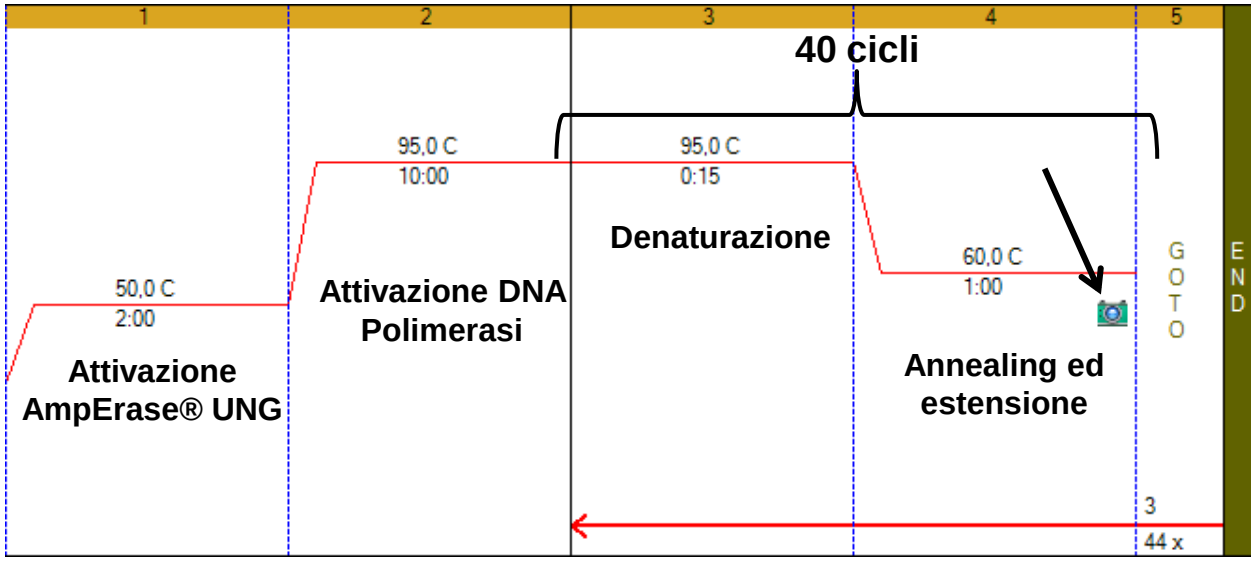


1.Attivazione AmpErase® UNG

Urancil-N-Glycosylase è un enzima che elimona contaminanti contenenti dU.

2.Attivazione DNA Polimerasi

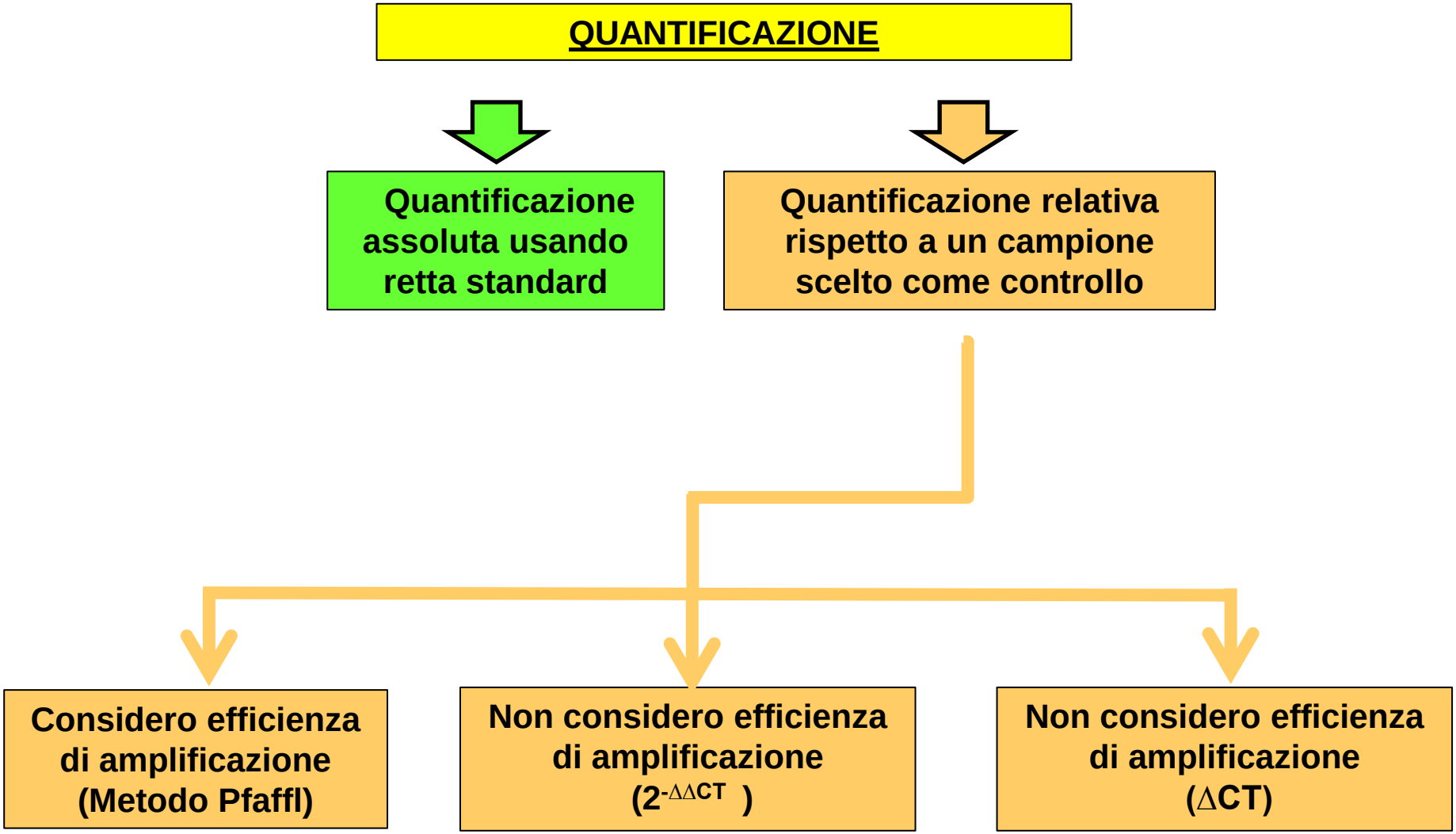
Per attivare l'enzima **AmpliTaq Gold ® DNA Polymerase** è necessaria un'incubazione a 95 C.

3.Denaturazione del DNA stampo

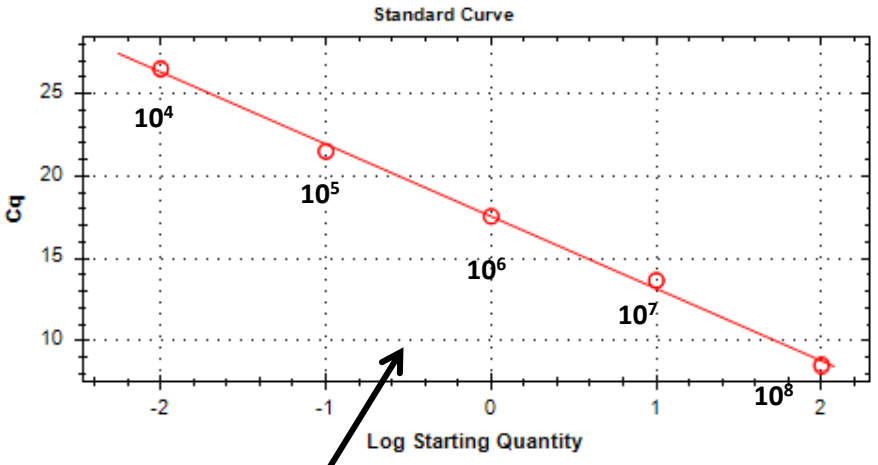
Il riscaldamento a 95 C consente di rompere i legami idrogeno che uniscono i singoli filamenti.

4.Annealing ed estensione

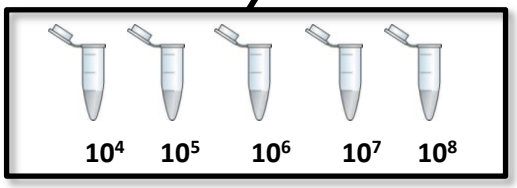
I primers si legano alla regione complementare presente nel templato e successivamente la polimerasi va a formare il nuovo filamento.

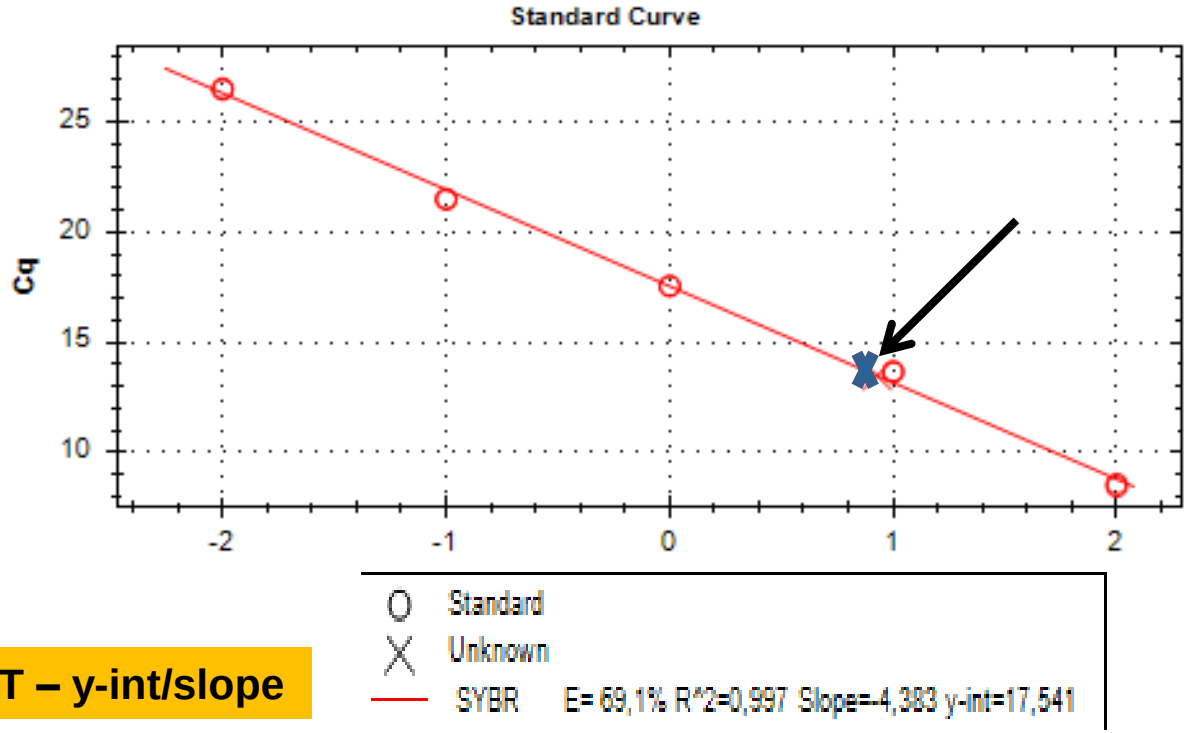

QUANTIFICAZIONE
Quantificazione assoluta usando retta standard
Quantificazione relativa rispetto a un campione scelto come controllo
Considero efficienza di amplificazione (Metodo Pfaffl)
Non considero efficienza di amplificazione ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Non considero efficienza di amplificazione (ΔCT)

QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA



La concentrazione del campione incognito (unknown) si ricava per interpolazione da **retta di taratura** creata amplificando campioni a concentrazione nota**.**





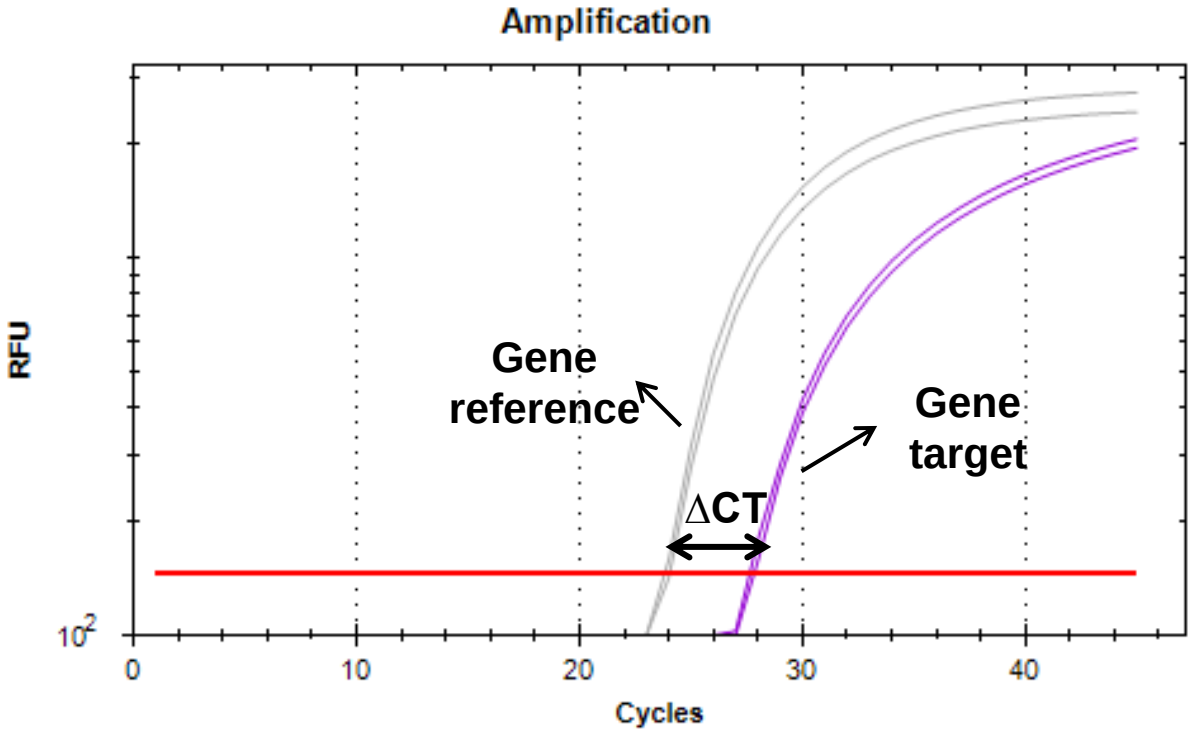
✓Prodotti di PCR
✓Oligonucleotidi sintetici
✓Plasmidi
✓DNA genomico

Log $_{10}$ quantità campione = CT – y-int/slope

QUANTIFICAZIONE RELATIVA

La quantificazione si esegue attraverso il confronto tra CT, esprime una variazione di concentrazione di un campione incognito rispetto ad un campione scelto come controllo.

✓Metodo ΔCT
✓**Metodo ΔΔCT (Livak)**
✓Metodo Pfaffl



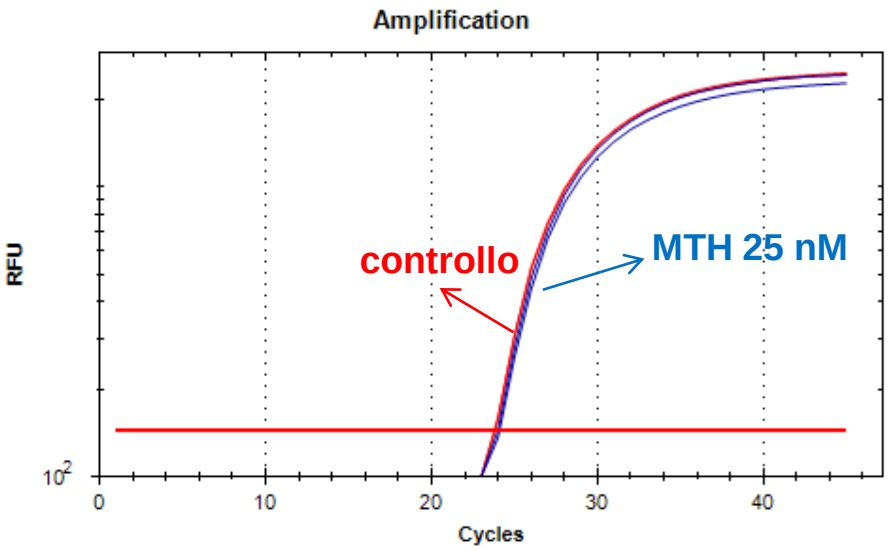
GENE REFERENCE (gene housekeeping)

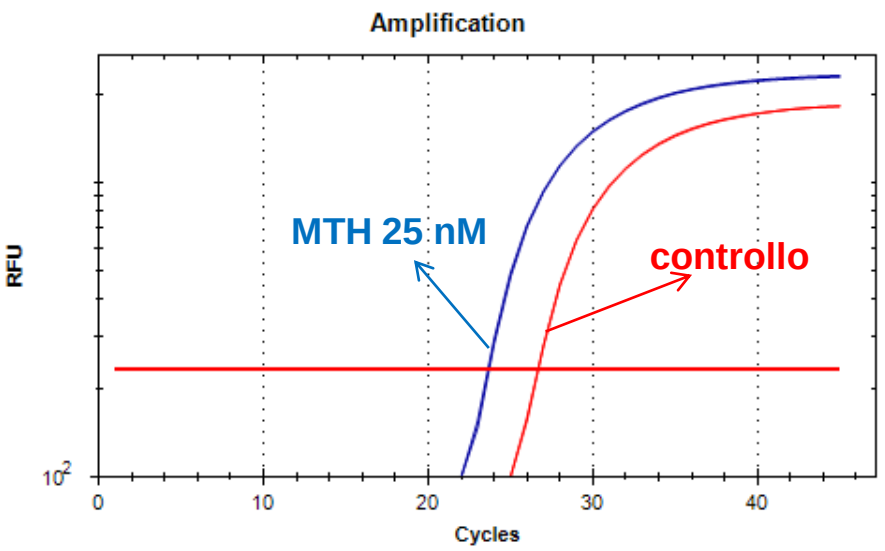
Gene costitutivamente espresso, la cui espressione non varia nei campioni trattati rispetto a quelli di controllo. Serve a ridurre l'errore sperimentale.

✓La sua espressione non deve essere alterata dal trattamento o dalla condizione patologica

✓Molto spesso è utile usare più reference

✓geNorm http://medgen.ugen.be/~jvdesomp/genorm/



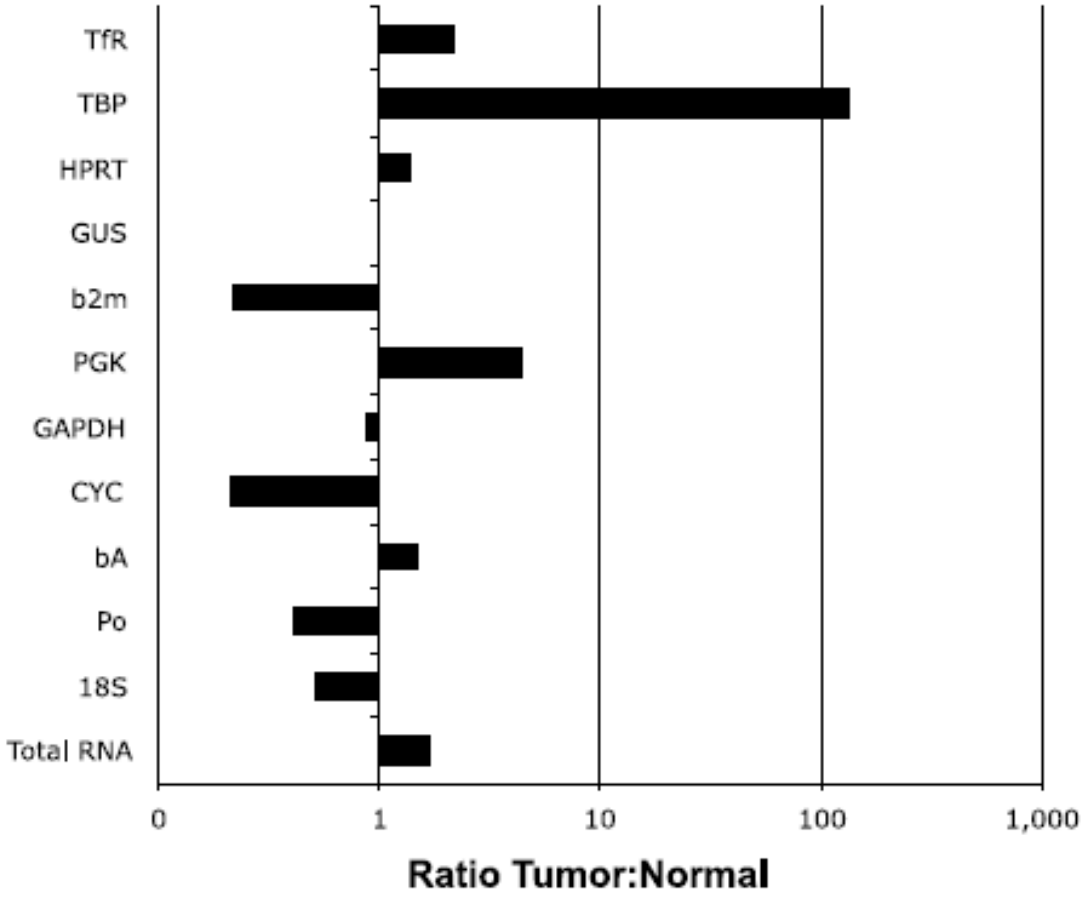


Housekeeping analizzati

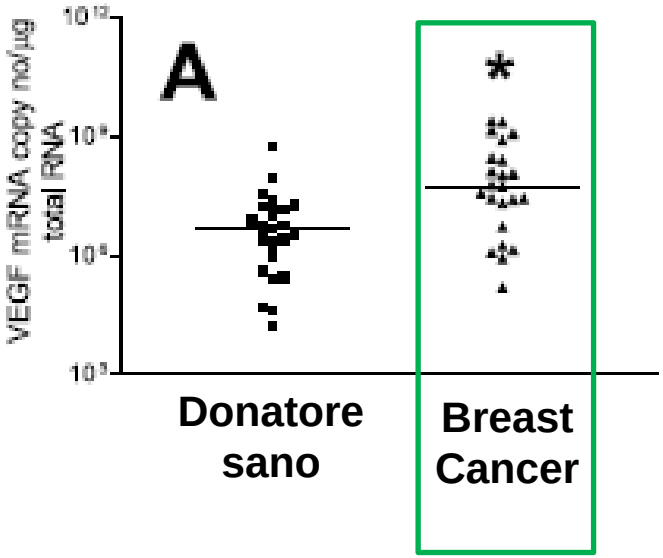
Endogenous control gene	Abbreviation
18S rRNA	18S
Acidic ribosomal protein	PO
β-actin	βa
Cyclophilin	CYC
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
Phosphoglycerokinase	PGK
β_2-Microglobulin	β2m
β-Glucuronidase	GUS
Hypoxanthine ribosyl transferase	HPRT
TATA-binding protein	TBP
Transferrin receptor	TfR

Tricarico et al., Analytical Biochemistry (2002).

Quantificazione relativa VEGF

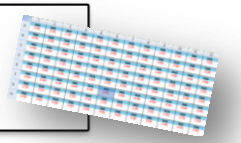


Quantificazione assoluta VEGF

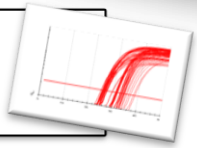


ANALISI DEI DATI

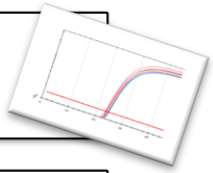
1. Configurare le piastra



2. Posizionare la threshold

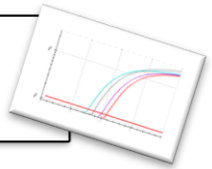


3. Verificare i controlli

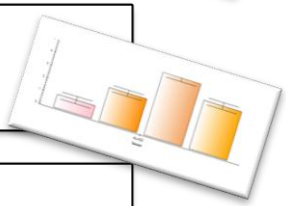


4. Verificare i replicati

5. Verificare l’andamento del gene reference

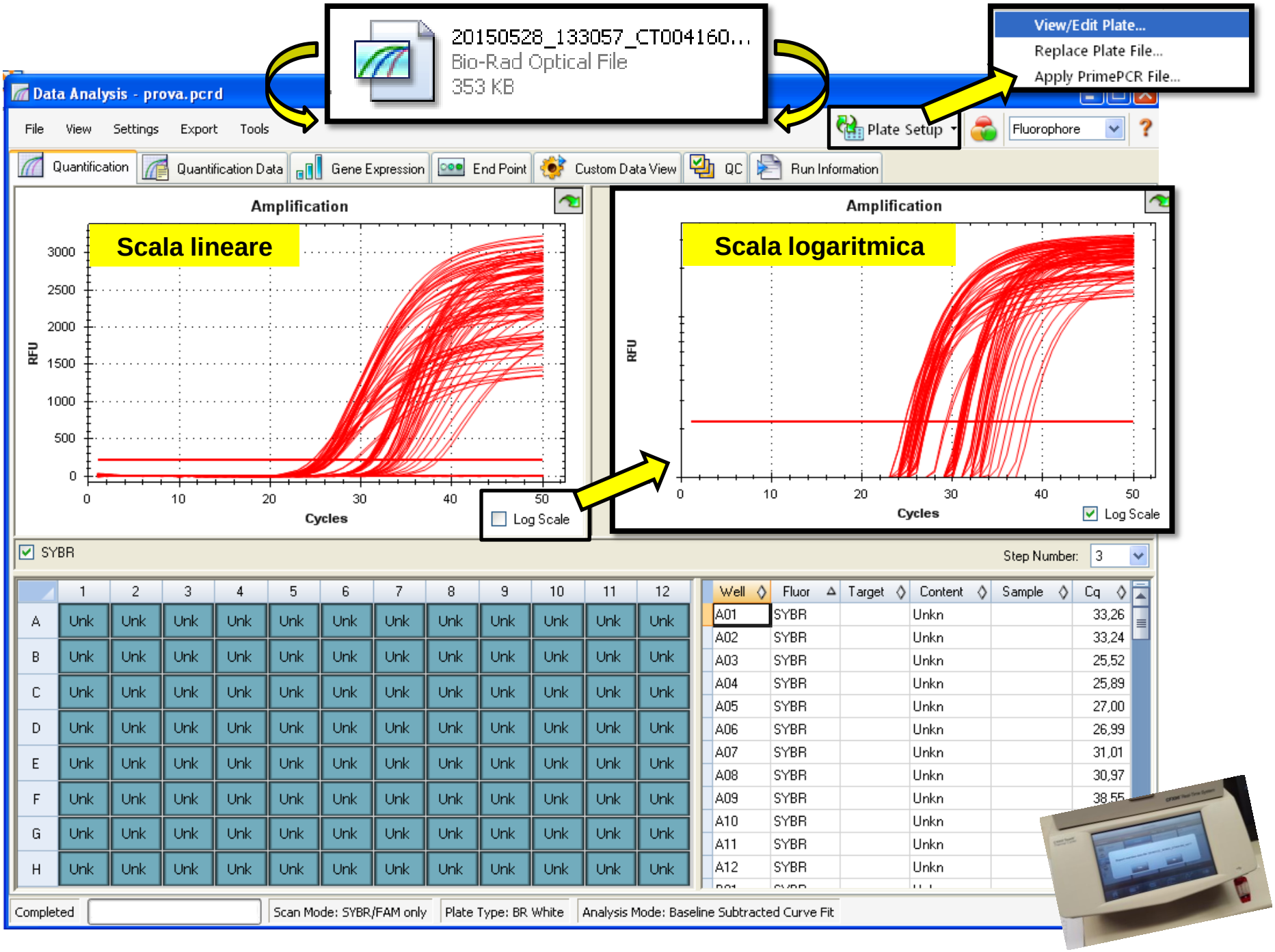


6. Verificare l’andamento del gene target

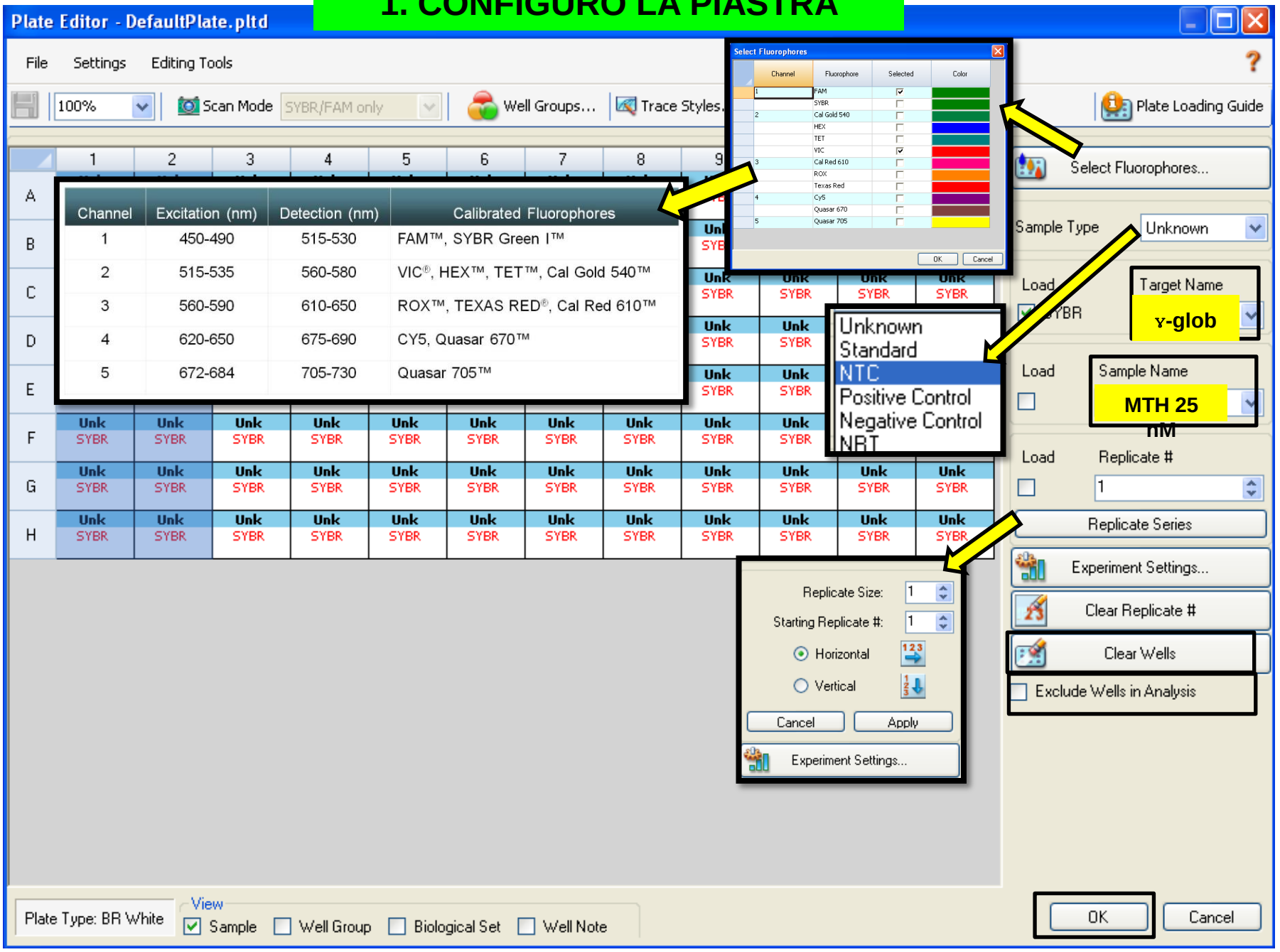


7. Eseguire la quantificazione relativa del gene target

$2^{-\Delta\Delta Ct}$

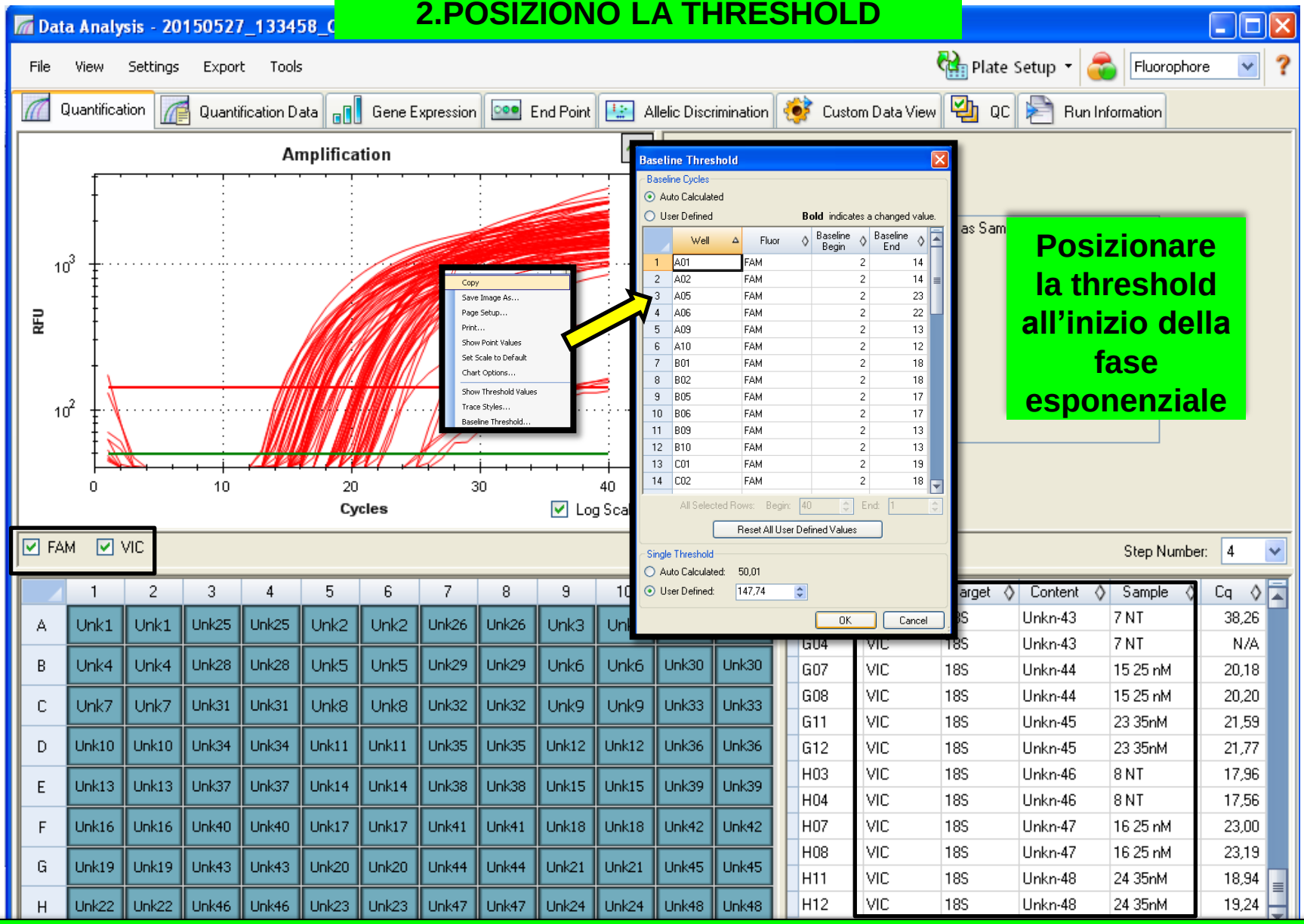

20150528_133057_CT004160...
Bio-Rad Optical File
353 KB
View/Edit Plate...
Replace Plate File...
Apply PrimePCR File...
Data Analysis - prova.pcrd
File
View
Settings
Export
Tools
Plate Setup
Fluorophore
Quantification
Quantification Data
Gene Expression
End Point
Custom Data View
QC
Run Information
Amplification
Scala lineare
RFU
Cycles
Log Scale
Amplification
Scala logaritmica
RFU
Cycles
Log Scale
SYBR
Step Number:
3
Well
Fluor
Target
Content
Sample
Cq
A01 SYBR Unkn 33,26
A02 SYBR Unkn 33,24
A03 SYBR Unkn 25,52
A04 SYBR Unkn 25,89
A05 SYBR Unkn 27,00
A06 SYBR Unkn 26,99
A07 SYBR Unkn 31,01
A08 SYBR Unkn 30,97
A09 SYBR Unkn 38,55
A10 SYBR Unkn
A11 SYBR Unkn
A12 SYBR Unkn
Completed
Scan Mode: SYBR/FAM only
Plate Type: BR White
Analysis Mode: Baseline Subtracted Curve Fit

1. CONFIGURO LA PIASTRA



Channel	Excitation (nm)	Detection (nm)	Calibrated Fluorophores
1	450-490	515-530	FAM™, SYBR Green I™
2	515-535	560-580	VIC®, HEX™, TET™, Cal Gold 540™
3	560-590	610-650	ROX™, TEXAS RED®, Cal Red 610™
4	620-650	675-690	CY5, Quasar 670™
5	672-684	705-730	Quasar 705™

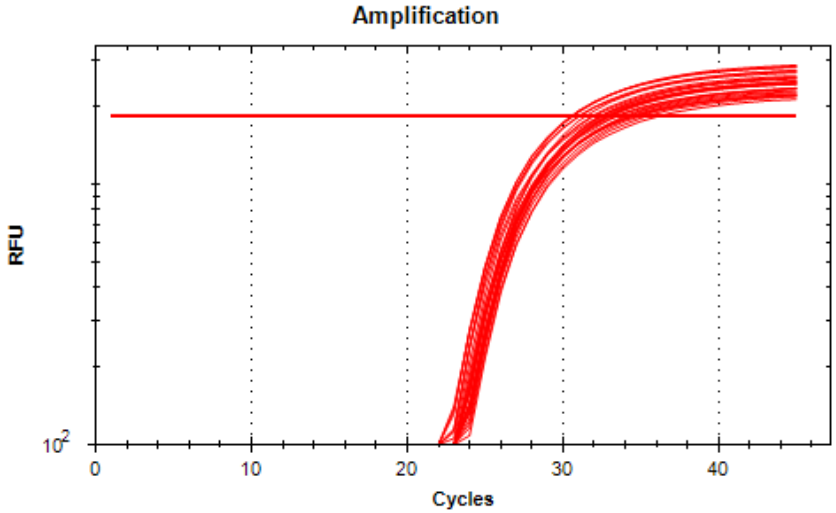
2.POSIZIONO LA THRESHOLD



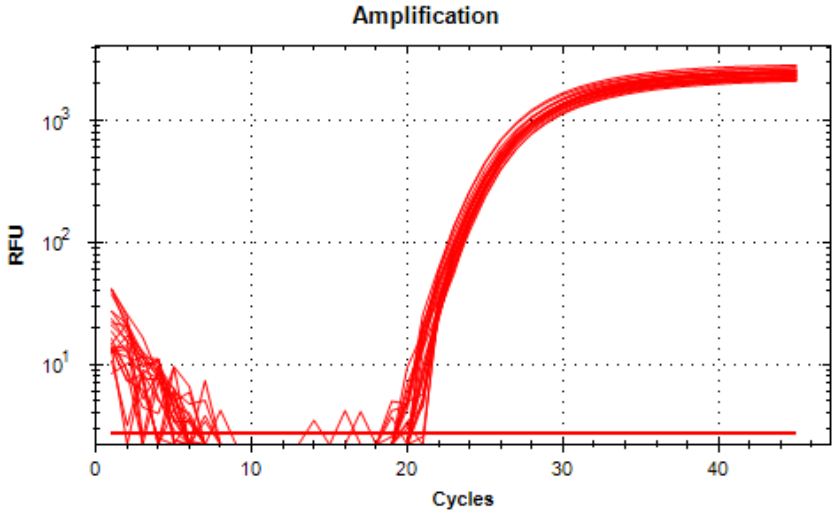
Posizionare la threshold all'inizio della fase esponenziale

Threshold: valore numerico, assegnato per ogni corsa, che indica un valore di fluorescenza superiore rispetto al background.

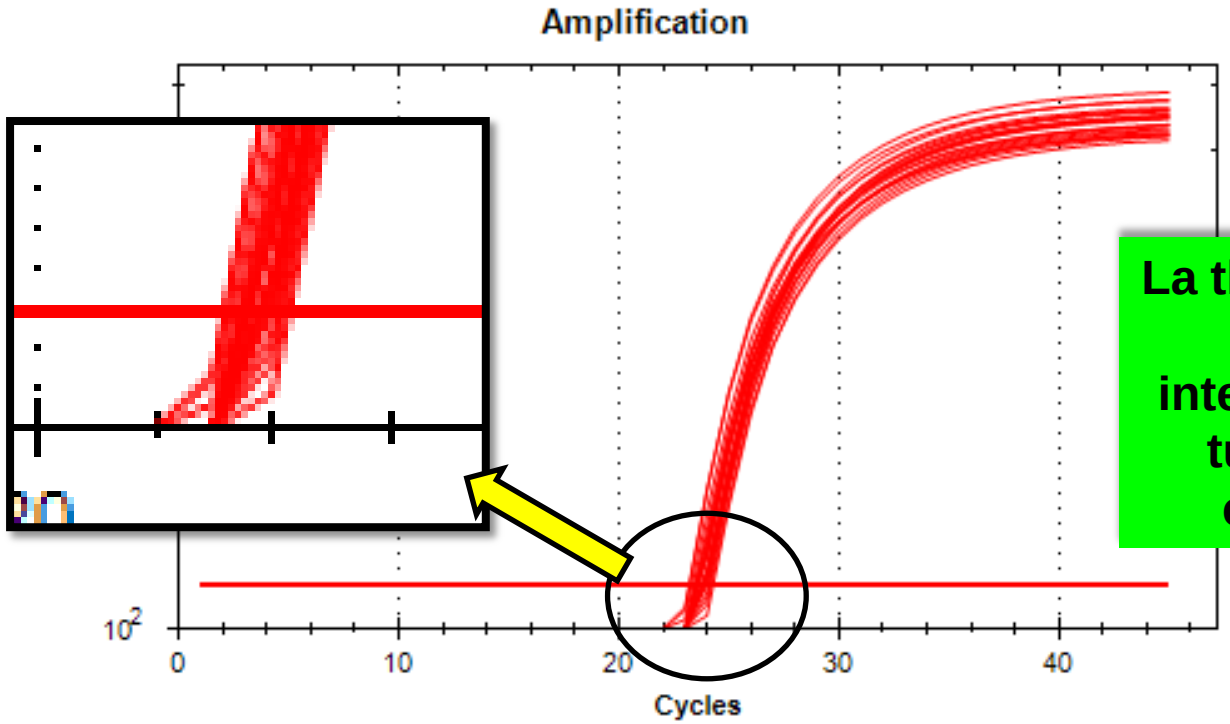
2.POSIZIONO LA THRESHOLD



Threshold oltre la fase esponenziale



Threshold sotto la fase esponenziale



La threshold deve intersecare tutte le curve

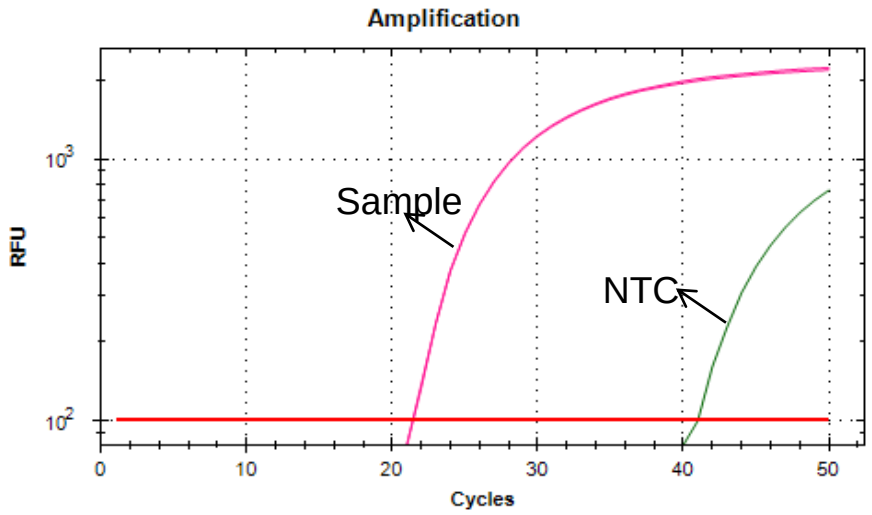
3.VERIFICA DEI CONTROLLI

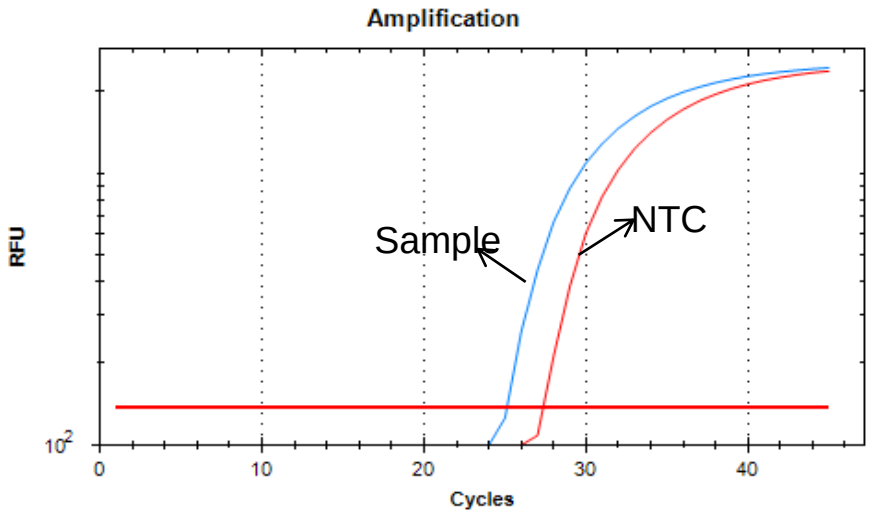
✓ **NTC** (No Template Control): contiene Master mix, sonda, primers ma non il templato.

✓Reagenti contaminati

✓Contaminazione in fase di piastratura

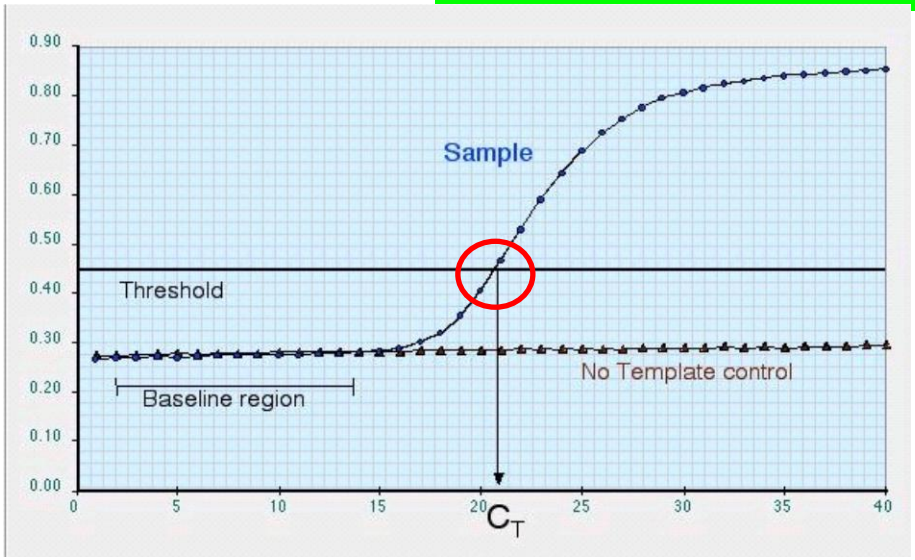
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk1	Unk1	Unk2	Unk2	Unk3	Unk3	Unk4	Unk4	Unk5	Unk5	Unk6	Unk6
B	Unk7	Unk7	Unk8	Unk8	Unk9	Unk9	Unk10	Unk10	Unk11	Unk11	NTC1	NTC1
C	Unk12	Unk12	Unk13	Unk13	Unk14	Unk14	Unk15	Unk15	Unk16	Unk16		
D	Unk17	Unk17	Unk18	Unk18	Unk19	Unk19	NTC2	NTC2	Unk20	Unk20		
E	Unk21	Unk21	Unk22	Unk22	Unk23	Unk23	Unk24	Unk24	Unk25	Unk25		
F	Unk26	Unk26	NTC3	NTC3	Unk27	Unk27	Unk28	Unk28	Unk29	Unk29		
G	Unk30	Unk30	Unk31	Unk31	Unk32	Unk32	Unk33	Unk33	Unk34	Unk34		
H	Unk35	Unk35	Unk36	Unk36	Unk37	Unk37	Unk38	Unk38	Unk39	Unk39		





✓**Controllo Positivo**: campione che sicuramente esprime il gene di interesse.

4.VERIFICA DEI REPLICATI



CT (ciclo soglia): corrisponde al ciclo della reazione di PCR in cui la fluorescenza emessa supera la soglia (threshold).

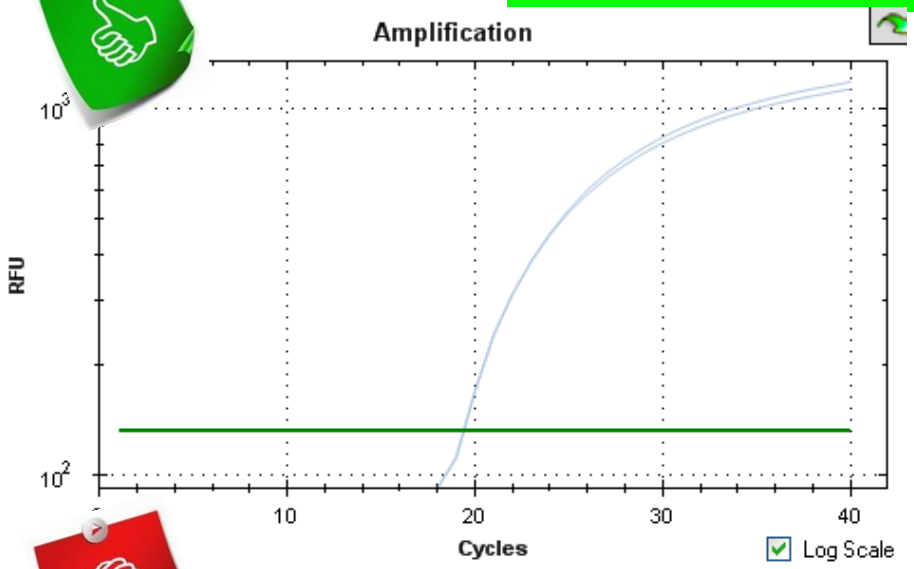
	1	2	3	4	5	6
A	1 NT	1 NT	1 NT	1 NT	9 NT	9 NT
B	2 NT	2 NT	2 NT	2 NT	10 NT	10 NT
C	3 NT	3 NT	3 NT	3 NT	11 25nM	11 25nM
D	4NT	4NT	4NT	4NT	12 25 nM	12 25 nM
E	5 NT	5 NT	5 NT	5 NT	13 25 nM	13 25 nM
F	6NT	6NT	6NT	6NT	14 25 nM	14 25 nM
G	7 NT	7 NT	7 NT	7 NT	15 25 nM	15 25 nM
H	8 NT	8 NT	8 NT	8 NT	16 25 nM	16 25 nM

Nel nostro caso

	1	2	3	4	5	6
A	1 NT	1 NT	1 NT	9 NT	9 NT	9 NT
B	2 NT	2 NT	2 NT	10 NT	10 NT	10 NT
C	3 NT	3 NT	3 NT	11 25nM	11 25nM	11 25nM
D	4NT	4NT	4NT	12 25 nM	12 25 nM	12 25 nM
E	5 NT	5 NT	5 NT	13 25 nM	13 25 nM	13 25 nM
F	6NT	6NT	6NT	14 25 nM	14 25 nM	14 25 nM
G	7 NT	7 NT	7 NT	15 25 nM	15 25 nM	15 25 nM
H	8 NT	8 NT	8 NT	16 25 nM	16 25 nM	16 25 nM

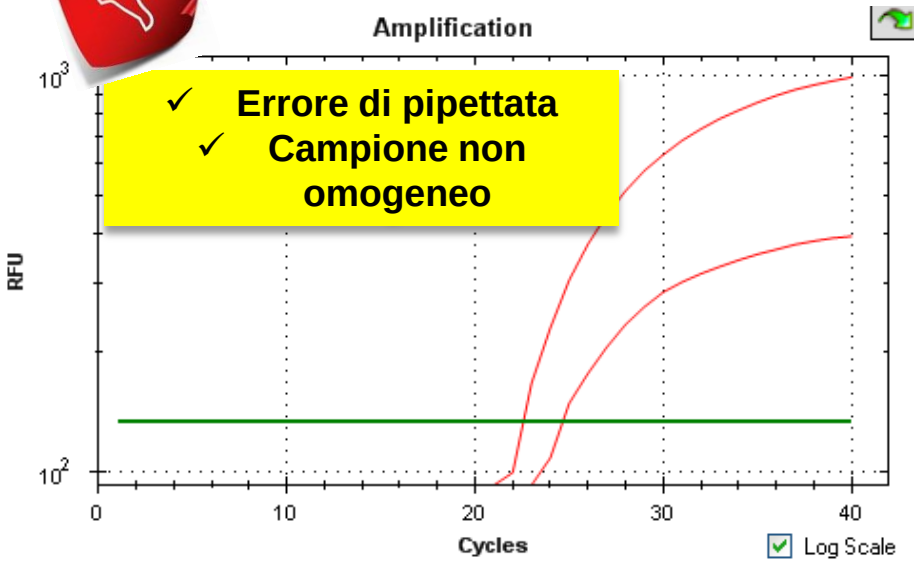
Statisticamente corretto

4.VERIFICA DEI REPLICATI



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A01	FAM	Gamma glot	Unkn-01	1 NT	19,37
A02	FAM	Gamma glot	Unkn-01	1 NT	19,35

Δ(A01-A02)= 19.37-19.35= **0.02**



- ✓ **Errore di pipettata**
- ✓ **Campione non omogeneo**

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
F01	FAM	Gamma glot	Unkn-16	6NT	24,61
F02	FAM	Gamma glot	Unkn-16	6NT	22,50

Δ(F01-F02)= 24.61-22.50= **2.11**

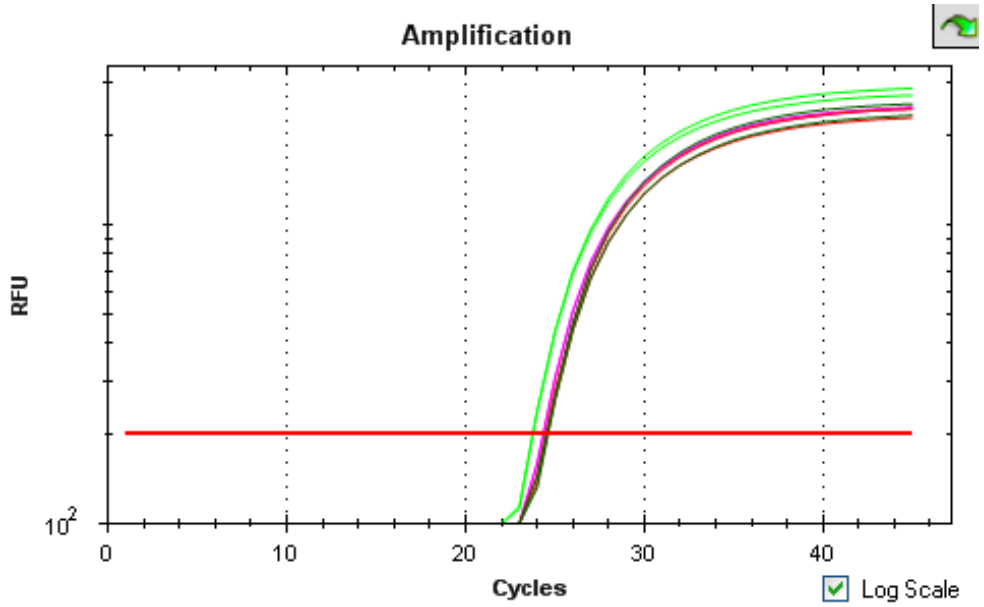
La differenza di CT tra i replicati dello stesso campione non deve superare 0.5 CT

NB: Questa verifica deve essere eseguita su tutti i campioni caricati nella piastra

4.VERIFICO L'ANDAMENTO DEL GENERE REFERENCE

✓**Stabile**

✓**La sua espressione non deve essere alterata dal trattamento o dalla condizione patologica**

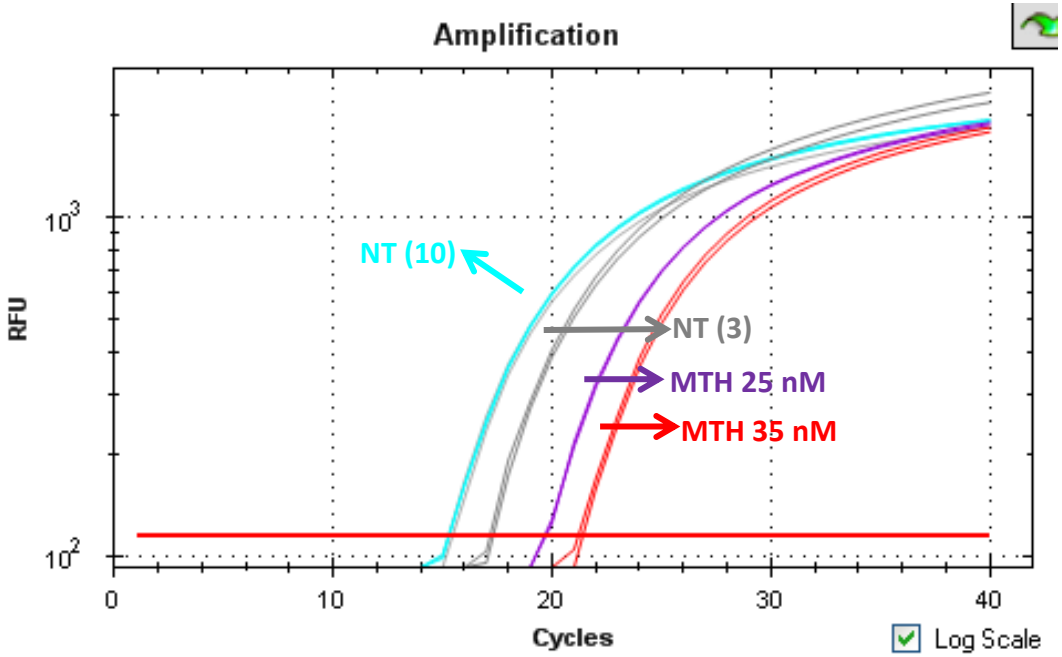


Situazione ottimale ΔCT < 0.5

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
E09	SYBR	RPL13A	Unkn-29	K562(-)5	24,28
E10	SYBR	RPL13A	Unkn-29	K562(-)5	24,28
F09	SYBR	RPL13A	Unkn-35	K562 20nM5	23,69
F10	SYBR	RPL13A	Unkn-35	K562 20nM5	23,71
G09	SYBR	RPL13A		25nM 5	24,41
G10	SYBR	RPL13A		25nM 5	24,52
H09	SYBR	RPL13A	Unkn-47	K562 30nM 5	24,47
H10	SYBR	RPL13A	Unkn-47	K562 30nM 5	24,54

ΔCT= 0.85

Non sempre è così…



B07	VIC	18S	Unkn-29	10 NT	15,24
B08	VIC	18S	Unkn-29	10 NT	15,27
C03	VIC	18S	Unkn-31	3 NT	17,14
C04	VIC	18S	Unkn-31	3 NT	17,26
G07	VIC	18S	Unkn-44	15 25 nM	19,78
G08	VIC	18S	Unkn-44	15 25 nM	19,82
G11	VIC	18S	Unkn-45	23 35nM	21,17
G12	VIC	18S	Unkn-45	23 35nM	21,36

ΔCT= 6.12

6.QUANTIFICAZIONE RELATIVA DEL GENE TARGET

Quantificazione secondo il metodo del ΔΔCT (Delta-Delta CT)

Determino la concentrazione relativa del gene target nel campione incognito rispetto al campione di controllo

Fold expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Modello matematico

1. Calcolo il ΔCT

ΔCT = CT medio GENE TARGET – CT medio GENE HOUSEKEEPING

Questo step serve a normalizzare il campione, cioè escludere variazioni dovute al caricamento di quantità diverse tra un campione e l'altro.

2. Calcolo il ΔΔCT

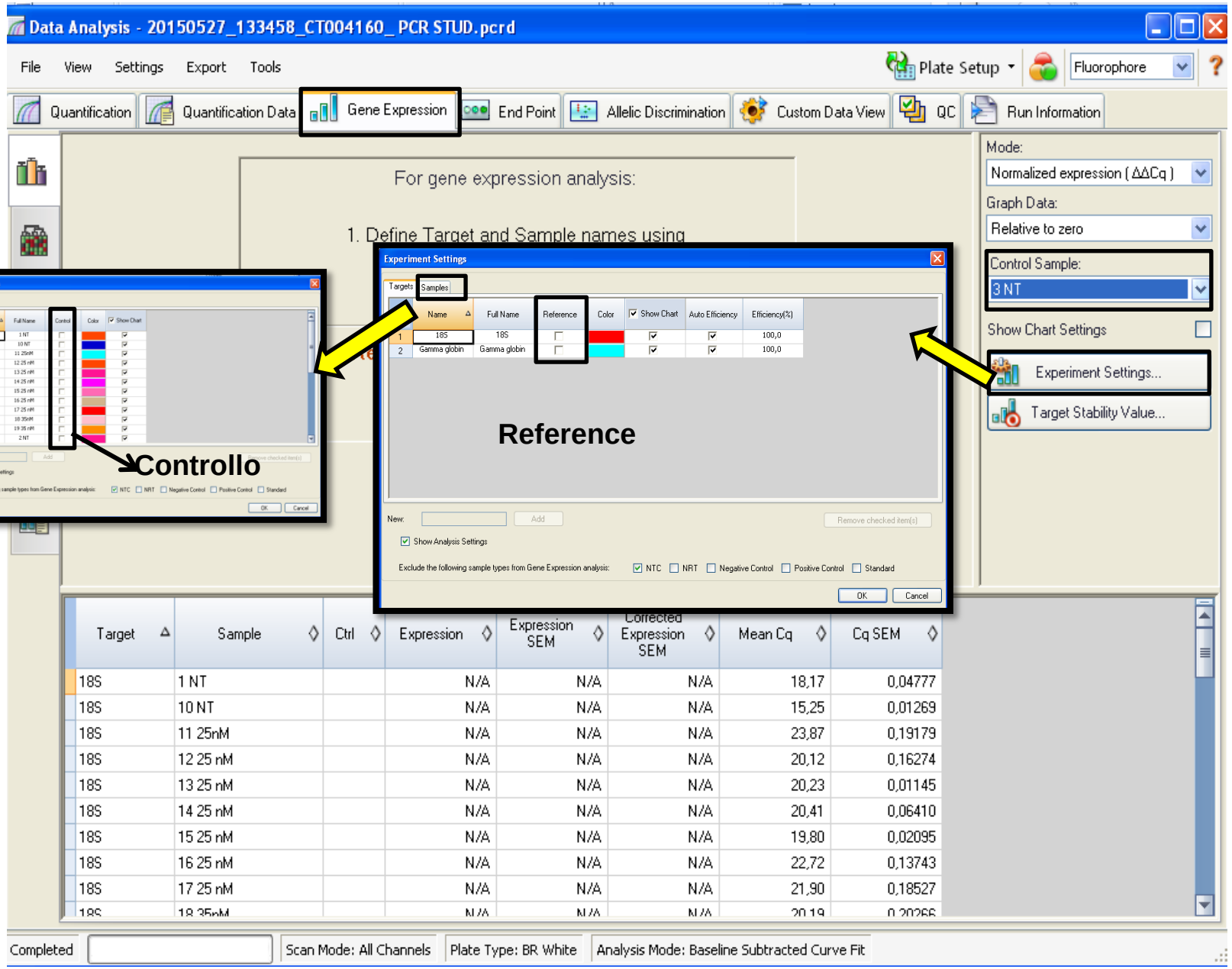
ΔΔCT = ΔCT campione INCOGNITO – ΔCT campione scelto come CONTROLLO

Confronto i CT dei campioni incogniti rispetto a un campione scelto dall'operatore come controllo (ad es. trattato vs non trattato, oppure patologia vs sano etc…)

3. Calcolo il FOLD change

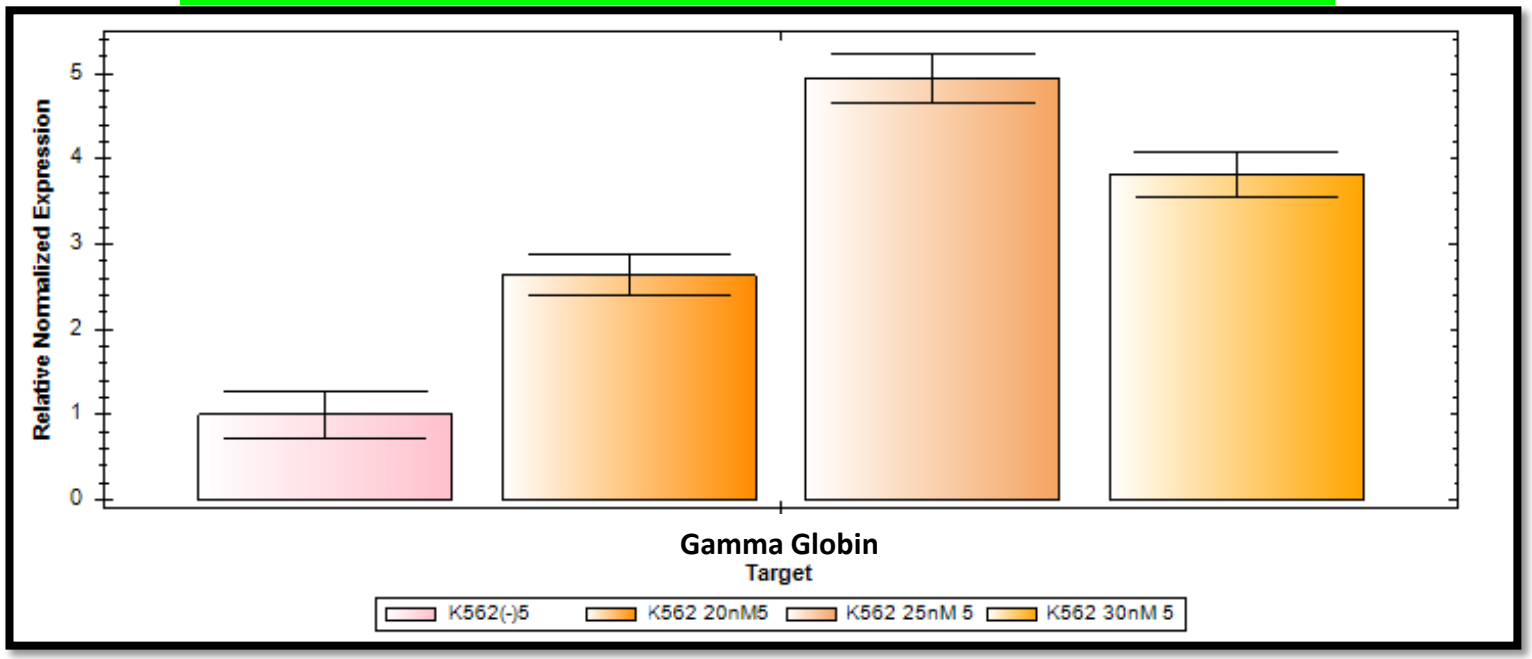
Fold change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

6.QUANTIFICAZIONE RELATIVA DEL GENE TARGET



Target	Sample	Ctrl	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
18S	1 NT		N/A	N/A	N/A	18,17	0,04777
18S	10 NT		N/A	N/A	N/A	15,25	0,01269
18S	11 25nM		N/A	N/A	N/A	23,87	0,19179
18S	12 25 nM		N/A	N/A	N/A	20,12	0,16274
18S	13 25 nM		N/A	N/A	N/A	20,23	0,01145
18S	14 25 nM		N/A	N/A	N/A	20,41	0,06410
18S	15 25 nM		N/A	N/A	N/A	19,80	0,02095
18S	16 25 nM		N/A	N/A	N/A	22,72	0,13743
18S	17 25 nM		N/A	N/A	N/A	21,90	0,18527
18S	18 35nM		N/A	N/A	N/A	20,19	0,20266

6.QUANTIFICAZIONE RELATIVA DEL GENE TARGET



Sample	Ctrl	Fold Expression	Errore Standard Expression SEM	Corrected Expression SEM	CT medio Mean Cq	Cq SEM
K562 20nM5		2,63328	0,24131	0,24131	26,12	0,12941
K562 25nM 4		3,35843	0,23284	0,23284	25,04	0,09980
K562 25nM 5		4,94617	0,29011	0,29011	25,66	0,07956
K562 30nM 4		3,22014	0,28171	0,28171	24,83	0,11791
K562 30nM 5		3,81577	0,26504	0,26504	26,16	0,09736
K562(-)5	*	1,00000	0,27098	0,27098	32,32	0,20024

$2^{-\Delta\Delta CT}$

✓ $2^{-\Delta\Delta CT} > 2$

Il gene target, nel campione in analisi, è più espresso rispetto al campione scelto come riferimento (controllo).

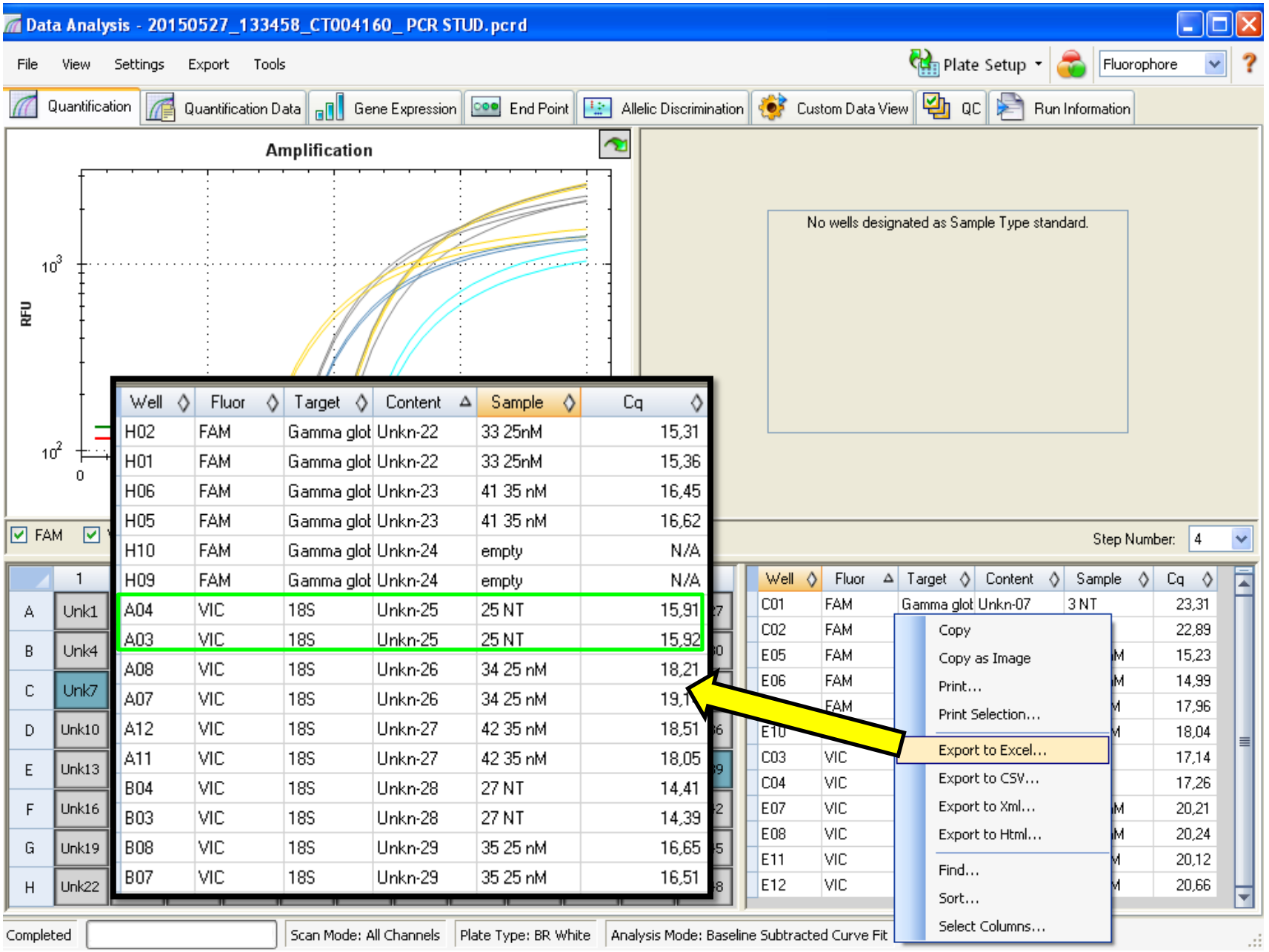
✓ $2^{-\Delta\Delta CT} < 0.5$

Il gene target, nel campione in analisi, è meno espresso rispetto al campione scelto come riferimento (controllo).

✓ $0,5 < 2^{-\Delta\Delta CT} > 2$

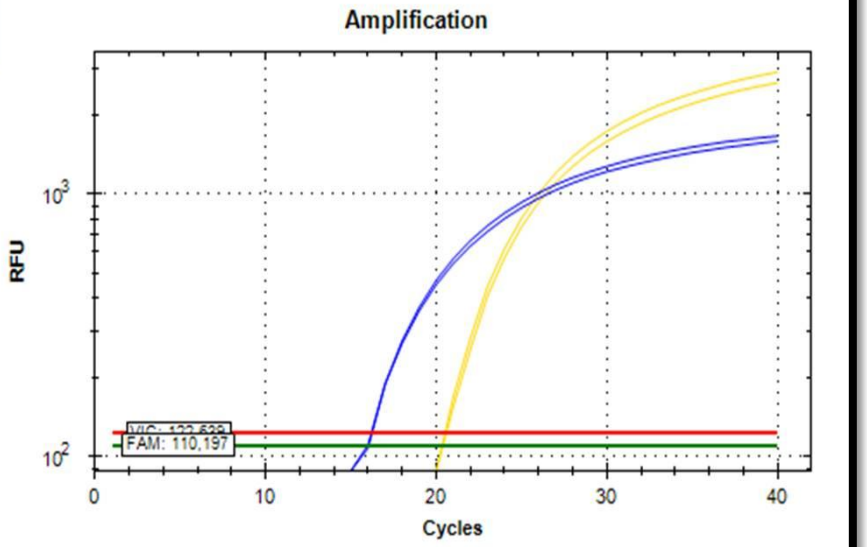
La variazione di espressione del gene target nel campione in analisi rispetto al campione scelto come controllo non è significativa.

6.QUANTIFICAZIONE RELATIVA DEL GENE TARGET



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
H02	FAM	Gamma glot	Unkn-22	33 25nM	15,31
H01	FAM	Gamma glot	Unkn-22	33 25nM	15,36
H06	FAM	Gamma glot	Unkn-23	41 35 nM	16,45
H05	FAM	Gamma glot	Unkn-23	41 35 nM	16,62
H10	FAM	Gamma glot	Unkn-24	empty	N/A
H09	FAM	Gamma glot	Unkn-24	empty	N/A
A04	VIC	18S	Unkn-25	25 NT	15,91
A03	VIC	18S	Unkn-25	25 NT	15,92
A08	VIC	18S	Unkn-26	34 25 nM	18,21
A07	VIC	18S	Unkn-26	34 25 nM	19,1
A12	VIC	18S	Unkn-27	42 35 nM	18,51
A11	VIC	18S	Unkn-27	42 35 nM	18,05
B04	VIC	18S	Unkn-28	27 NT	14,41
B03	VIC	18S	Unkn-28	27 NT	14,39
B08	VIC	18S	Unkn-29	35 25 nM	16,65
B07	VIC	18S	Unkn-29	35 25 nM	16,51

14 MTH
25nM



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
F05	FAM	Gamma glob	Unkn-17	14 25 nM	15,99
F06	FAM	Gamma glob	Unkn-17	14 25 nM	16,03
F07	VIC	18S	Unkn-41	14 25 nM	20,57
F08	VIC	18S	Unkn-41	14 25 nM	20,43

1. Calcolare la media dei replicati per ogni gene

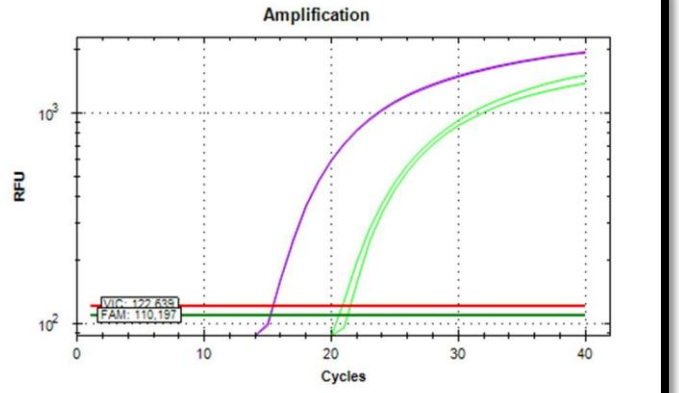
Gamma Globina-> (15.99+16.03)/2 = 16.01
18 s-> (20.57+20.43)/2= 20.5

2. Calcolare il ΔCT

ΔCT= CT gene target (gamma globin) – CT gene reference (18S)

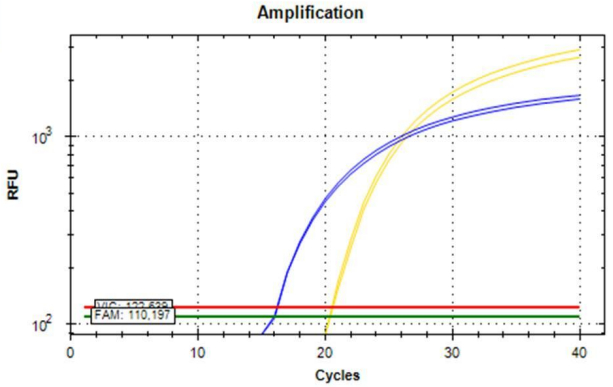
ΔCT= 16.01-20.5 = -4.49

10 NT



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
B05	FAM	Gamma glob	Unkn-05	10 NT	21,23
B06	FAM	Gamma glob	Unkn-05	10 NT	20,70
B07	VIC	18S	Unkn-29	10 NT	15,35
B08	VIC	18S	Unkn-29	10 NT	15,37

14 MTH
25nM



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
F05	FAM	Gamma glob	Unkn-17	14 25 nM	15,99
F06	FAM	Gamma glob	Unkn-17	14 25 nM	16,03
F07	VIC	18S	Unkn-41	14 25 nM	20,57
F08	VIC	18S	Unkn-41	14 25 nM	20,43

3. Calcolare il ΔΔCT

ΔΔCT= ΔCT trattato MTH - ΔCT del campione NT

ΔΔCT= -4.49-5.6=-10.09

4. Calcolare il fold change

Fold change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Fold change = 1089