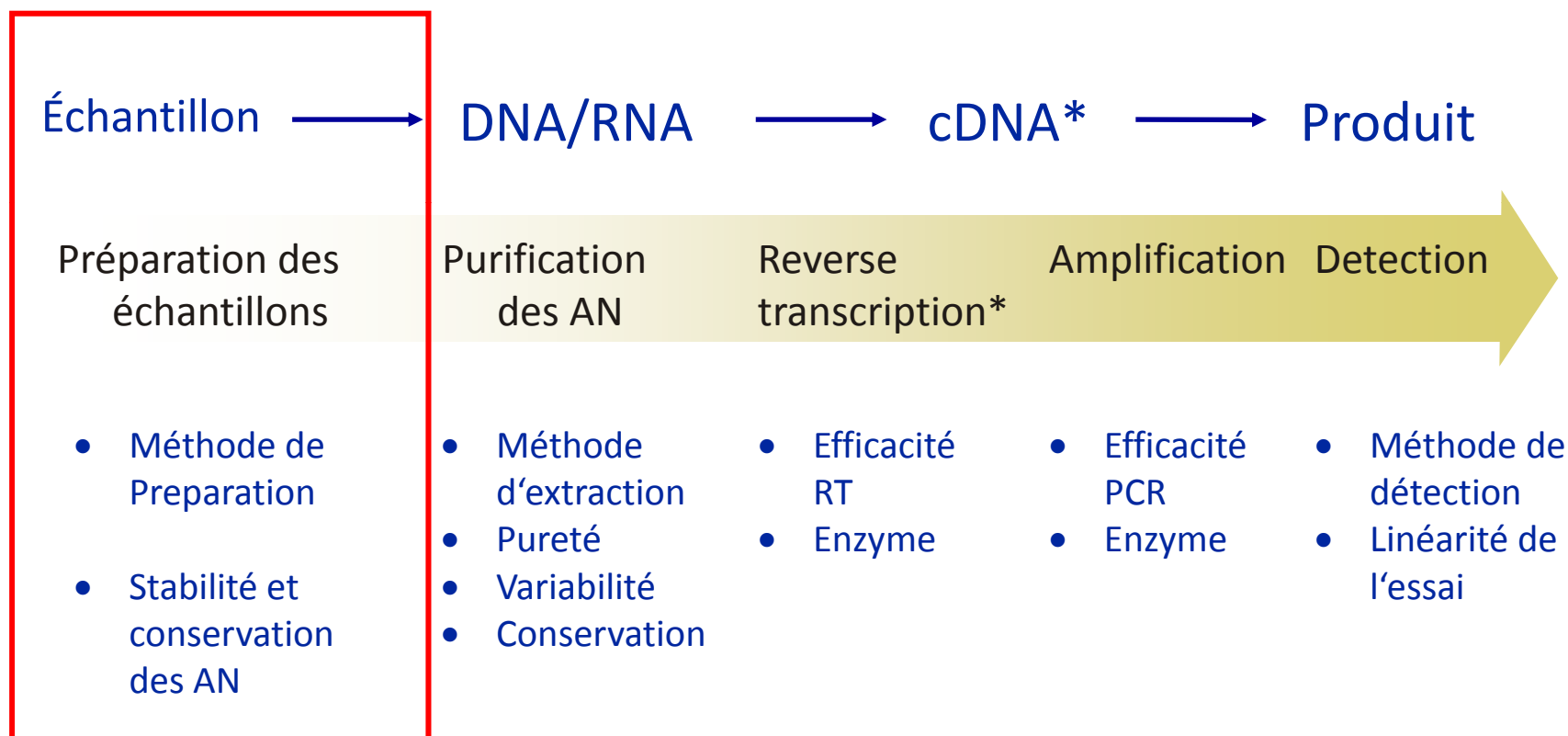
$$\rightarrow \frac{\text{Quantité d'ARN cible dans l'échantillon}}{\text{Quantité d'ARN de référence dans l'échantillon}}$$

- Le ratio relatif est une valeur normalisée qui corrige pour la quantité et la qualité de l'échantillon

*La même approche est utilisée pour déterminer l'amplification génique relative à un gène de copie unique ou pour mesurer la quantité d'acides nucléiques par cellule.

PCR en temps réel – *Démarche scientifique*

Paramètres et impacts



* RT applications

Real Time PCR

Échantillon

Prélèvement et conservation du spécimen

SOURCES DE VARIABILITÉ:

- Échantillonnage
- Conservation du spécimen

TATAA Biocenter , séminaire de BioStatistic 2006

Real Time PCR

Extraction des Acides Nucléiques

Isolation des Acides nucléiques

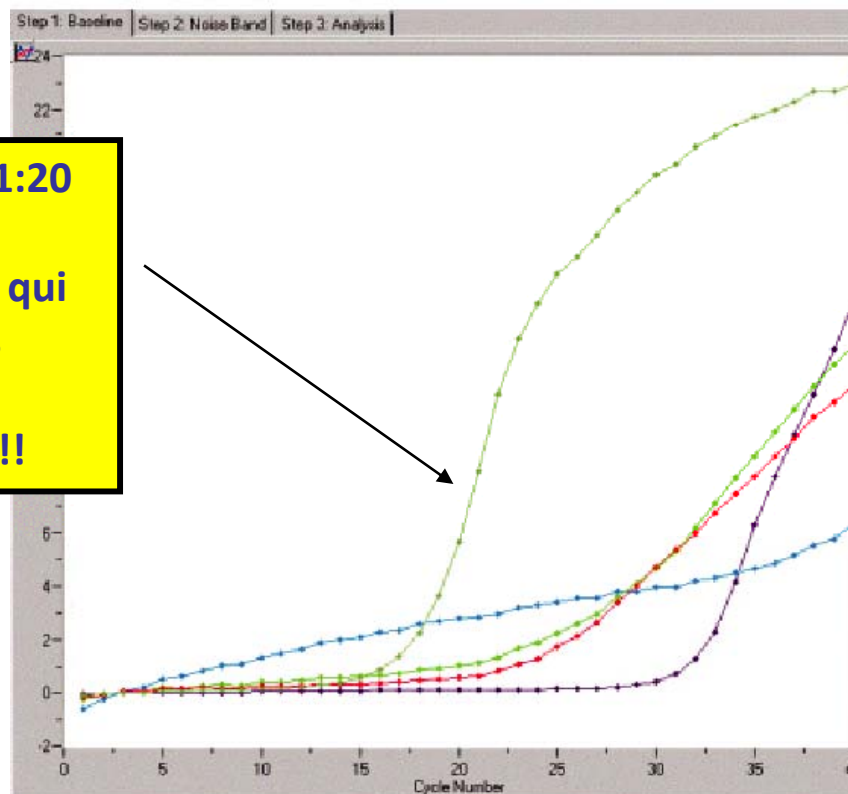
- Méthode/ Variabilité (rendement):
 - Méthodes classiques (“Boiling Prep”, CsCl Centrifugation, autres)
 - Phénol-Chlorophorme (Chomczynski and Sacchi et al (1987))
 - Méthodes sur colonnes (High Pure)
 - Méthodes basées sur particules magnétiques (Dyna)
 - Méthodes automatisées (MagNA Pure Compact et MagNA Pure LC)

*Le succès d'une réaction PCR dépend en grande partie de la **qualité** du gabarit d'acides nucléiques!*



Présence d'inhibiteurs

ADNc dil 1:20
est la
condition qui
donne les
meilleurs
résultats!!!

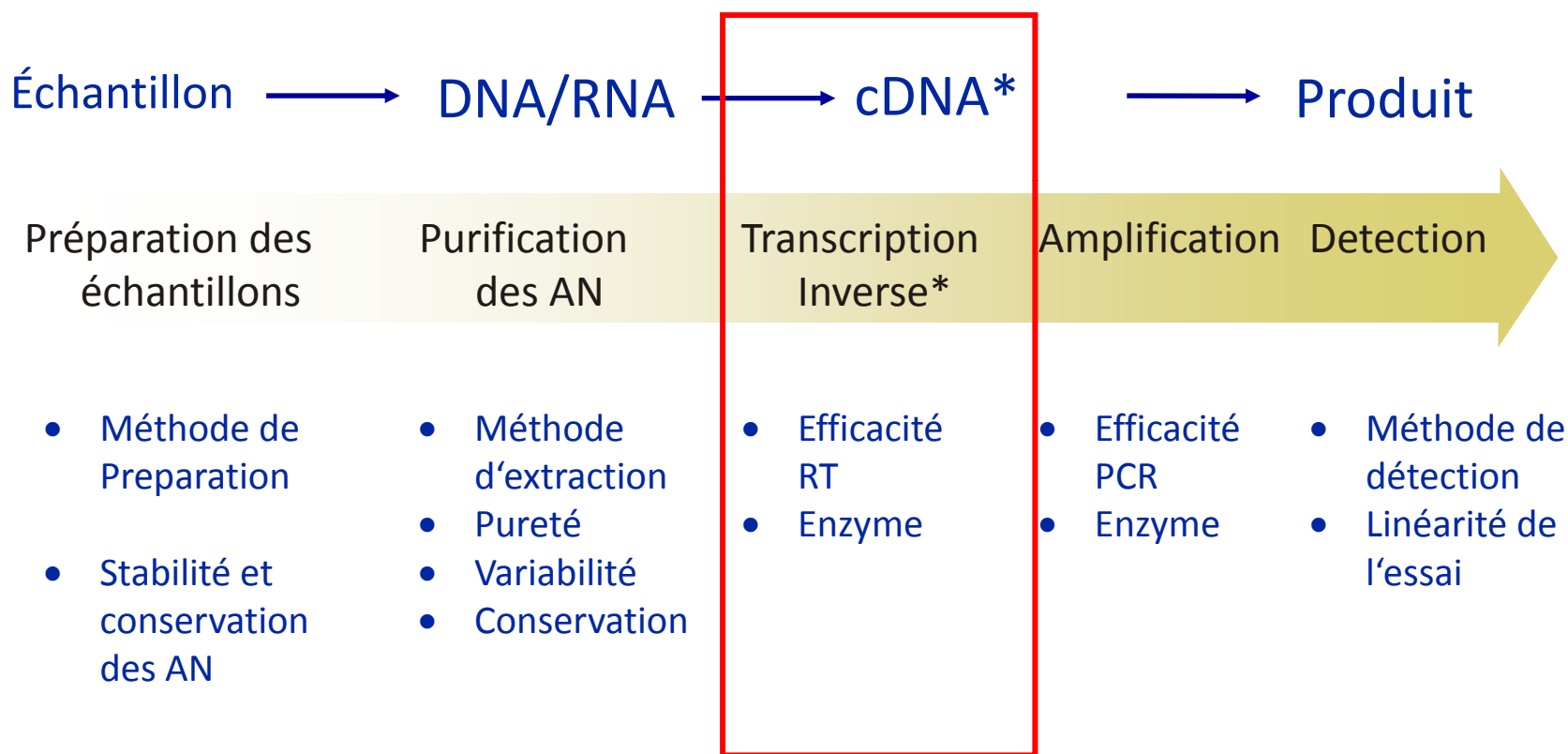


- NTC
- cDNA original
- cDNA 1:2
- cDNA 1:4
- cDNA 1:20

PCR en temps réel – *Démarche scientifique*



Paramètres et impacts



* RT applications

Real-Time qPCR

Reverse Transcription

Reverse Transcription

- **Choose the right enzyme**
 - According to the GC content and the target sequence
 - For higher % GC , perform the RT reaction at high temperature
- **RT Buffer**
 - Choose the RT kit and the PCR kit accordingly
- PCR reaction based on Mg shouldn't be performed with a K based RT

Impact du choix d'amorçage

Table 2. Dependence of reverse transcription yield on priming strategy.

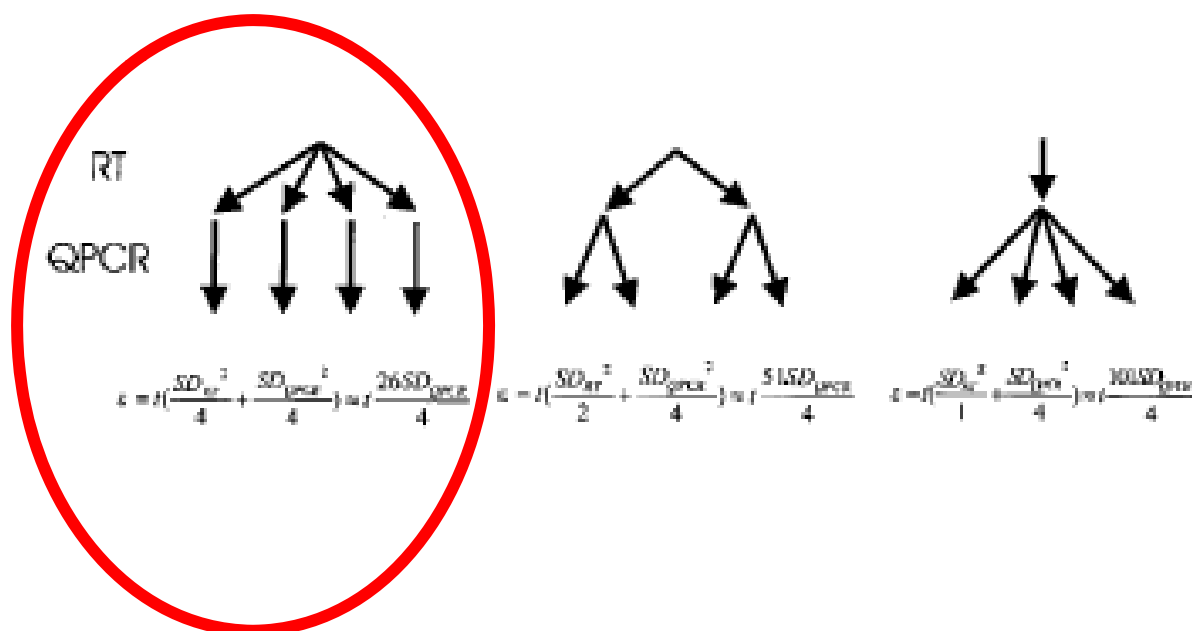
Priming strategy	Ct ^a				
	β -Tubulin	CaV1D	GAPDH	Insulin II	Glut2
Random hexamers	19.5	<u>26.5</u>	<u>15.8</u>	16.9	<u>27.5</u>
Oligo(dT)	<u>18.1</u>	28.8	16.6	<u>15.9</u>	28.4
Gene-specific primers	18.8	28.7	16.4	17.4	31.8
Mixture ^b	19.1	27.9	16.2	16.6	29.3
Maximum ΔCt^c	1.4	2.3	0.8	1.5	4.4

^a The priming strategy that gave highest reverse transcription yield for each gene is underlined. For β -tubulin, CaV1D, and insulin II, the optimum priming strategy is better than its alternatives with 99% confidence.

REF: Stahlberg et al.,
Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification
 Clinical Chemistry 50,509,2004

Recommandations de l'auteur

- Tester l'efficacité de la RT avec différents amorçages
- Quantifier votre ARN et standardiser votre concentration lors de la RT
- Travailler au minimum en duplicata en commençant par la réaction de RT



Transcription Inverse...

Two-step RT-PCR ou One-step RT-PCR ?

Two-step RT-PCR

- Plusieurs réactions PCR possibles via une seule réaction RT
- Travail à partir un pool d'ADNc commun
- Flexibilité dans le choix d'amorçage (oligo dT, random hexamers, amorce spécifique)
- Choix du système RT (compatibilité des sels de RT et PCR)
- Conservation des ADNc à long terme

One-step RT-PCR

- Toute la réaction RT-PCR dans un seul tube; diminution des risques de contamination
- Rapide
- Amorçage spécifique

Choosing Reference Genes

Definition of Housekeeping Genes

- Housekeeping genes code for proteins that are essential to cellular function
- Assumptions:
 - Housekeeping genes are expressed constitutively and their expression levels are identical in all samples to be analyzed
 - Expression level is not regulated in the experimental system
 - normal vs. tumor tissue or treated vs. untreated cells
- Endogenous control for quantitative assays

Sélection d'un gène domestique approprié en trois critères...

- Niveau d'expression non régulé dans le système à l'étude.
 - Normal versus tumeur
 - Non stimulé versus stimulé

- Détection spécifique de l'ARN
 - Pas de pseudogène!
 - Amplification/détection spécifique à la séquence ciblé

- Niveau d'expression semblable à celui de la cible

Gènes domestiques

Exemples

Gene	Genomic Structure/Pseudogenes	Regulation e.g.,
β -actin	multigene family; > 20 genes; 1 active locus 20 pseudogenes	\uparrow : hormones of thyroid gland \uparrow : stomach tumor
g-actin	multigene family; pseudogenes	
GAPDH	multigene family; 10-30 genes; > 200 in mouse mostly pseudogenes	\uparrow : lung, pancreatic, colon cancer \uparrow : insulin, EGF
5.8S, 18S, 28S RNA	pseudogenes	
β 2-microglobulin	no pseudogenes	\uparrow : Non-Hodgkin lymphoma abnormal expression in tumors
G6PDH	no pseudogenes	\uparrow : kidney, stomach tumor \uparrow : hormones, oxidant stress, growth factors
PBGD	no pseudogenes	
aldolase	pseudogenes	
HPRT	pseudogenes	
U3, U8, ...	Pseudogenes	
ornithine decarboxylase		\uparrow : tumors

LC 15/02 Selection of Housekeeping Genes

<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/>

Sélection d'un gène domestique

But: *Démontrer que le protocole expérimental n'influence pas l'expression du gène de référence.*

Analyses du même type de prélèvement ou autres types

À partir de quantités égales de matériel extrait :

- Préparer les réplicats de chaque échantillon (n=5)
 - Pré-traitement (temps 0)
 - Post-traitement
- RT-PCR (préalablement optimisé!)
- Analyse des Cp

Un bon gène de référence devrait avoir un Cp similaire pour chaque échantillon.

Son expression sera considérée comme étant constante!

Selection of a Housekeeping Gene

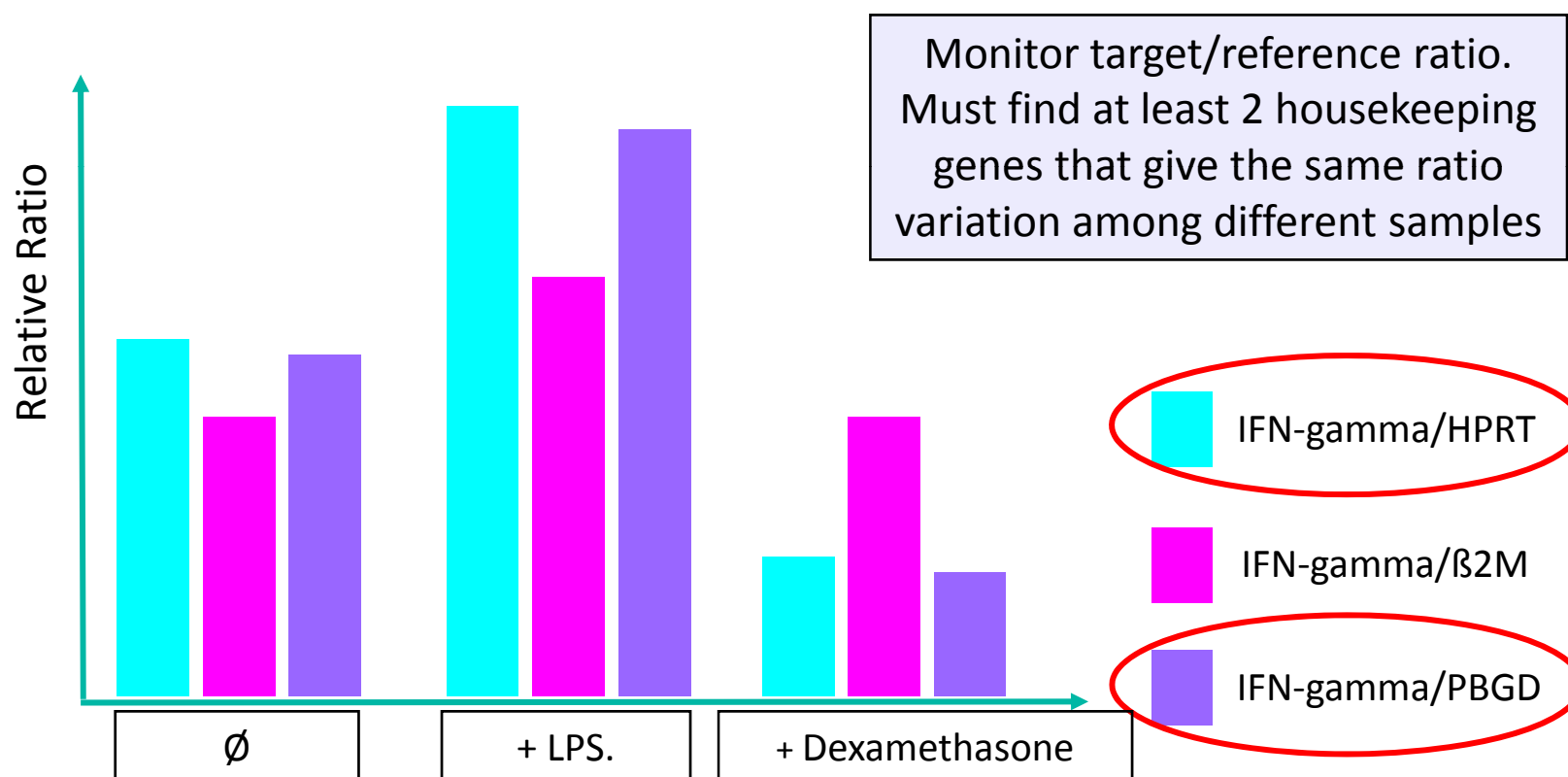
Analysis with the different tissues or cell lines

Start with equal quantities of extracted material

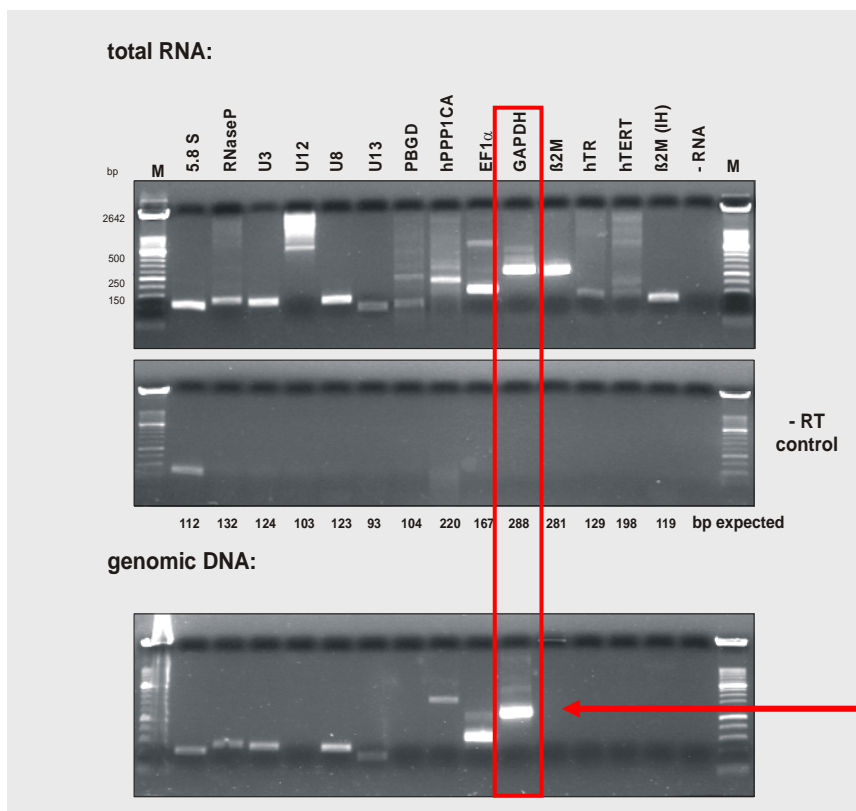
- Set up replicates of each sample (n=5)
- For each tissue:
 - Pre-treatment (time = 0)
 - Post-treatment
- RT-PCR (ensure it is optimized)
- Analysis of Cp

*A good reference gene should have a similar Cp for each sample.
Expression is therefore constant.*

Selection of a HK Gene: with an Unknown Starting Template Amount



Déceler la présence de pseudogènes



Bonne référence:

Mutimer *et al* . “Pitfalls of processed pseudogenes in RT-PCR” Biotechniques. April 1998. Vol 24. Pp 585-588

Pseudogène GAPDH

200 ng total RNA and 100 ng genomic DNA from HeLa cells were analysed.

LightCycler® Human Housekeeping Gene Set



Diagnosics

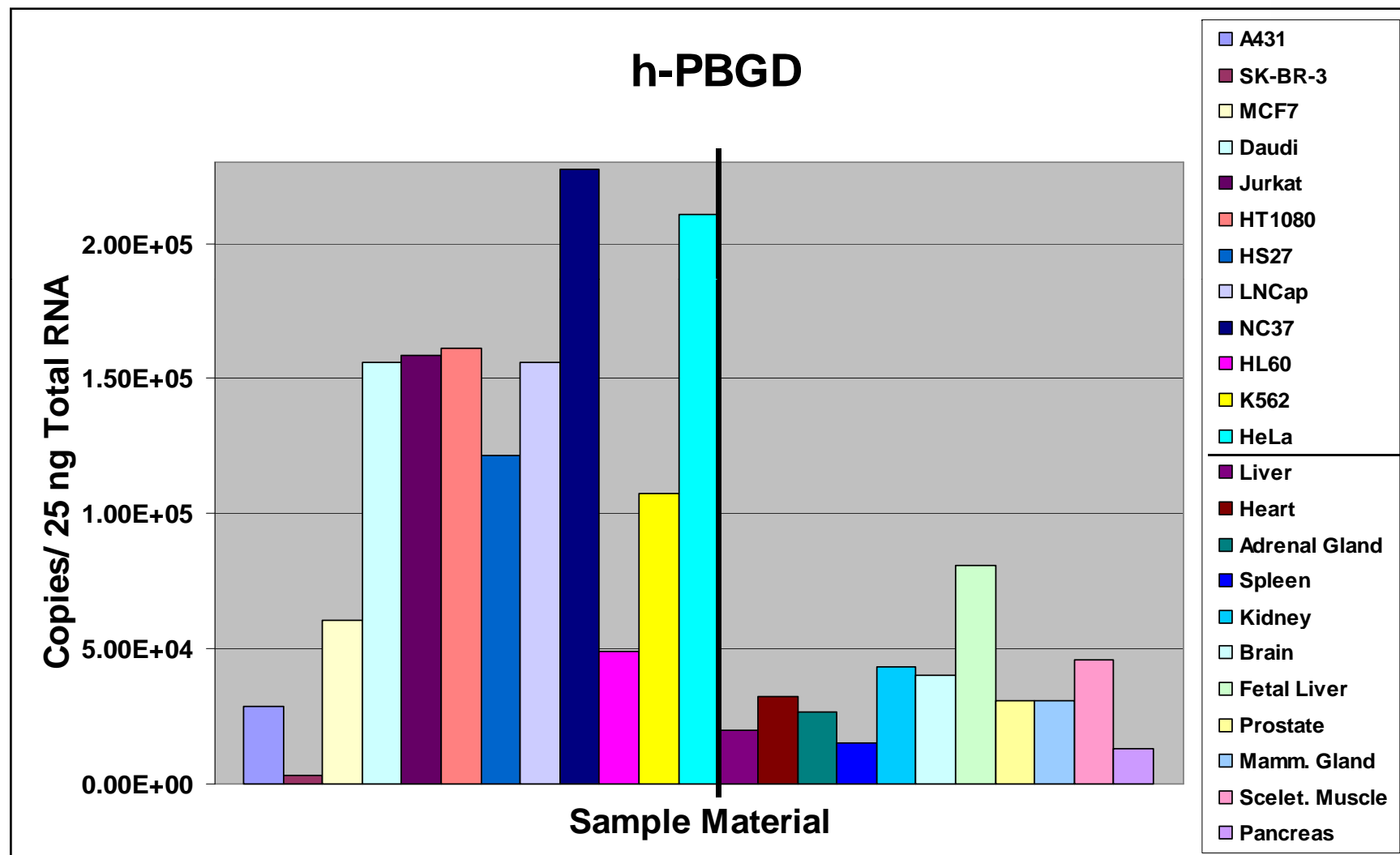
Mélange de Détection (amorces/sondes HybProbe) et transcrits *in vitro* pour gènes domestiques

- **Gènes domestiques ayant un faible niveau d'expression :**
 - **PBGD:** Phorphobilinogen deaminase (Cat No. 03 146 073 001)
 - **HPRT:** Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Cat No. 03 261 891 001)

- **Gènes domestiques ayant un niveau d'expression moyen :**
 - **β_2 M:** β_2 -Microglobulin (Cat No. 03 146 081 001)
 - **G6PDH:** Glucose-6-phoshate dehydrogenase (Cat. No. 03 261 883 001)
 - **ALAS:** Delta-aminolevulinate-synthase (Cat. No. 03 302 504 001)

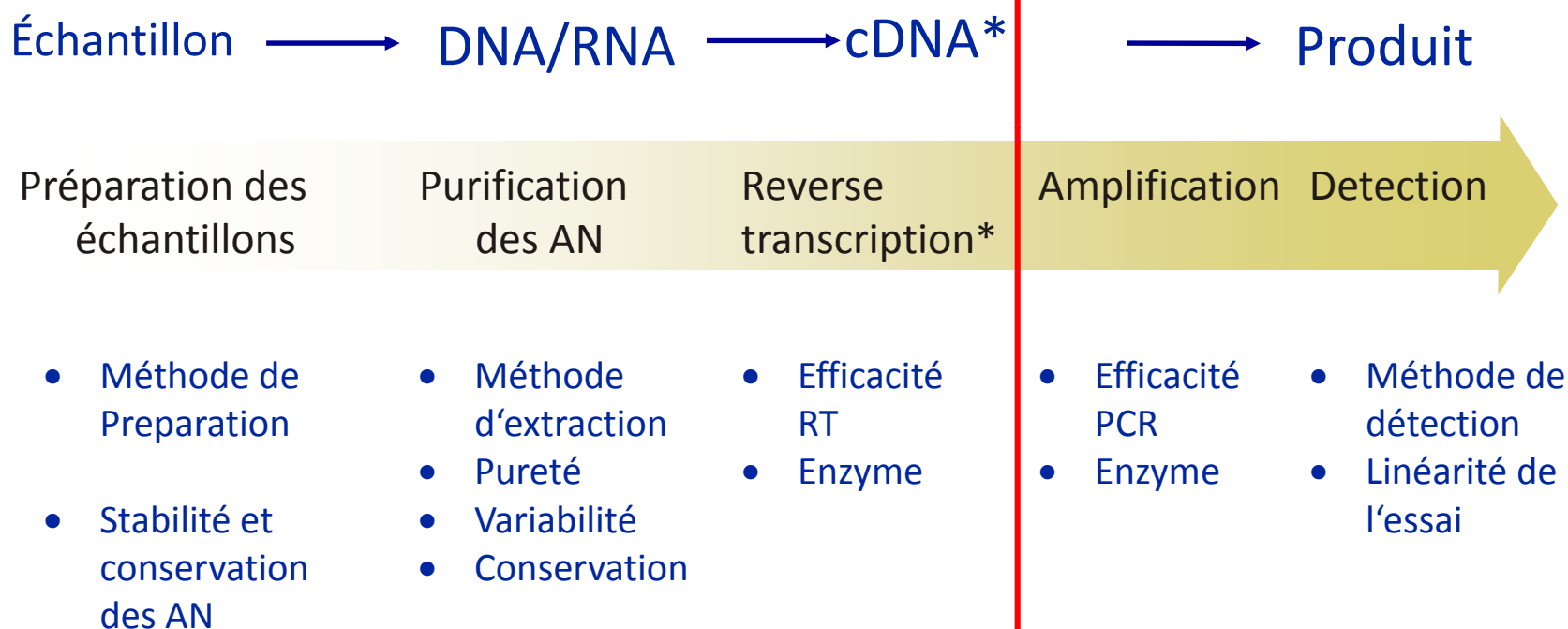
Niveau d'expression

h-PBGD dans tissus et lignées cellulaires



PCR en temps réel – *Démarche scientifique*

Paramètres et impacts



* RT applications

Real Time PCR

Amplification- Quantification Relative

$$\frac{\text{Quantité d'ARN cible dans l'échantillon}}{\text{Quantité d'ARN domestique dans l'échantillon}}$$

- Design et qualité des amorces
- Choix du format de détection
- Design des sondes (longueur de l'amplicon, contenu en GC)
- Choix de l'enzyme qualité/variabilité
- Optimisation de la réaction PCR
- Evaluation de l'Efficacité de la réaction PCR

A propos des amorces,

- **Longueur** 16-24 bases
- **Séquences** devraient ...
 - ne pas être complémentaires entre elles en 3'
 - ne pas contenir de structures secondaires internes
 - éviter les séquences répétitives (\geq GGG en séries)
 - contenir une distribution balancée de domaines riches en GC et AT
 - avoir quelques "A" et "T" en 3'
- **Contenu en GC** - 40-60% GC, contenu en GC similaire
- **Melting temperature** - Température d'annealing 55-60°C, Tm similaires
- **Design** - Amorces designées par un logiciel
- **Purification** - Pour une sensibilité maximale; purification HPLC
- **Stock solution** - Resuspendre dans TE plutôt que dans l'eau

Pour plus d'information : Technical Notes LC 1/update 2002 et LC 9/2000

<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/>

Optimisation 101

REF: Technical Notes No 1-5 et 9

Première expérience:

- Titration d'MgCl₂ ou LC FastStart Master SYBR Green 1 PLUS
- Température d'annealing: Selon les recommandations du fournisseur
- Concentration du gabarit: Essayer plusieurs dilutions (minimum 2)
 - ADN génomique 50 ng - 5 pg
 - Plasmide approx. 10⁶ copies
 - ADNc : 2 µl de produit RT , Dilutions 1:10 et 1:100
- Toujours inclure un contrôle négatif !!!

Optimisation 201

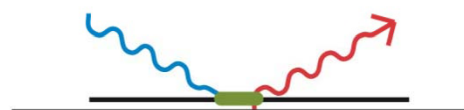
Expériences supplémentaires, si nécessaire:

- Température d'annealing. Faire varier de 1- 2°C
- Programmation particulière Diminution du taux de transition de la température de 2- 5°C/s entre l'annealing et l'élongation
- Addition de DMSO Essayer 2-5 % pour les matrices riches en GC
- Concentration d'amorce Faire varier entre 0.3 et 1.0 µM
- Concentration des sondes Faire varier entre 0.15 et 0.4 µM pour une ou les deux sondes d'hybridation

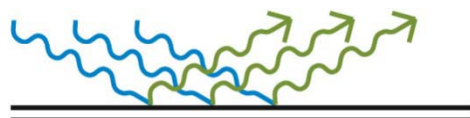
Formats de détection



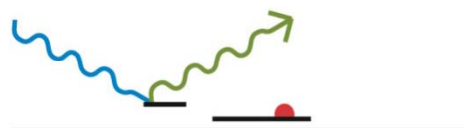
Diagnosics



Sondes d'Hybridation

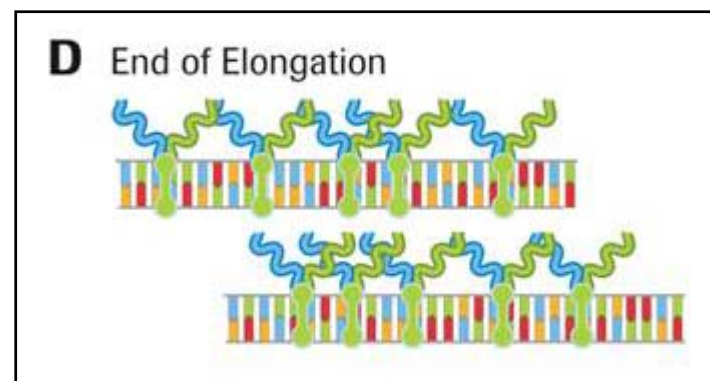
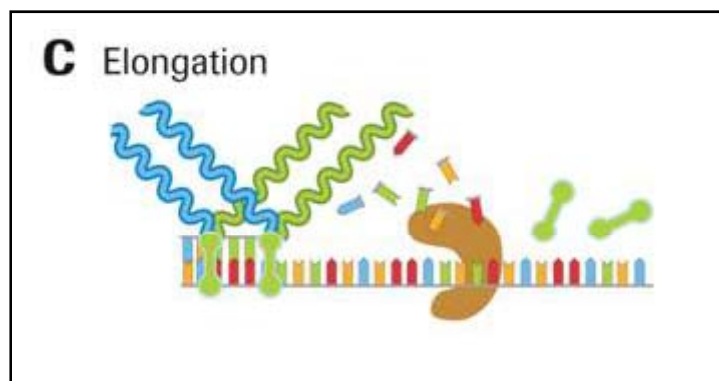
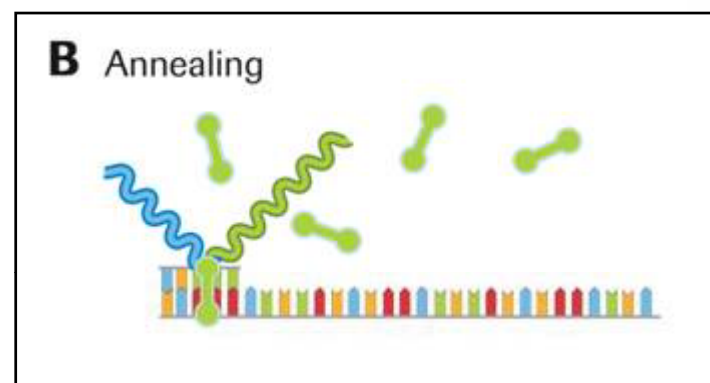
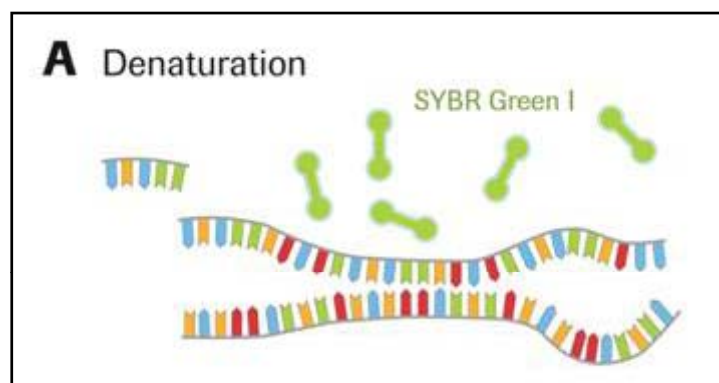


SYBR Green I

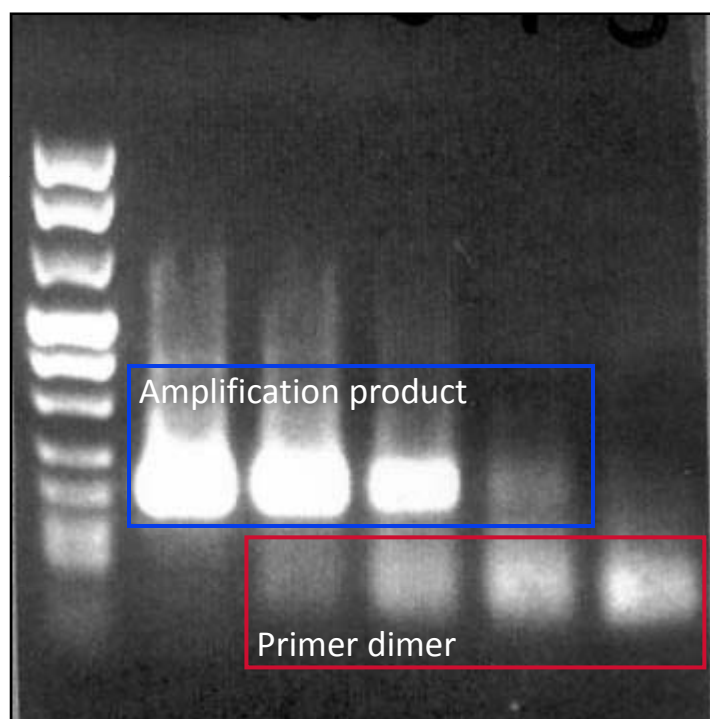


Sonde d'Hydrolyse

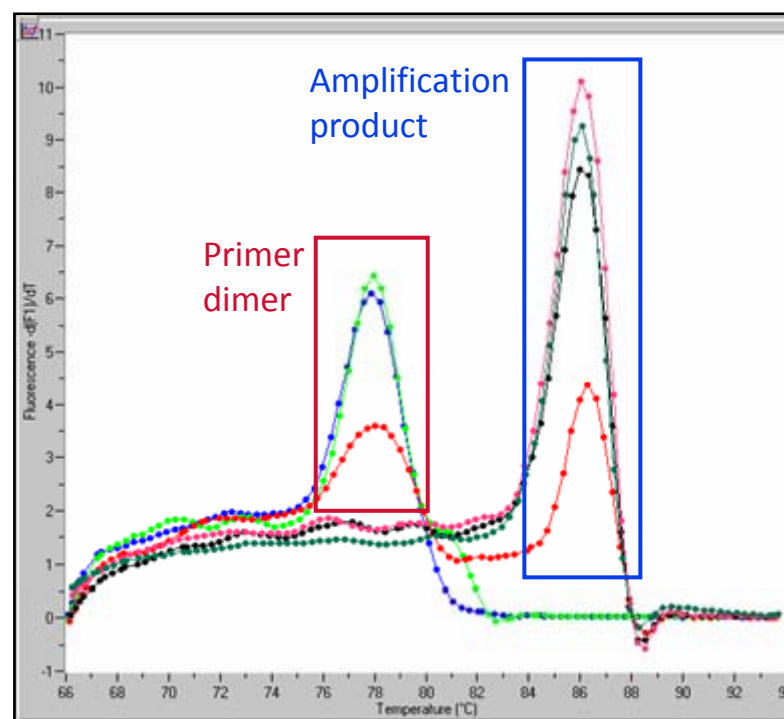
Détection avec le *SYBR Green I*



Visualisation de dimères d'amorces



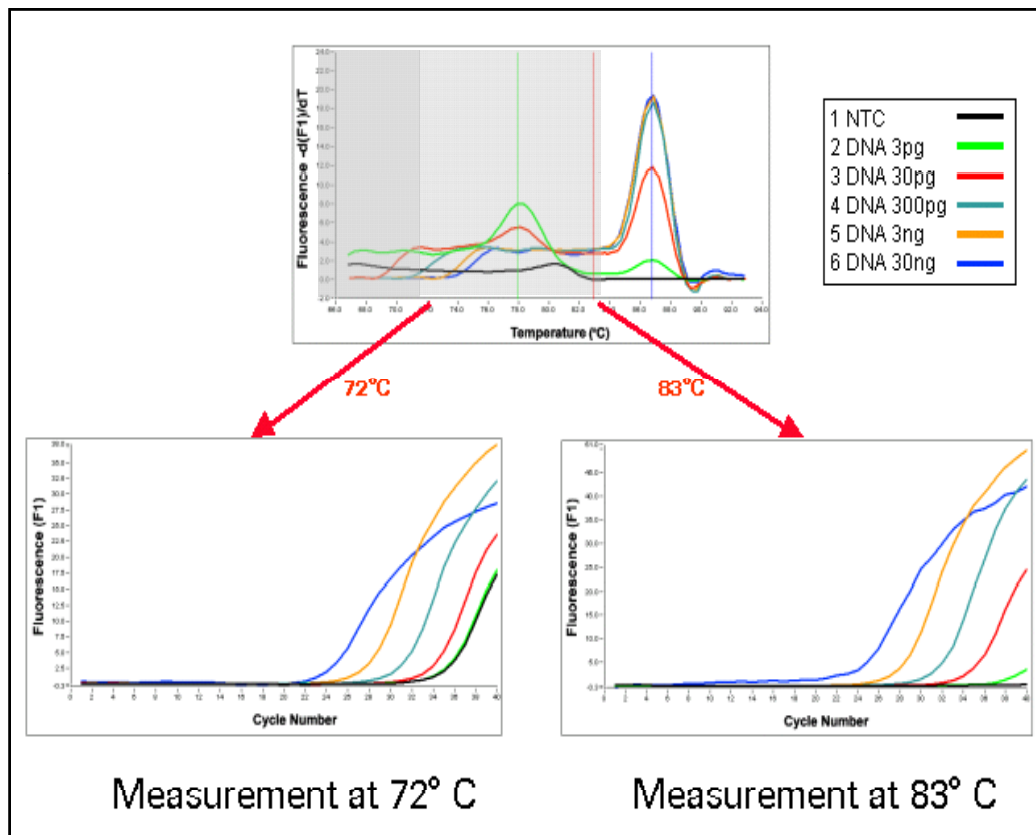
Gel électrophorèse



LightCycler® melting curve

SYBR Green I Detection Format

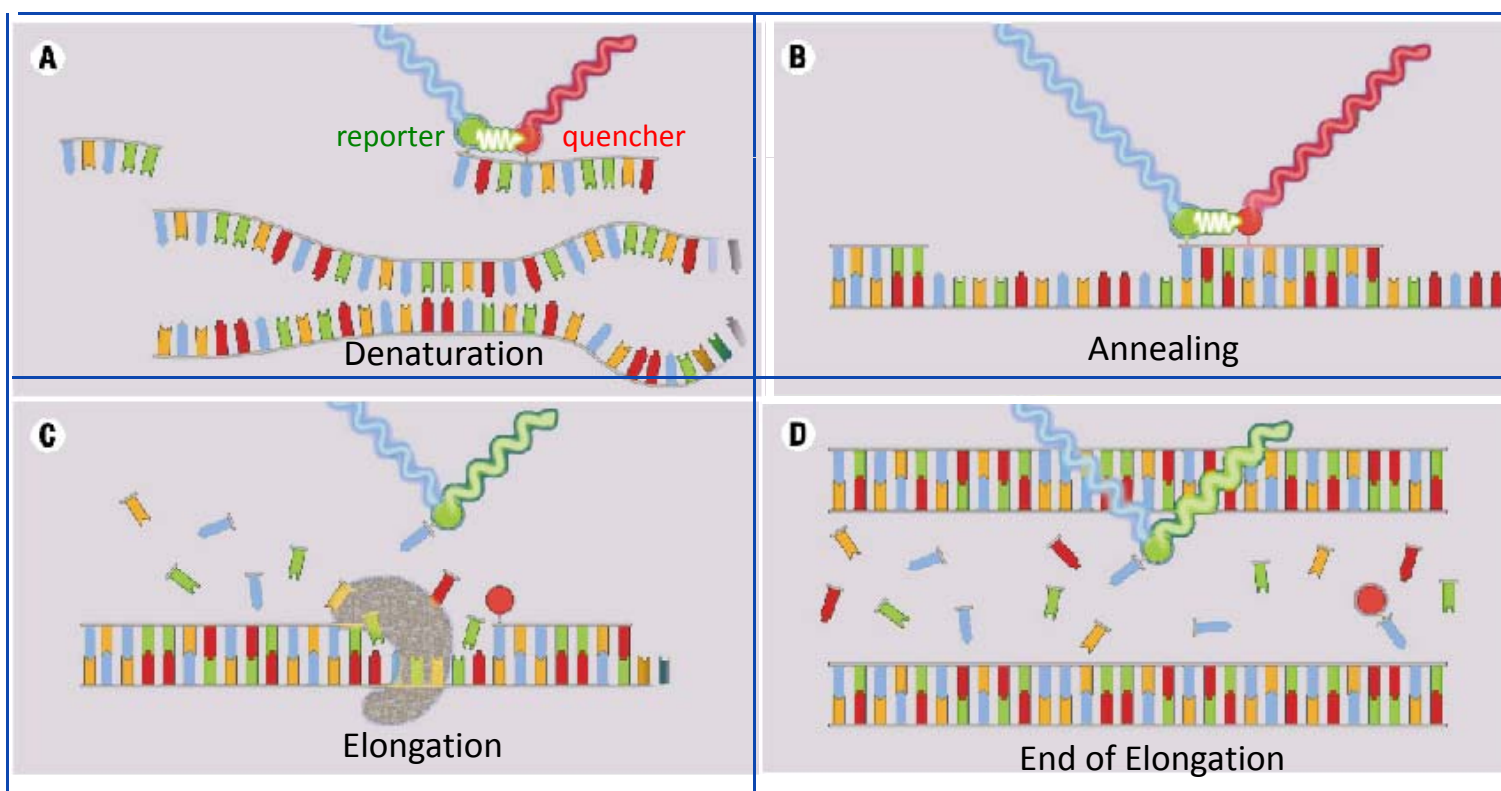
Improving Detection Specificity



- Programming a fourth segment to read fluorescence at elevated temperature (e.g., 83°C)
- At elevated temperature, primer dimers have melted off DNA
- Still primer dimers affect PCR
- For more information see technical note 1/update 2002

Sonde d'Hydrolyse

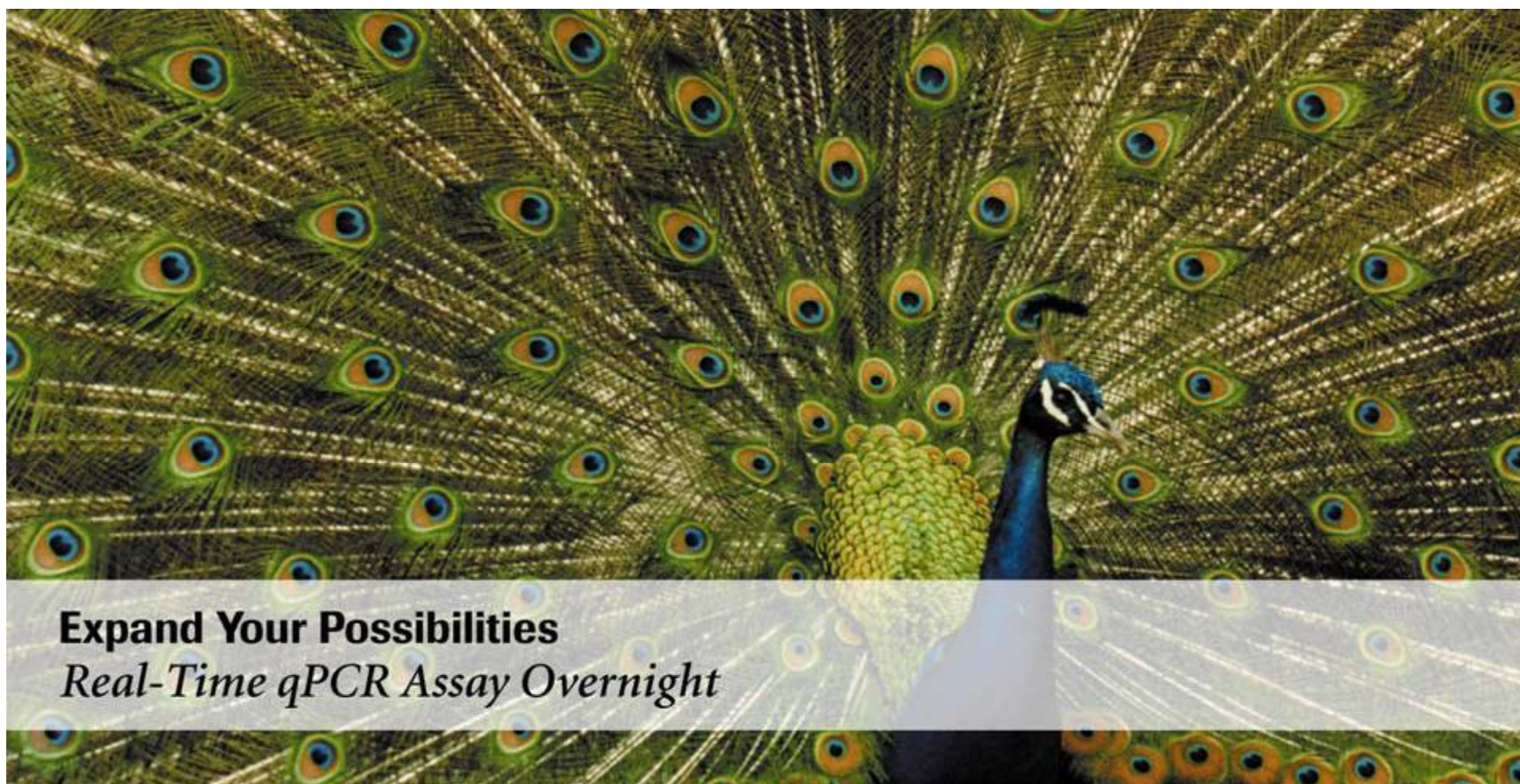
Détection spécifique d'une séquence ciblée





Diagnostics

Universal ProbeLibrary *Roche Applied Science*



Expand Your Possibilities
Real-Time qPCR Assay Overnight

Universal ProbeLibrary

Occurrence des séquences de 9-mers dans les transcrits humains.

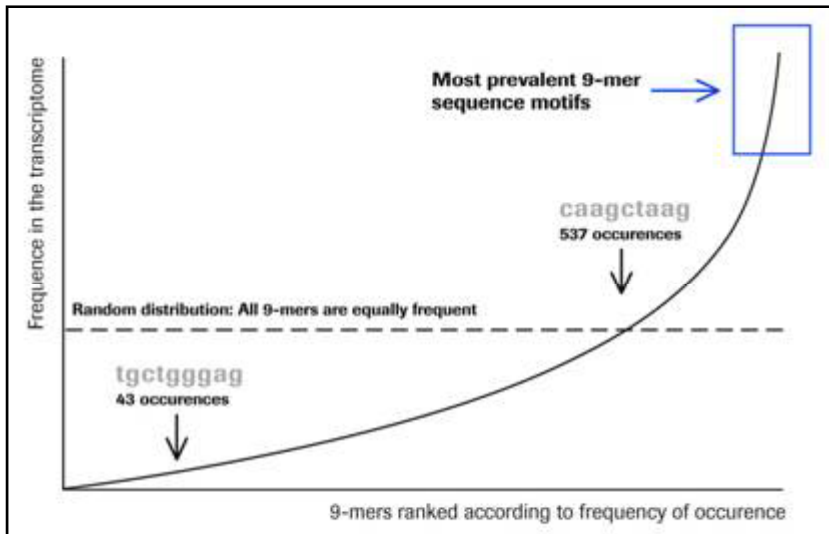
```
atgctgttgctgggagctgttctactgctattagctctgccgggt  
atgctgttgctgggagctgttctactgctattagctctgccgggt  
atgctgttgctgggagctgttctactgctattagctctgccgggt  
atgctgttgctgggagctgttctactgctattagctctgccgggt  
... etc...etc...
```

1. Analyse du transcriptome humain afin d'identifier toutes les séquences de 9-mers possible.

2. Classer les séquences de 9-mers en ordre de fréquence d'occurrence dans le transcriptome.

3. Identification des séquences de 9-mers les plus prévalentes.

• Au total 165 sondes ont été retenues!

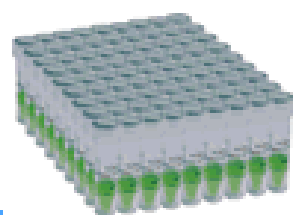


Universal Probe Library Workflow

www.universalprobelibrary.com

Universal ProbeLibrary Set

Assay Design Center



100 %

Human

Mouse

C.elegans

Rat

Arabidopsis

Primates

Drosophila

Universal ProbeLibrary Workflow

DAY
1

Design a custom assay in seconds at
www.universalprobelibrary.com

Order assay-specific primers from your
preferred oligo supplier for overnight delivery

DAY
2

For 2-step qRT-PCR, use the **Transcriptor
First Strand cDNA Synthesis Kit**

Take the appropriate probe from the
Universal ProbeLibrary Set in your freezer

Perform real-time PCR on any thermal
block-based cycler with the **FastStart
TaqMan® Probe Master**

Summary

Performance of the Universal ProbeLibrary

- Comparable sensitivity of Universal ProbeLibrary assays to SYBR Green I and other probe-based assays.
- Advantage over SYBR Green I: No primer dimers detectable due to detection with specific probes.
- Advantage over probe based assays: Time to result within 2 days (instead of 1 week), less expensive than regular probe assays.
- Reproducible and reliable results on LightCycler[®] Instruments (and competitor's instruments).

Comparison of Efficiency

Example: Housekeeping Genes

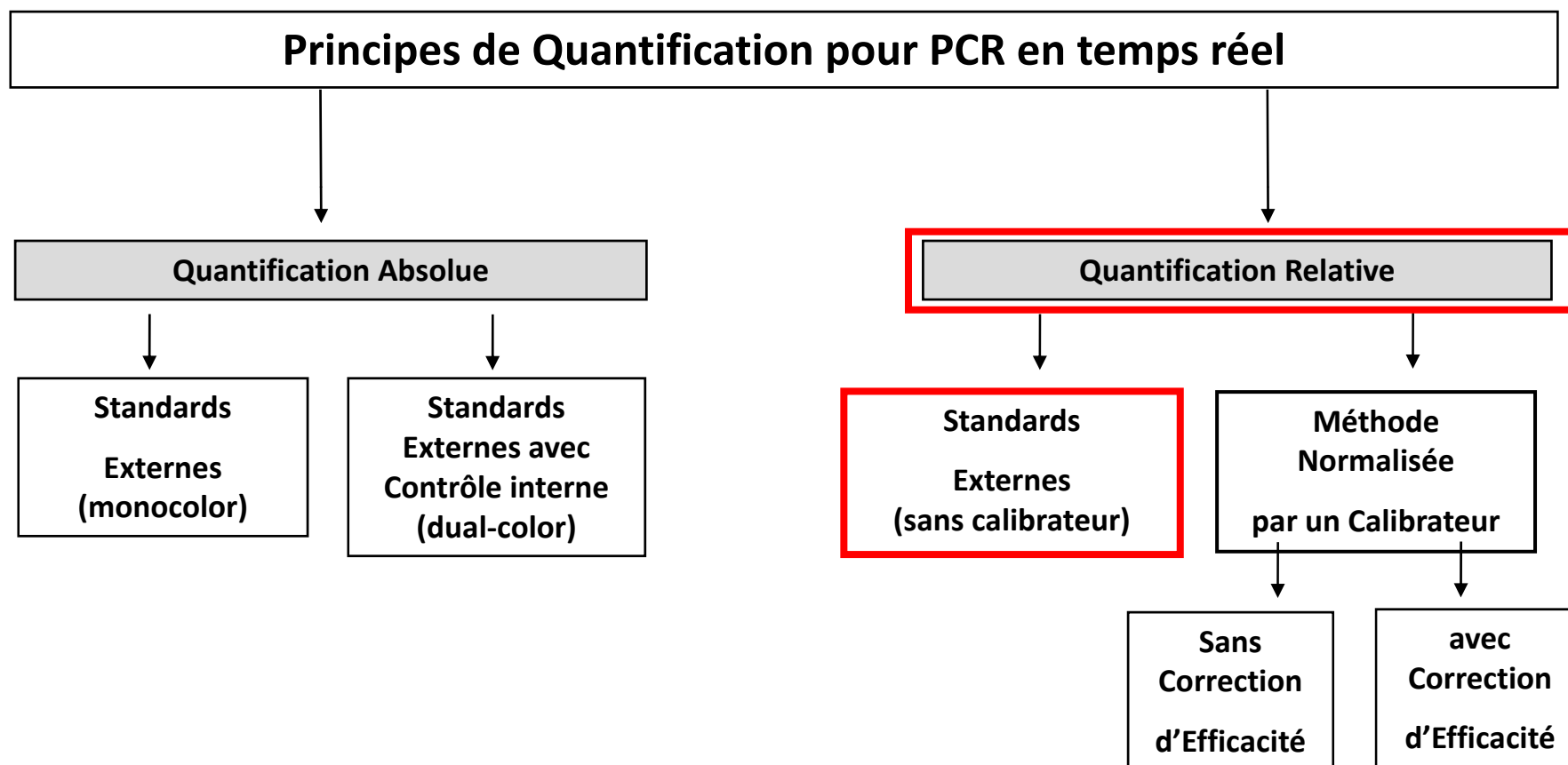
- Comparing RAS Housekeeping Gene Sets with same parameter as Universal ProbeLibrary Assay on LightCycler® 2.0 Instrument showing comparable data and similar sensitivity

— Using *in vitro* transcribed human RNA (10^6 copies/ μ l) as template. cDNA Synthesis with Transcriptor Reverse Transcriptase First Strand cDNA Kit. Dilution of cDNA for generation of Standard curve.

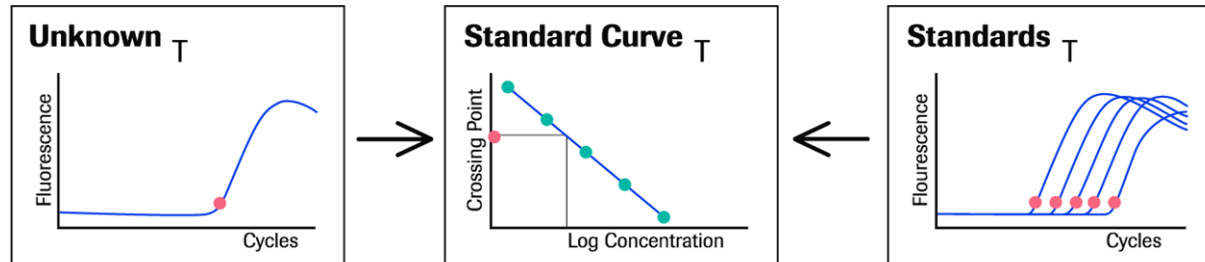
Parameter	LightCycler® Housekeeping Gene Assay		Universal ProbeLibrary Assay	
	Mean Efficiency	Standard Deviation	Mean Efficiency	Standard Deviation
HPRT	1.87	0.025	1.91	0.006
G6PDH	1.97	0.115	1.93	0.056

Principes de Quantification

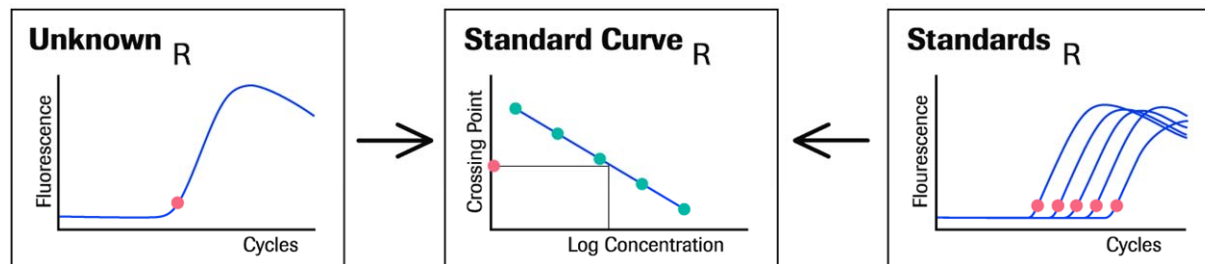
Aperçu



Quantification Relative *avec Standards Externes*



$$\text{Result} = \frac{\text{Concentration of Target}}{\text{Concentration of Reference}} = \text{Relative Ratio}$$



Cette méthode corrige pour les différences de quantité et de qualité des échantillons de même que les différences dans l'efficacité de la synthèse d'ADNc

Courbe Standard statistiquement valable

Pour une précision maximale:

- Dédiez une expérience pour générer une fois pour toute des courbes standards statistiquement valables.
- La magnitude à couvrir et la déviation standard acceptable déterminent le nombre de mesures à prendre.
- Utilisez le fichier préalablement sauvegardé pour analyser vos expériences ultérieures.

Détermination de l'Efficacité PCR avec une Courbe Standard statistiquement valable

standard deviation		0,04
conc. range	log conc. Range	
1,0E+09	9,0	3,0
1,0E+08	8,0	3,8
1,0E+07	7,0	4,9
1,0E+06	6,0	6,7
1,0E+05	5,0	9,6
1,0E+04	4,0	15,0
1,0E+03	3,0	26,7
1,0E+02	2,0	60,0
1,0E+01	1,0	240,0

Mesures requises pour obtenir une Courbe Standard statistiquement valide afin de déterminer l'efficacité PCR avec déviation standard définie

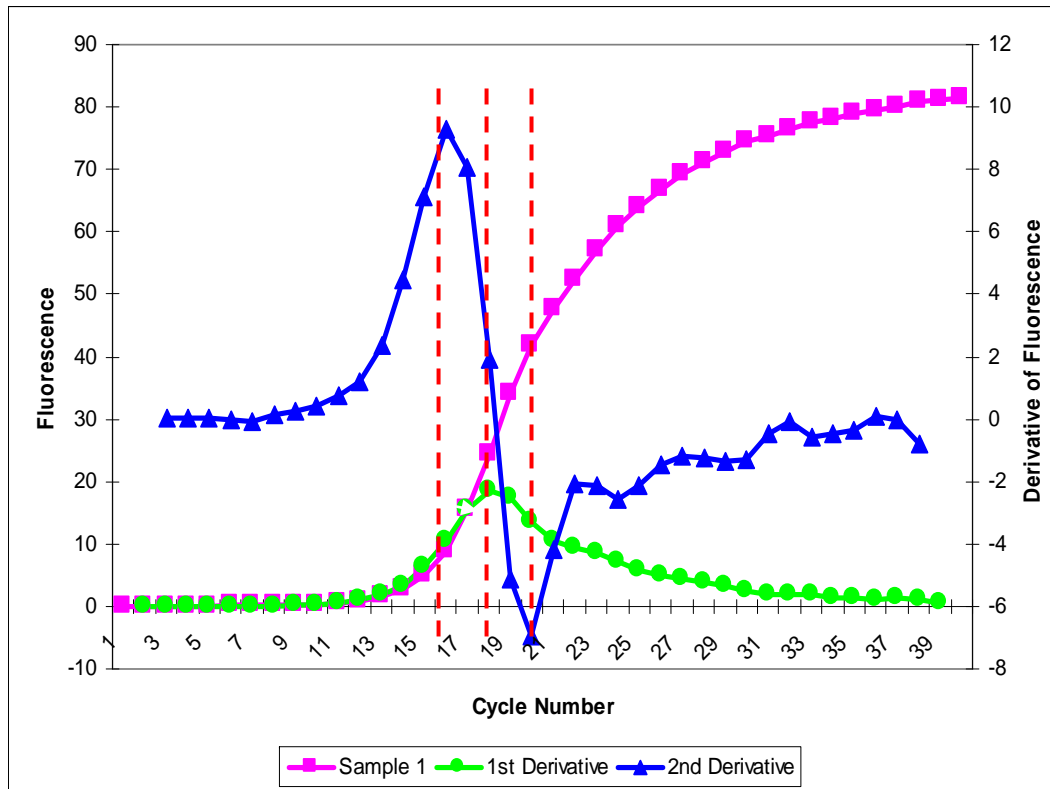
Les mesures devraient être réparties comme suit:

Concentration	1×10^1	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5
Nombre de capillaires Pour chaque concentration	1	1	1	1	11
	3	3	3	3	3
	5	3	3	2	2

Recommandations pour la création d'une Courbe Standard

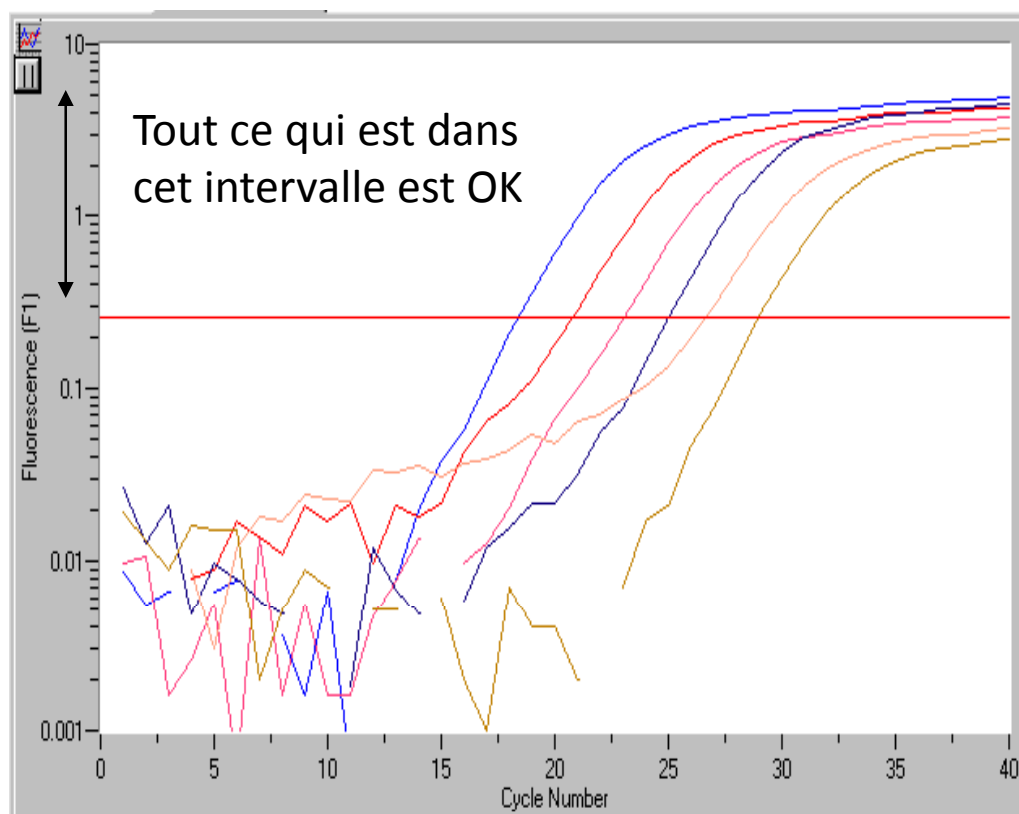
- Déterminer la magnitude à couvrir et se référer au tableau statistique
- Lors de la dilution en série des standards, utiliser des concentrations qui n'ont pas plus d'un log de différence entre elles (i.e., 1:10, 1:100, 1:1000, ...)
- Pour les concentrations moyennes et hautes, 2 à 3 mesures par concentration sont nécessaires.
- Pour la quantification à la limite du seuil de détection, mesurer en triplicata ou plus.

La méthode de la seconde dérivée... purement mathématique !



- La première dérivée nous indique le point d'inflexion de la courbe d'amplification
- La seconde dérivée nous indique les points du début et de la fin de la phase log-linéaire de la courbe d'amplification

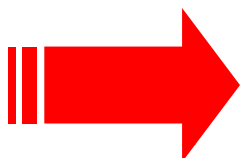
La Méthode Fit Points est empirique...



- L'utilisateur doit déterminer le moment où tous les échantillons sont en phase log linéaire...et pouvoir obtenir au moins 2 points dans la courbe exponentielle

Détermination du Crossing Point (Cp)

Méthode	Caractéristiques
2 nd Dérivée	<ul style="list-style-type: none">✓ Pas d'ajustement par l'utilisateur✓ Pas d'influence reliée au bruit de fond✓ Analyse rapide✓ Grande reproductibilité Applicable à <ul style="list-style-type: none">✓ Toutes applications✓ Analyses de routines à courbe standard répétitives
Fit Points	<ul style="list-style-type: none">✓ Résultat influencé par l'utilisateur✓ Possible optimisation de la courbe standard Applicable à <ul style="list-style-type: none">✓ Toutes applications où l'influence de l'utilisateur sur la courbe standard est souhaitable✓ Expériences avec peu de standards ou standards irréguliers



Relative Quantification

Relative Ratio

$$\rightarrow \frac{\text{Amount of target RNA in a sample}}{\text{Amount of housekeeping RNA in a sample}}$$

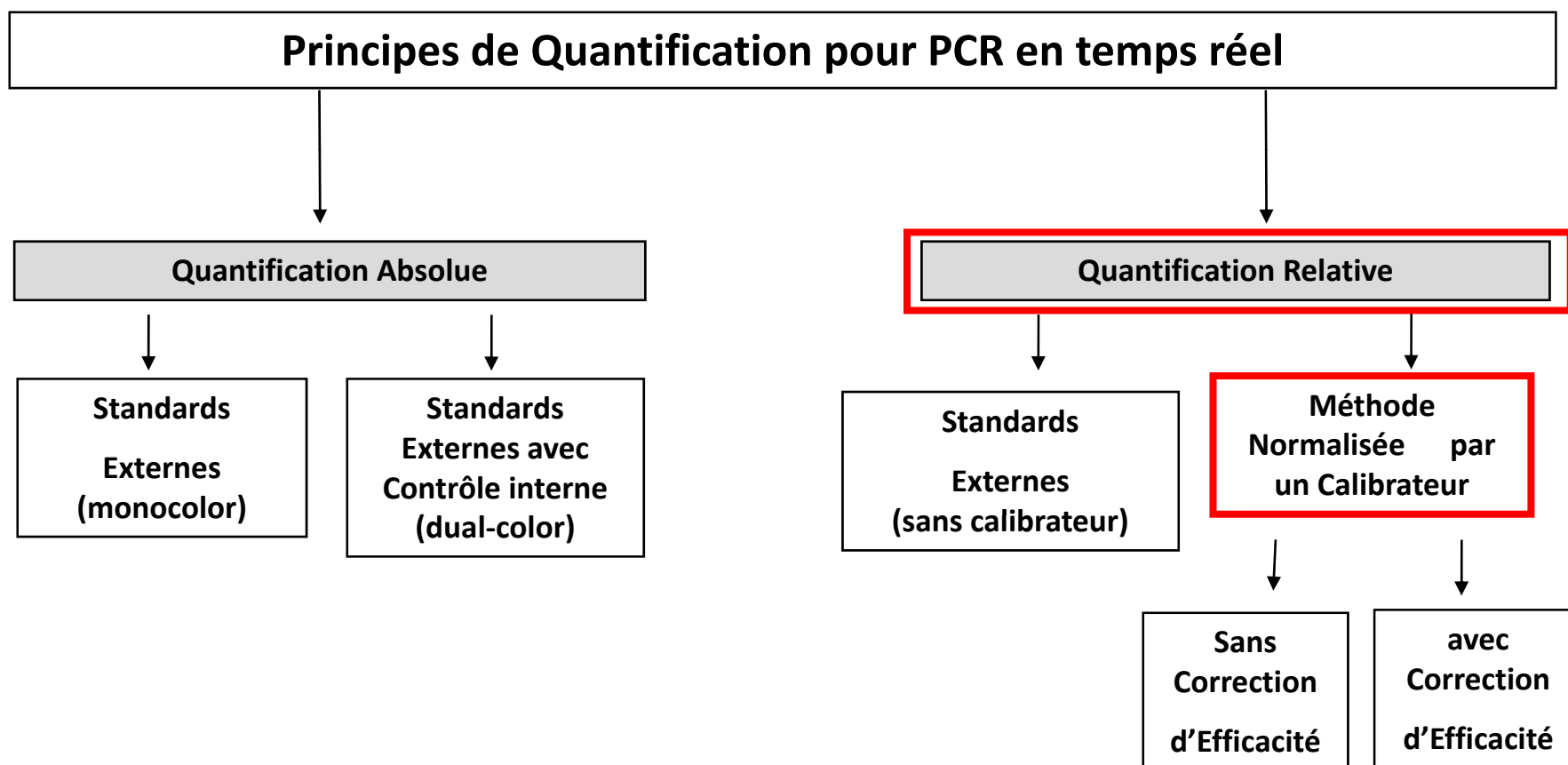
For calculation:

$$N = N_0 \times E^n$$

N	number of amplified molecules
N ₀	initial number of molecules
E	Efficiency of PCR amplification
n	number of amplification cycles

Principes de Quantification

Aperçu



Le Calibrateur

- Le Calibrateur est un **contrôle positif** pour la cible et la référence.
- Le Calibrateur possède un **ratio constant** cible/référence
- Le rôle du Calibrateur:

Normalise les résultats entre les expériences

Valide l'expérience en tant que contrôle positif

Peut être utilisé pour préparer les courbes standards relatives

Quantification Relative Normalisée par un Calibrateur

■ Le gène de Référence / gène domestique corrige:

- Variabilité de l'échantillon/qualité, pureté des gabarits
- Possible dégradation du matériel, spécimen, échantillon
- Variations de la quantité de départ/pipettage, etc
- Variations de l'efficacité de la synthèse de l'ADNc

■ Le Calibrateur :

- Normalise les différences de détection entre la cible et la référence; hybridation des sondes, efficacité du FRET)
- Permet de normaliser et comparer, via un point de repère constant, des expériences faites à différents moments.

Calcul du ratio normalisé par un calibrateur

$$\text{Ratio Normalisé} = \frac{\text{Ratio } \frac{C}{\text{Ref}} \text{ (échantillon)}}{\text{Ratio } \frac{C}{\text{Ref}} \text{ (calibrateur)}}$$



Concrètement !

Échantillon: sang

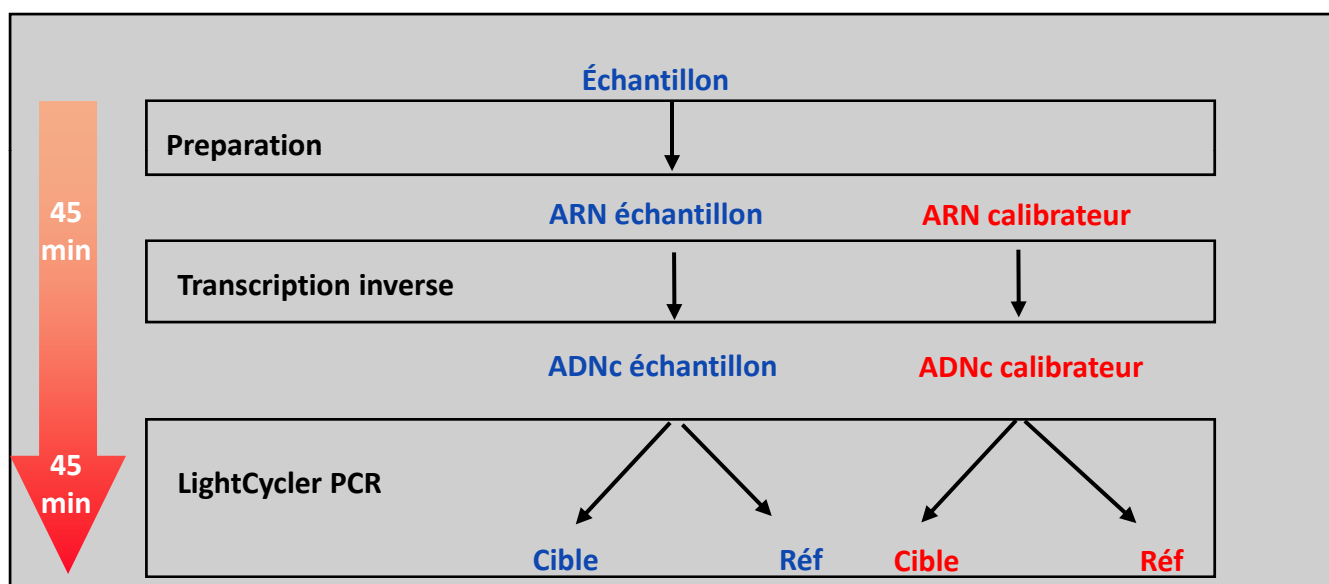
Gène cible: transcrit de fusion BCR-ABL

Gène Référence/domestique/housekeeping: G6PDH

Calibrateur: lignée cellulaire K562

Quantification Relative Normalisée par un Calibrateur

Séquence de travail



$$\text{Ratio Normalisé} = \frac{\text{Conc. (Cible}_{\text{sample}})}{\text{Conc. (Réf}_{\text{sample}})} \div \frac{\text{Conc. (Cible}_{\text{calibrator}})}{\text{Conc. (Réf}_{\text{calibrator}})}$$



Exemple:

Expérience octobre 2006

A	B	Calibrateur
4/3(1.33)	2/3(0.66)	1/3(0.33)

Ratios normalisés par le calibrateur

A	B
4.00	2.00

Expérience janvier 2007

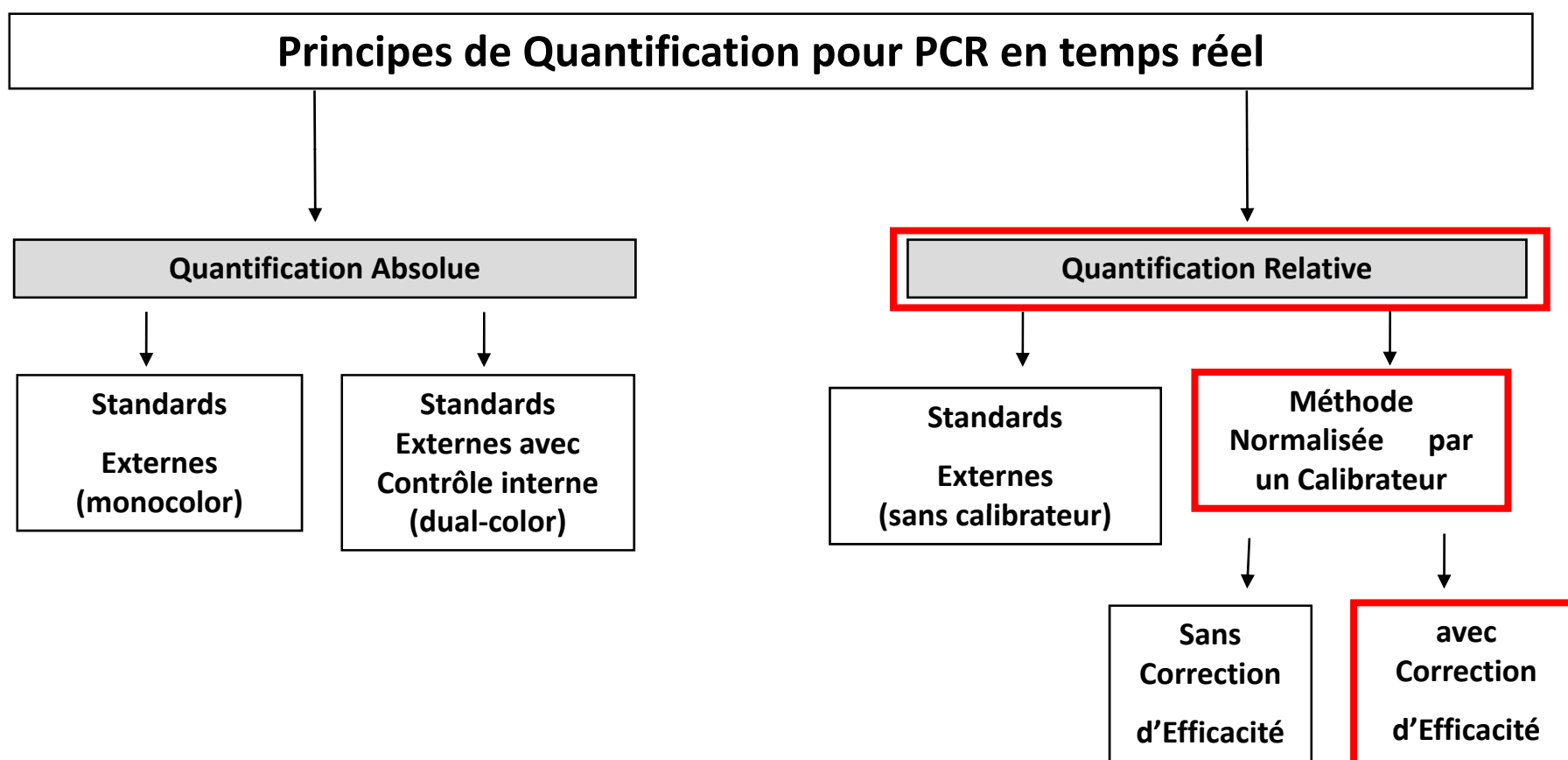
A	B	Calibrateur
2/3(0.66)	1/3(0.33)	0.5/3(0.16)

Ratios normalisés par le calibrateur

A	B
4.00	2.00

Principes de Quantification

Aperçu



Méthode de Quantification Relative (1)

Sans correction d'Efficacité

Connue sous le nom de $\Delta\Delta C_t$

- La référence et la cible doivent avoir la même Efficacité PCR
- L'Efficacité PCR des deux gènes doit être égale à 2

La correction d'Efficacité réduit significativement les erreurs de calcul car;

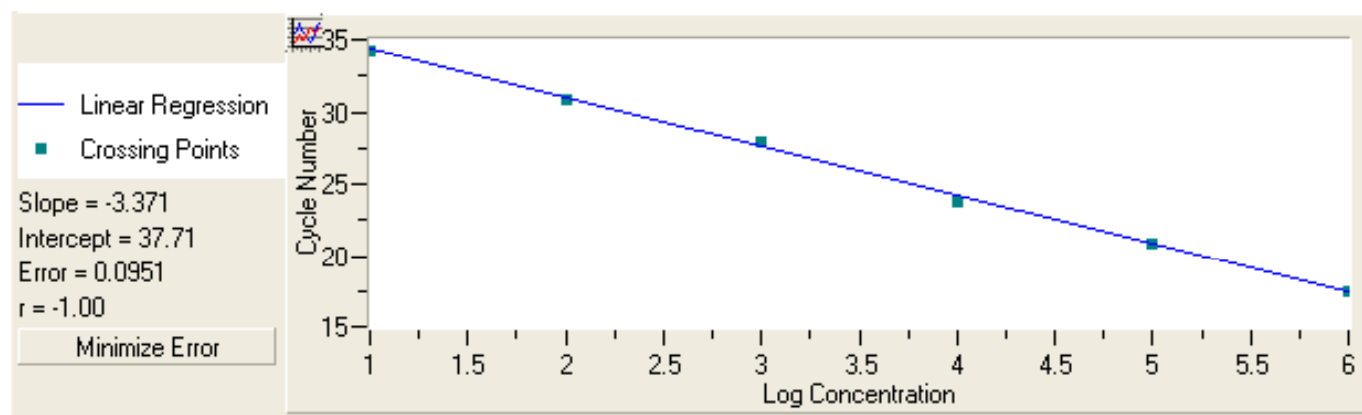
- Toutes les amplifications ne possèdent pas une efficacité identique et optimale de 2
- Toutes les amplifications PCR n'ont pas nécessairement toujours une efficacité constante

Exemple d'erreur sur l'estimation des résultats

		Detection Cycle (n)					
		10	15	20	25	30	35
PCR Efficiency	2.00	-	-	-	-	-	-
	1.97	16%	25%	35%	46%	57%	70%
	1.95	29%	46%	66%	88%	113%	142%
	1.90	67%	116%	179%	260%	365%	500%
	1.80	187%	385%	722%	1290%	2260%	3900%
	1.70	408%	1045%	2480%	5710%	13000%	29500%
	1.60	830%	2740%	8570%	26400%	80700%	246400%

Error Calculation $(2^n/E^n - 1) \times 100$

Calcul de l'Efficacité du PCR



- L'Efficacité de la réaction est calculée à partir de **la pente** de la Courbe Standard

$$E = 10^{-1/\text{pente}}$$

$$E = 10^{-1/-3.371} = \mathbf{1.98}$$

$$\text{Efficacité}_{\text{échantillon}} = \text{Efficacité}_{\text{Standard}}$$

L'Efficacité dépend de:

Amorces déterminent à 90%
(design/purification/temp. annealing)

Pureté de l'échantillon

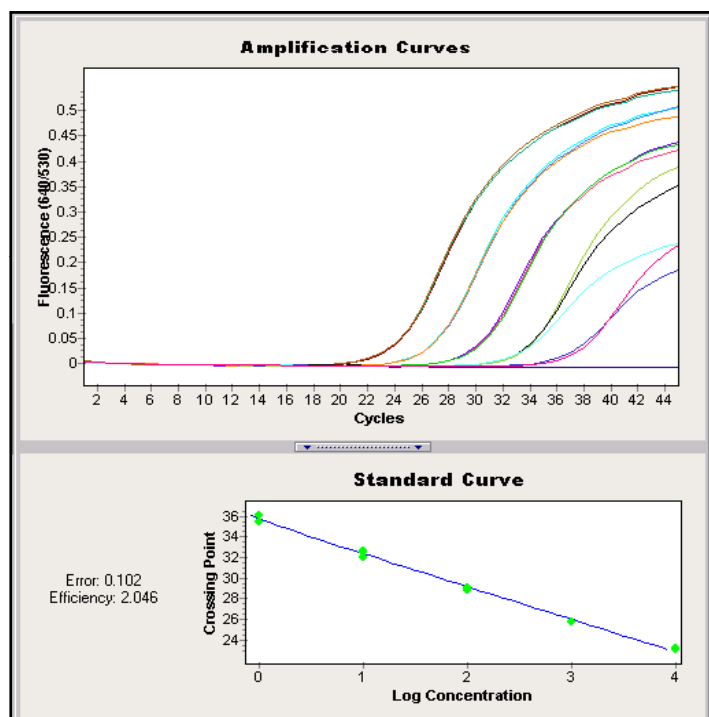
Séquence ciblée

Longueur de l'amplicon

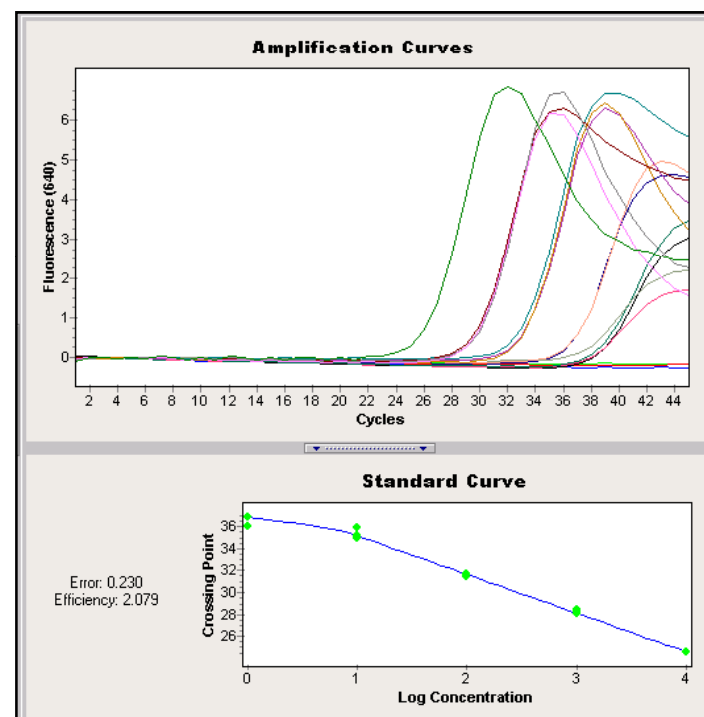
PCR Efficiency Differences

Efficiency of the standards	Efficiency of the unknowns	Delta E	Difference in slope of the standard curve	Fold Under-estimate
1.90	1.90	0.00	0.00	--
1.90	1.89	0.01	0.03	1.1
1.90	1.80	0.10	0.33	3.6
1.90	1.65	0.25	1.01	49

Efficacité PCR Linéaire vs. Non-Linéaire



Régression linéaire



Régression non-linéaire

Efficacité PCR – Variance Inter-essai

experiment	amplification efficiency E
# 1	2.067
# 2	2.012
# 3	1.965
# 4	1.989
# 5	2.046
# 6	1.938
# 7	1.996
# 8	2.008
# 9	1.986
# 10	1.994

Valueur moyenne – déviation std:

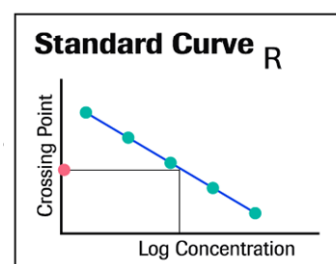
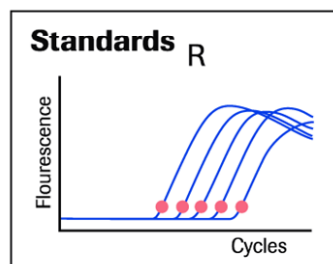
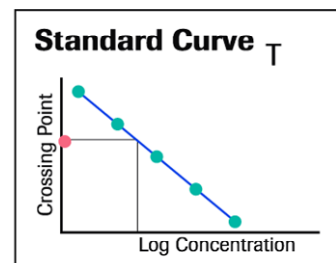
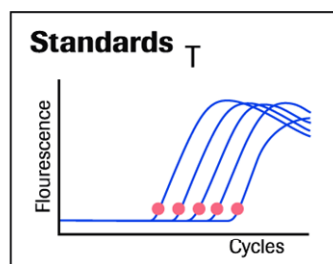
$$E = 2.00 \pm 0.04$$

$$CV = 1.8 \%$$

Des dilutions en série 1:10 d'ARN standard (10^6 to 10^2 copies) ont été analysées pour l'expression de hTERT. L'Efficacité d'amplification a été calculée pour chaque expérience..

Création d'un fichier de coefficients permanent

Échantillon → Dilutions
4-5 Log
15 mesures

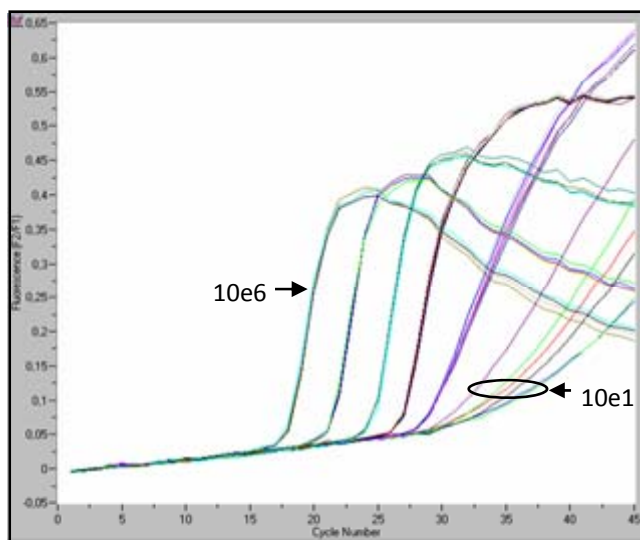


Sauvegarde
des données
dans LC SW
cof. files

Une dilution de concentration moyenne est conservée pour faire un calibrateur

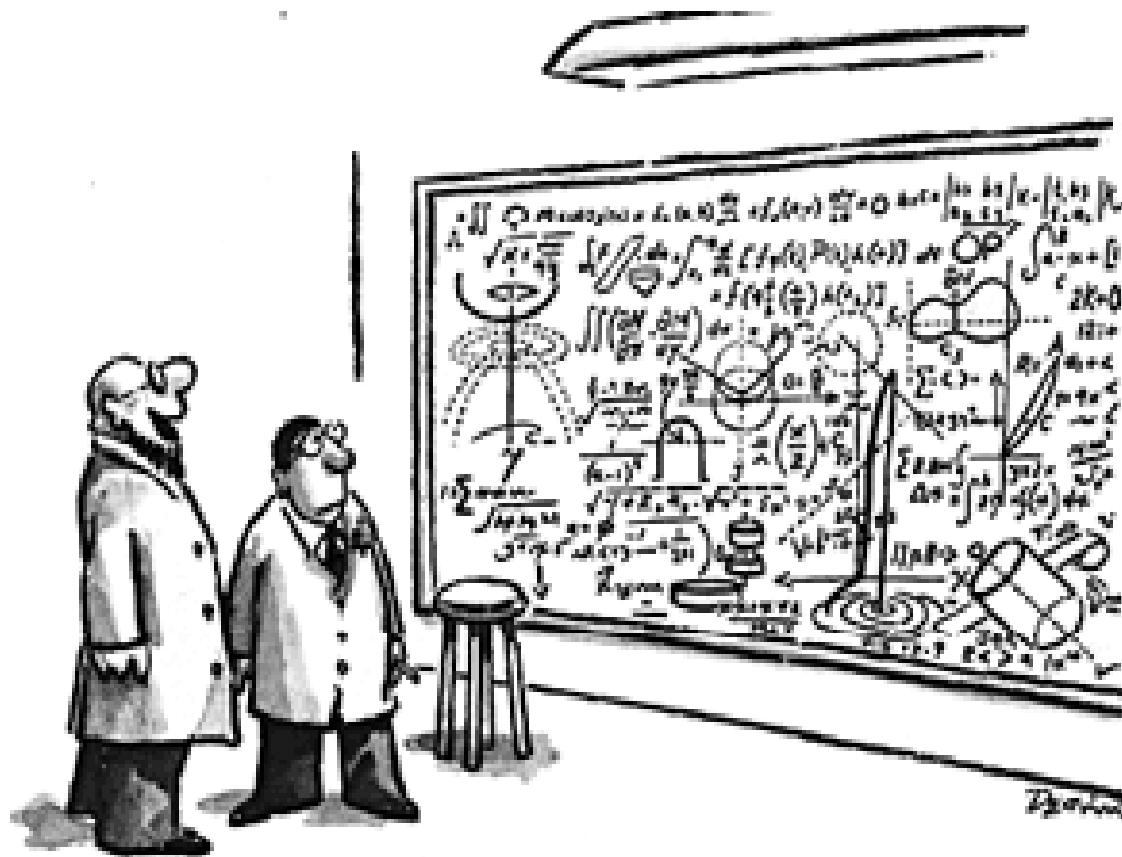
LightCycler[®] Reproducibility Depends on Starting Concentration

- Coefficient of Variation is low down to 100 copies.
- Below 100 copies the CV increases due to particle distribution.



Experiment repeated 3 times
plasmid/PCR/130 bp/
HybProbe probes

4 repl. 10^6 copies: CV 0.7 - 1.2%
4 repl. 10^5 copies: CV 0.3 - 0.6%
4 repl. 10^4 copies: CV 0.2 - 0.4%
6 repl. 10^3 copies: CV 0.2 - 1.2%
6 repl. 10^2 copies: CV 0.2 - 0.7%
6 repl. 10^1 copies: CV 1.7 - 2.7%



"Hey, no problem!"

Les Technical Notes du LightCycler

- LC 10/03 Overview of LightCycler Quantification Methods (update 2003)
- LC 11/03 Absolute Quantification with External Standards (update 2003)
- LC 12/00 Absolute Quantification with External Standards and
 an Internal Control
- LC 13/01 Relative Quantification
- LC 15/02 Selection of Housekeeping Genes
- LC 16/04 Customizing LightCycler Relative Quantification Techniques
 for Specific Applications

<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/>

En conclusion, pour obtenir les meilleurs résultats en quantification relative...

Faire un choix judicieux pour le gène de référence

Tenir compte de l'Efficacité du PCR

La détermination du Cp avec la seconde dérivée est recommandée

DEUX FOIS PLUTÔT QU'UNE !

- Le gène référence normalise pour ce qui arrive avant le PCR
- Le calibrateur normalise pour ce qui arrive pendant le PCR



Merci de votre attention !

Votre Équipe Roche Diagnostics de Québec;

Julie Handfield

Steve Doire

Michel Côté

Pauline Marchand

& Mary Ann Quesnel

www.roche-applied-science.com



Diagnostics

LIGHTCYCLER is a trademark of Roche

Roche Diagnostics Canada
Roche Applied Science
201 Armand-Frappier
Laval, Québec