



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

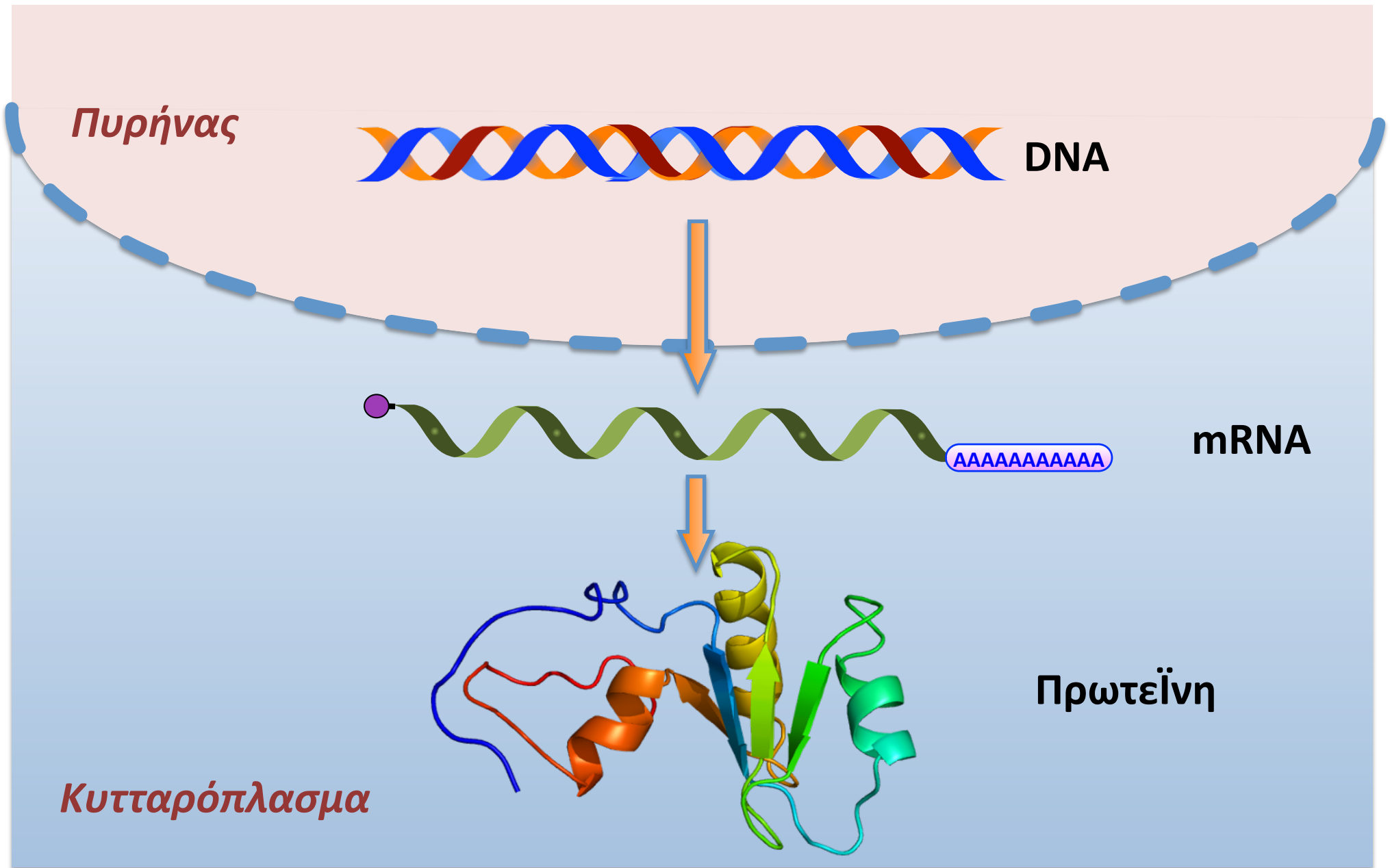
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ  
ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ



# Τεχνικές μελέτης γονιδιακής έκφρασης: Real-Time PCR

Νικόλαος Μπαλατσός

# Το κεντρικό δόγμα

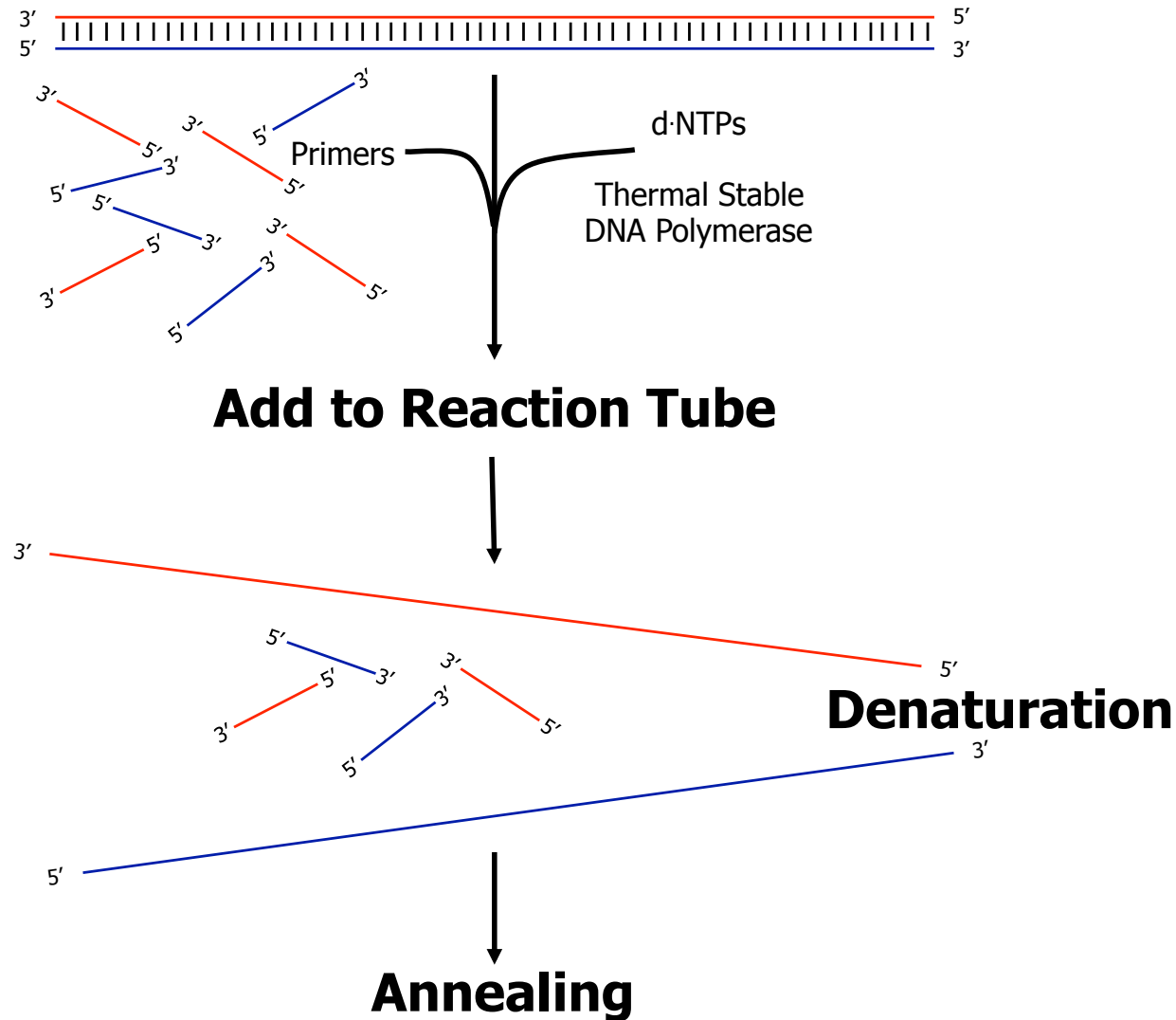


**PCR σε πραγματικό χρόνο**

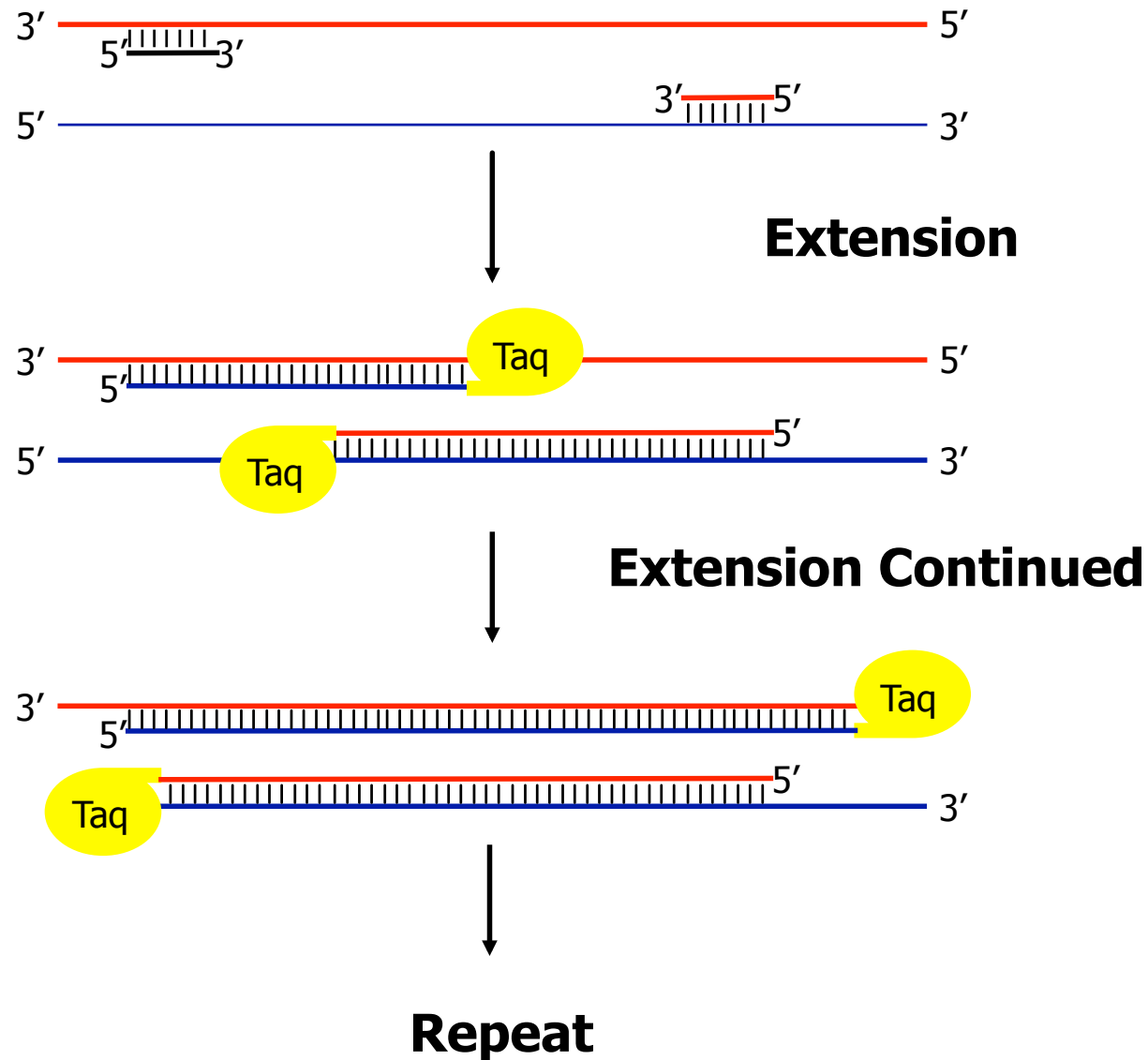
**ή**

**Real-Time PCR**

# PCR, Polymerase Chain Reaction

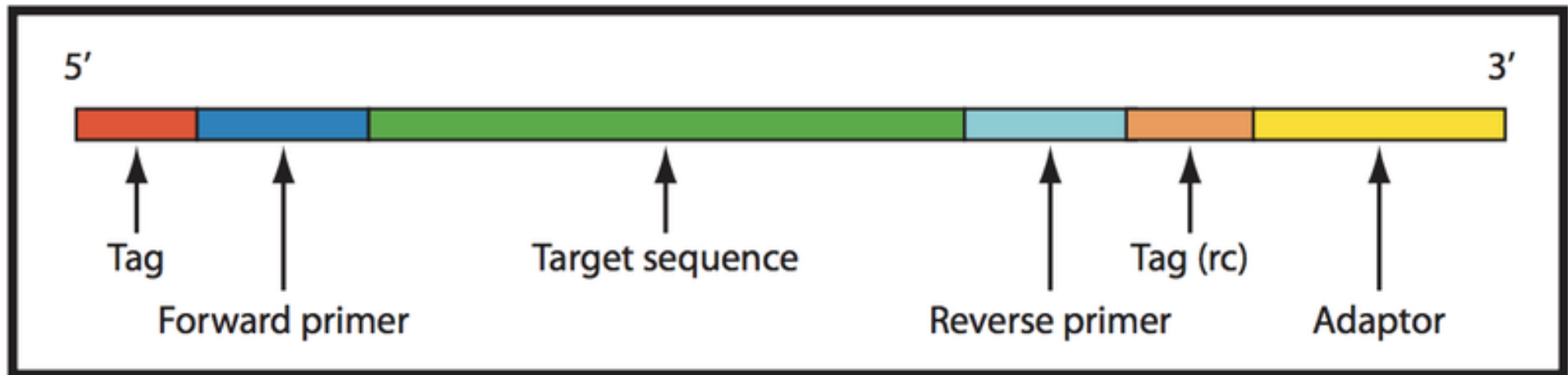


# PCR, Polymerase Chain Reaction



# Amplicon

## το προϊόν της PCR

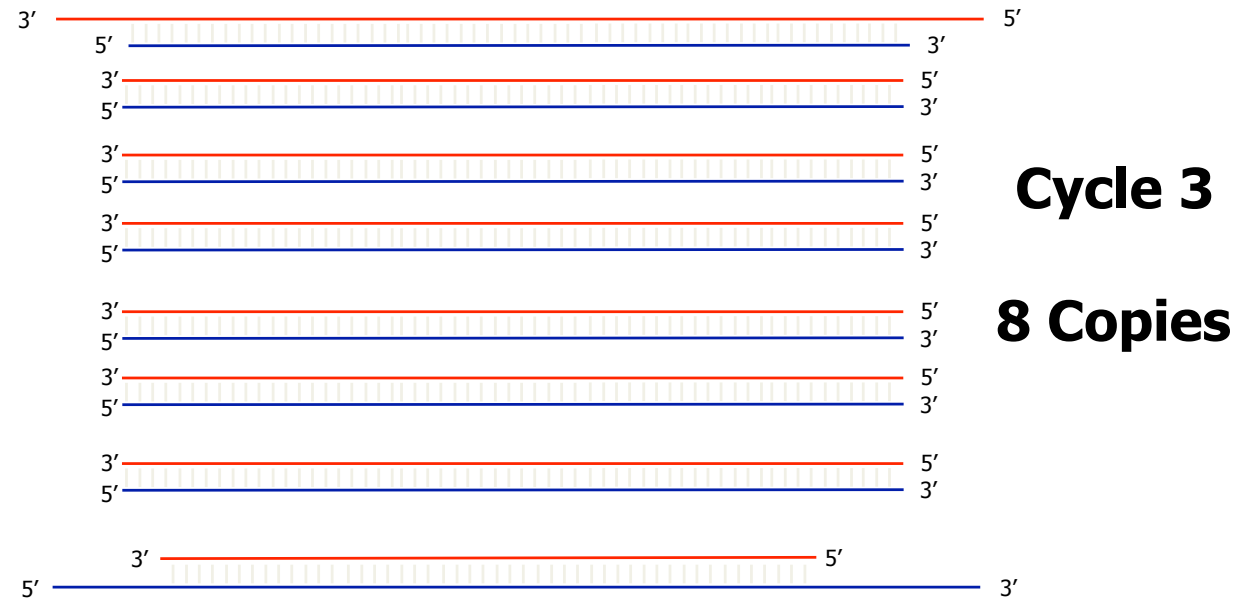
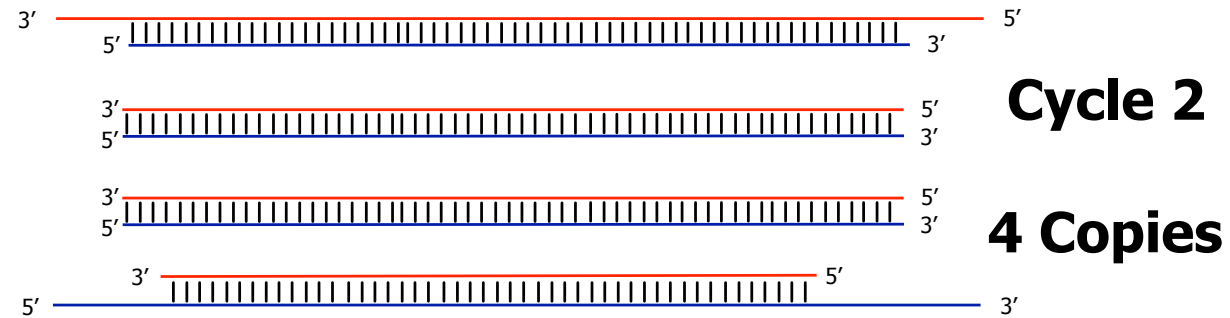


Τμήμα DNA ή RNA

εκμαγείο ή προϊόν αντίδρασης ενίσχυσης ή αντιγραφής

συνήθως, ο όρος χρησιμοποιείται αδιακρίτως ως «προϊόν PCR», ή PCR product.

# PCR, Polymerase Chain Reaction

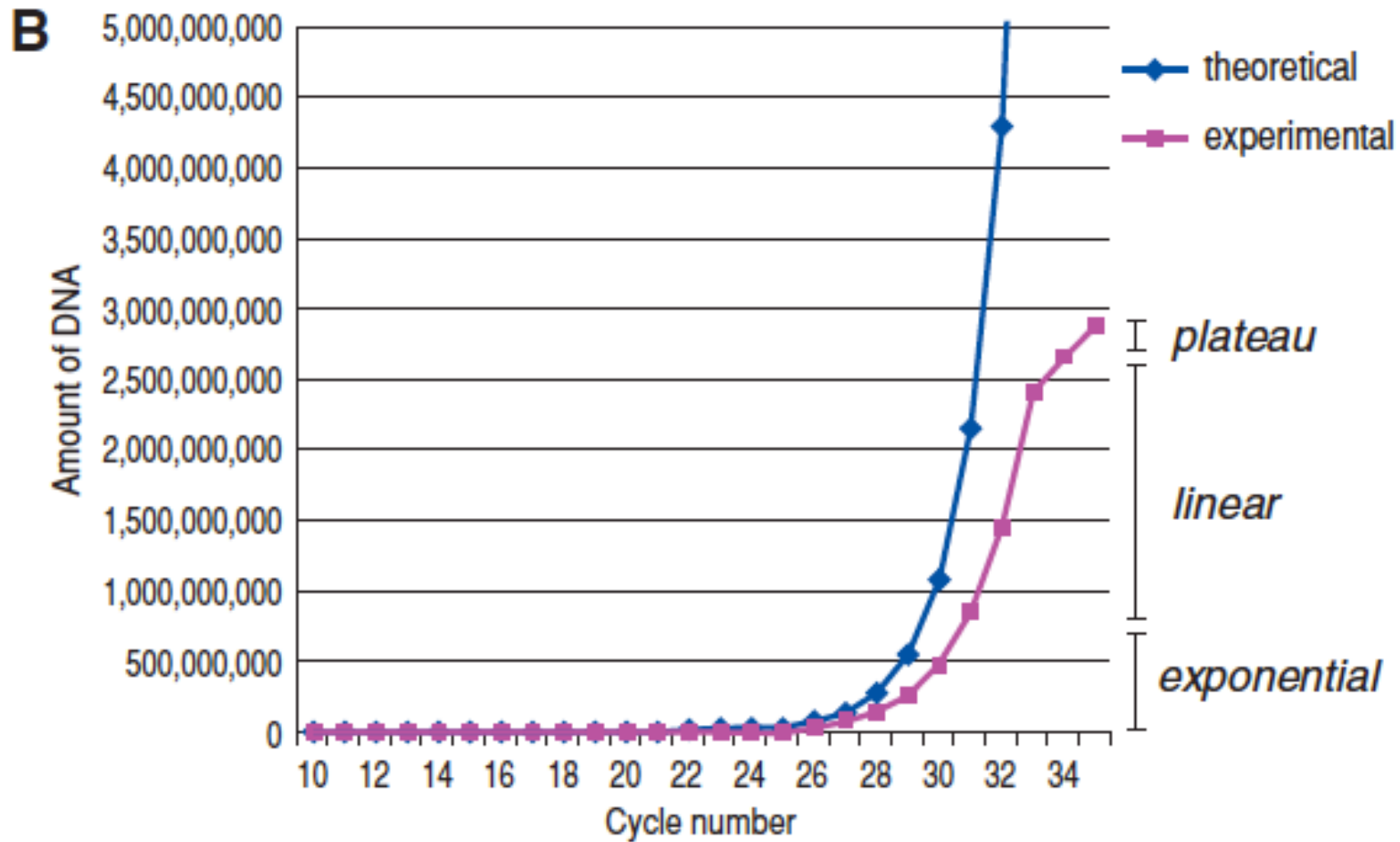




Cycle nb	Theoretical doubling	Log10(amount of DNA)	Experimental	Log10(amount of DNA)
0	1	0.0000	1	0.0000
1	2	0.3010	2	0.3010
2	4	0.6021	4	0.6021
3	8	0.9031	8	0.9031
4	16	1.2041	16	1.2041
5	32	1.5051	32	1.5051
6	64	1.8062	64	1.8062
7	128	2.1072	128	2.1072
8	256	2.4082	256	2.4082
9	512	2.7093	322	2.5079
10	1,024	3.0103	1,004	3.0015
11	2,048	3.3113	1,987	3.2981
12	4,096	3.6124	3,932	3.5946
13	8,192	3.9134	7,782	3.8911
14	16,384	4.2144	15,401	4.1875
15	32,768	4.5154	30,474	4.4839
16	65,536	4.8165	60,293	4.7803
17	131,072	5.1175	115,343	5.0620
18	262,144	5.4185	225,444	5.3530
19	524,288	5.7196	440,402	5.6438
20	1,048,576	6.0206	859,832	5.9344
21	2,097,152	6.3216	1,677,722	6.2247
22	4,194,304	6.6227	3,187,671	6.5035
23	8,388,608	6.9237	6,039,798	6.7810
24	16,777,216	7.2247	11,408,507	7.0572
25	33,554,432	7.5257	21,474,836	7.3319
26	67,108,864	7.8268	40,265,318	7.6049
27	134,217,728	8.1278	75,161,928	7.8760
28	268,435,456	8.4288	139,586,437	8.1448
29	536,870,912	8.7299	257,698,038	8.4111
30	1,073,741,824	9.0309	472,446,403	8.6744
31	2,147,483,648	9.3319	858,993,459	8.9340
32	4,294,967,296	9.6330	1,460,288,881	9.1644
33	8,589,934,592	9.9340	2,405,181,686	9.3811
34	17,179,869,184	10.2350	2,646,522,913	9.4227
35	34,359,738,368	10.5360	2,876,350,229	9.4588

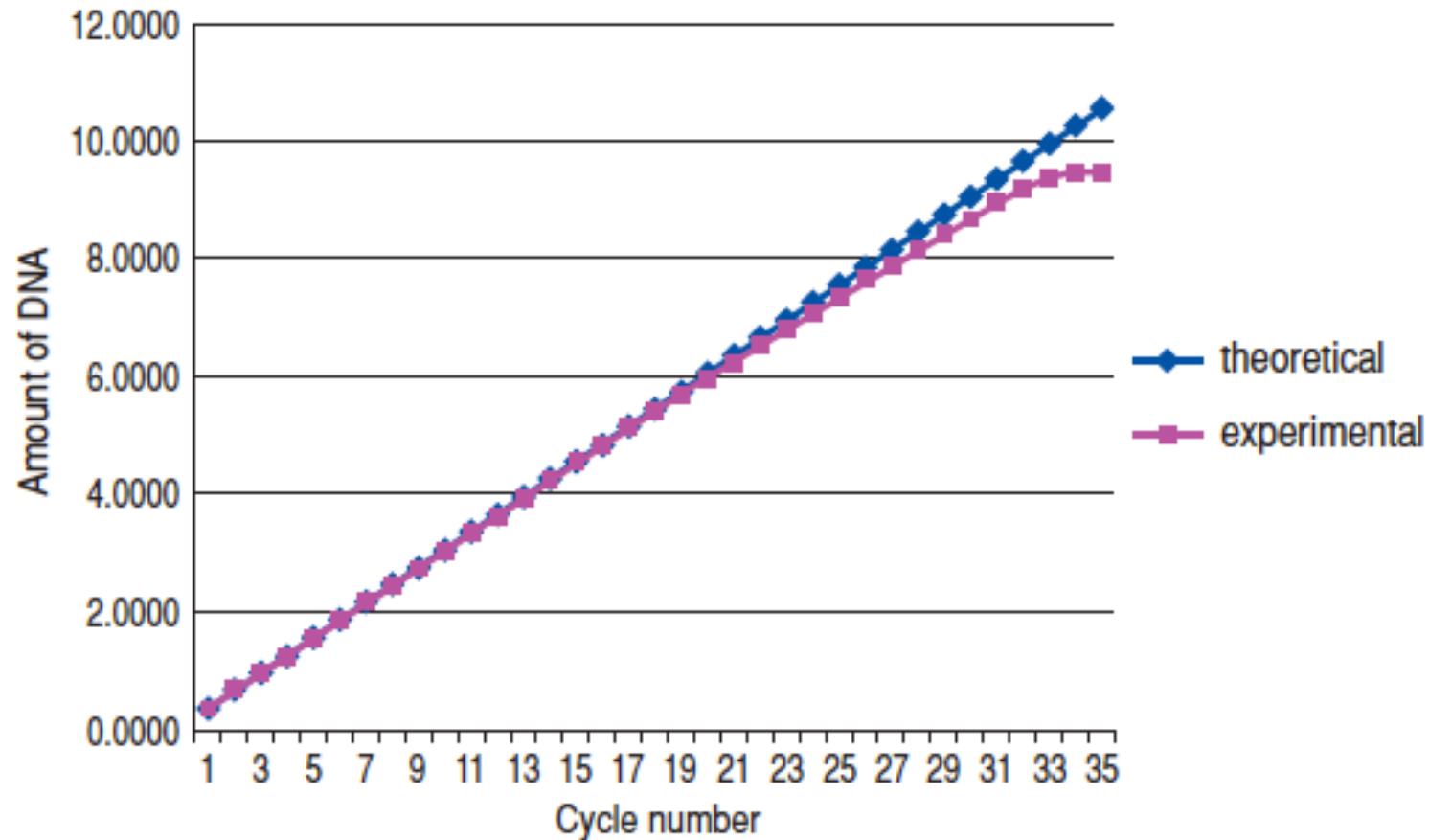
# PCR, θεωρητικός και πειραματικός διπλασιασμός

## Γραμμική απεικόνιση

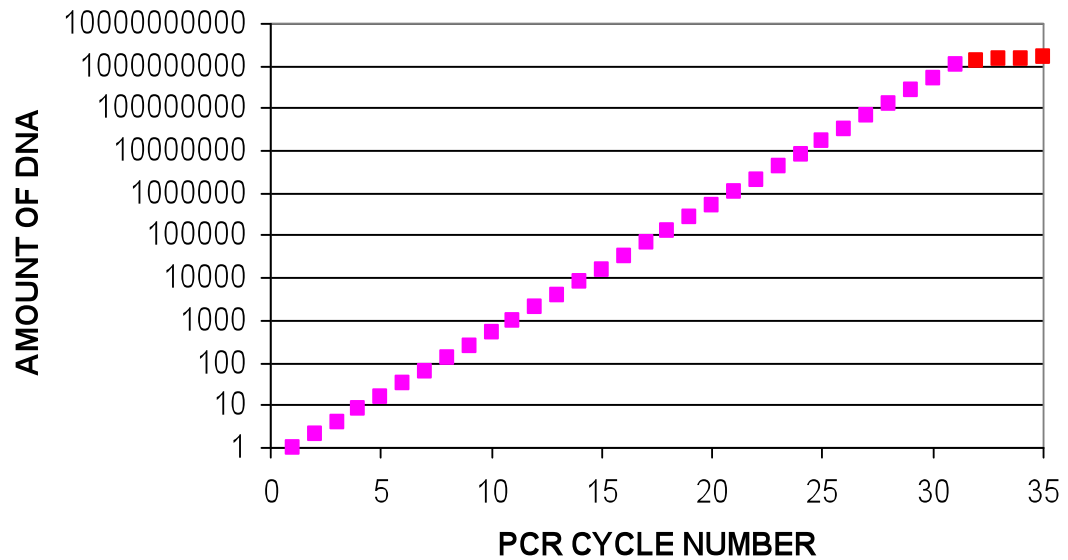
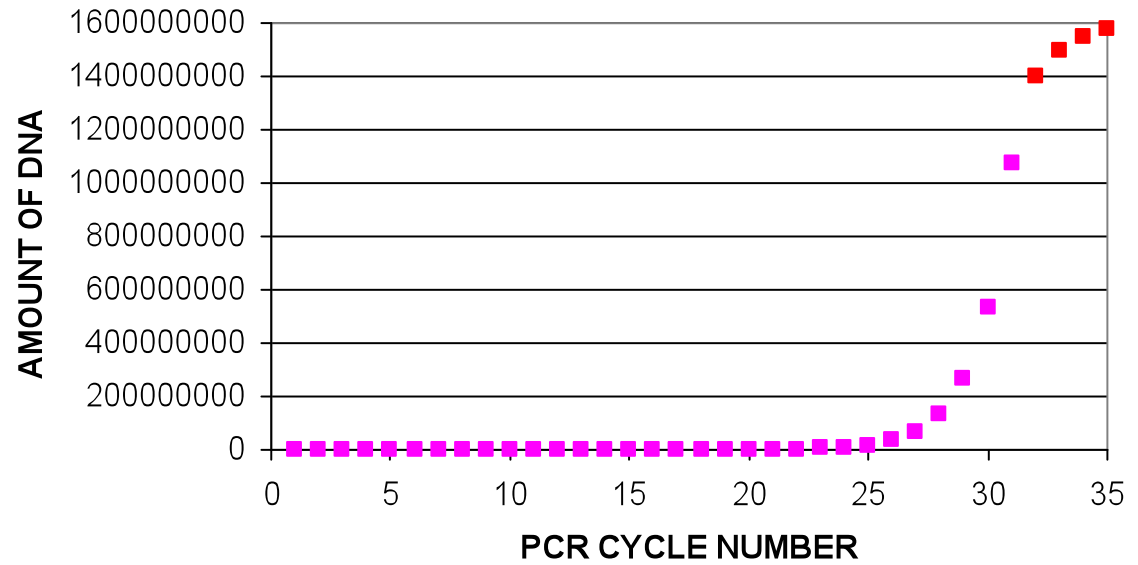


# PCR, θεωρητικός και πειραματικός διπλασιασμός

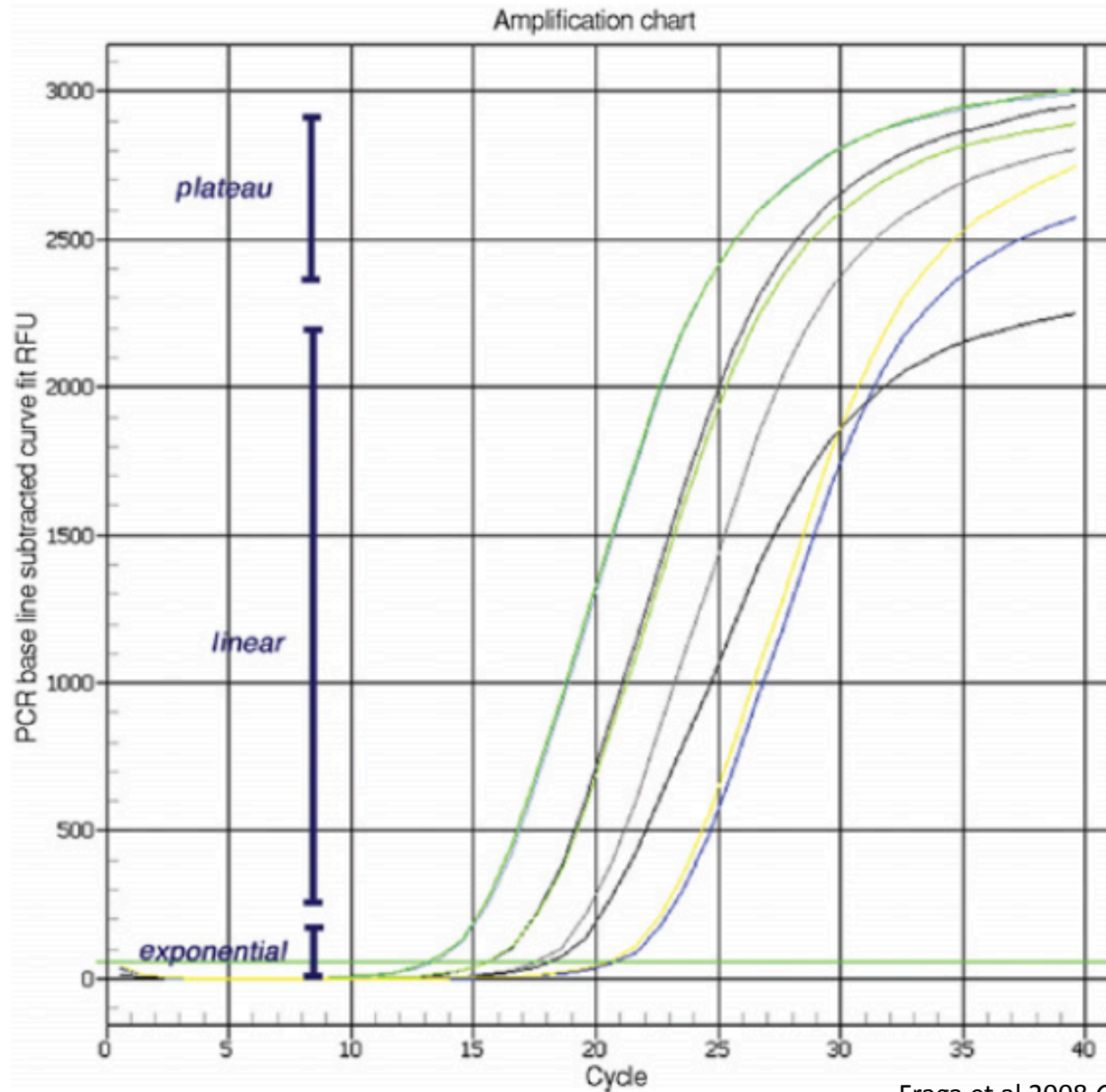
## Λογαριθμική απεικόνιση



CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000



# Διάγραμμα φάσεων μιας PCR

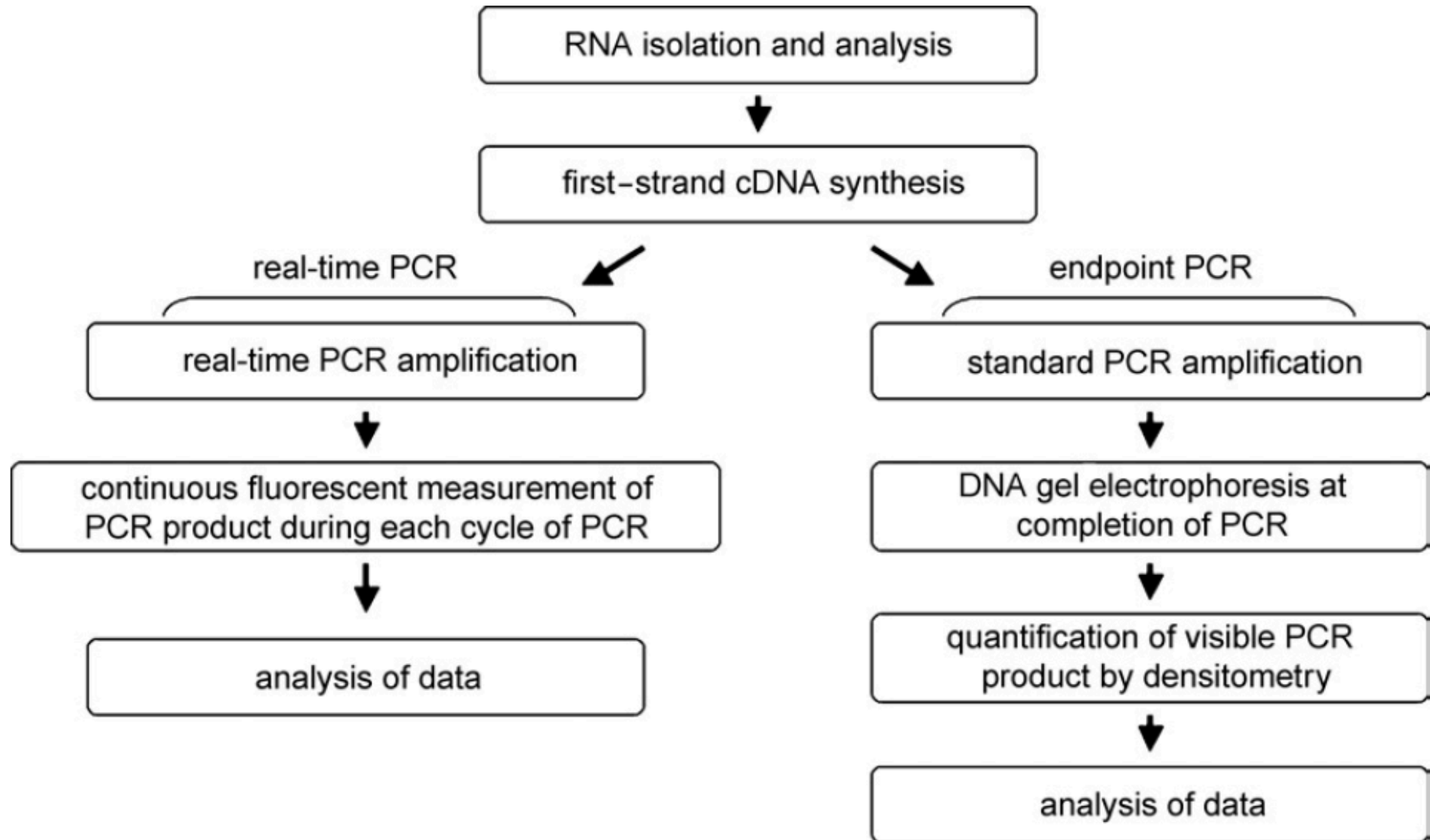


# PCR – Real Time PCR

## Η Real-Time PCR

1. μετρά την ποσότητα των προϊόντων (amplicons) σε κάθε κύκλο της ενίσχυσης μετρώντας ένταση φθορισμού
2. Μετρά την παραγωγή προϊόντων (amplicons) **κατά την εκθετική φάση (*exponential phase*)** σε αντίθεση με την απλή PCR που μετρά το προϊόν στο τέλος της αντίδρασης

# PCR – Real Time PCR



# Real Time PCR

- 1. Δείγμα RNA υψηλής ποιότητας και καθαρότητας**
- 2. Μετατροπή RNA σε cDNA**
- 3. Ευαίσθητη και ακριβής ανίχνευση προϊόντων PCR  
σε πραγματικό χρόνο**



# Real Time PCR

**1° ΒΗΜΑ:** σύνθεση cDNA από δείγμα RNA

*απομόνωση RNA*

*σύνθεση cDNA από RNA*

**2° ΒΗΜΑ:** βελτίωση συνθηκών για ανάλυση σε πραγματικό χρόνο

*σχεδιασμός εκκινητών*

*θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature)*

*συγκέντρωση εκκινητών*

*συγκέντρωση [Mg<sup>2+</sup>] και εκμαγείων*

**3° ΒΗΜΑ:** Ανίχνευση προϊόντων PCR από τον κυκλοποιητή

*Φθορίζουσες χρωστικές για παρακολούθηση της αντίδρασης*

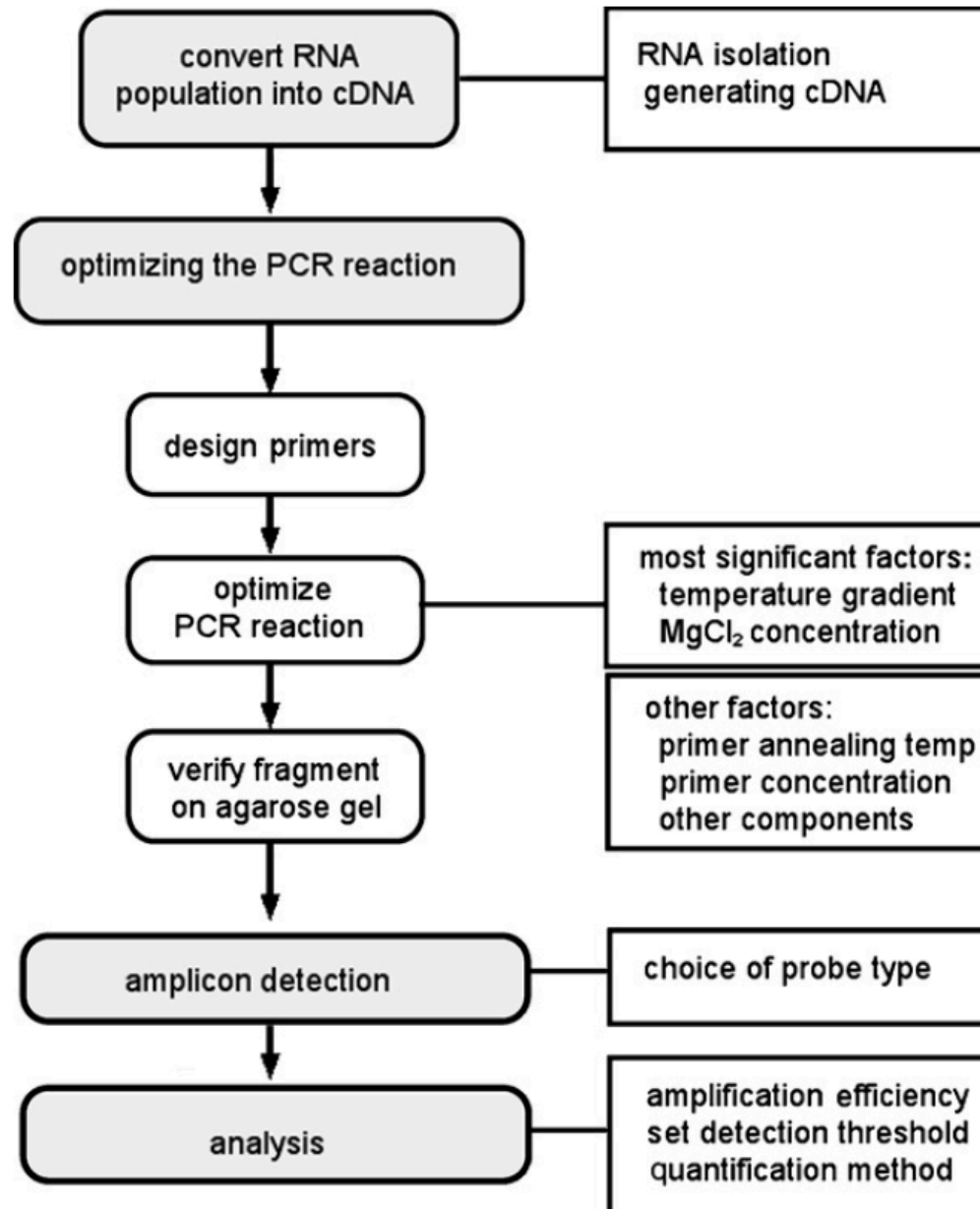
*Μη ειδικοί φθορίζοντες ιχνηθέτες*

*Ειδικοί (συμπληρωματικοί) φθορίζοντες ιχνηθέτες*

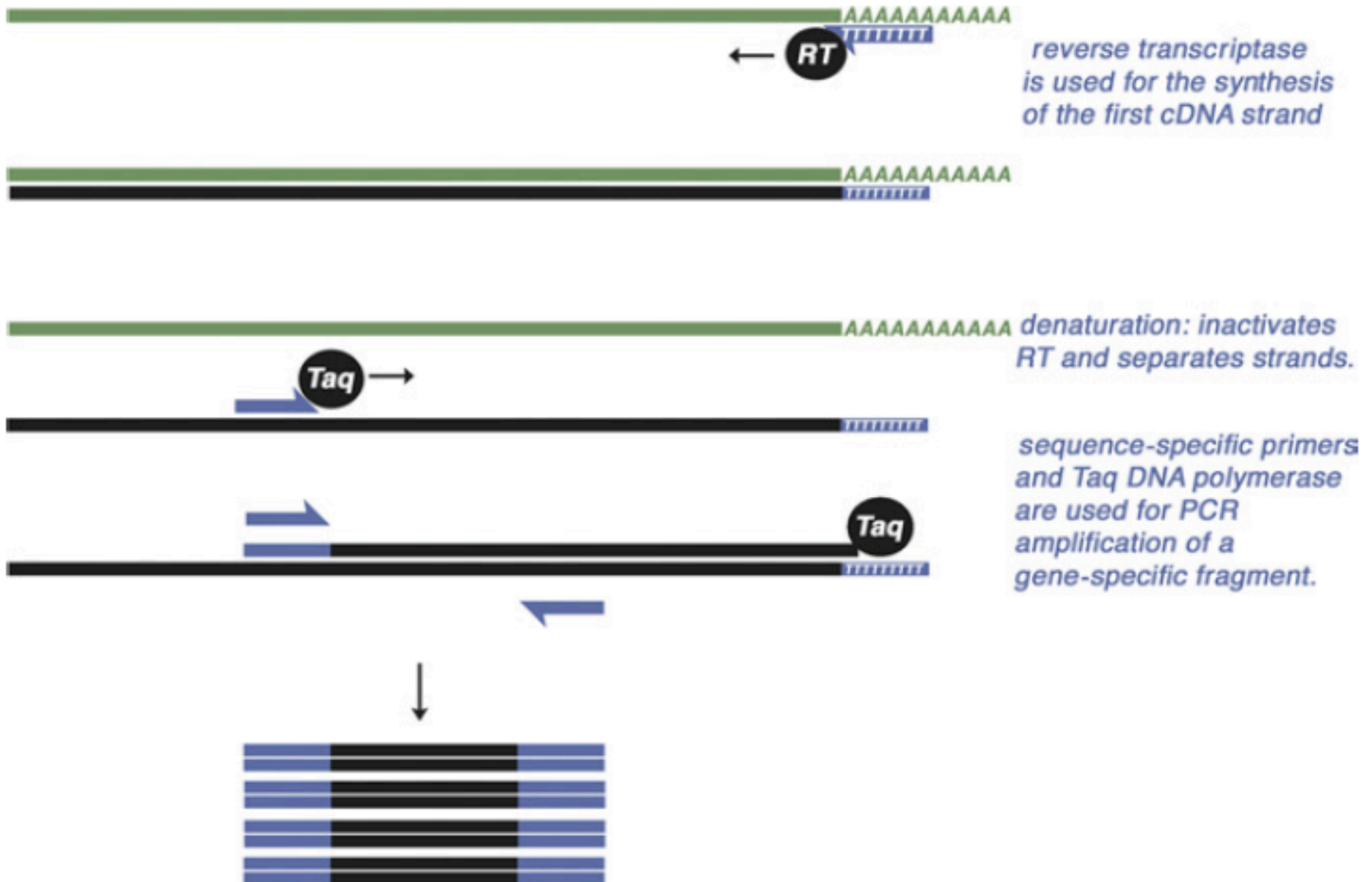
*Ανάλυση θ/σιών αποδιάταξης (melting points) για ειδική ενίσχυση*

**4° ΒΗΜΑ:** Ανάλυση και ποσοτικοποίηση Real Time-PCR

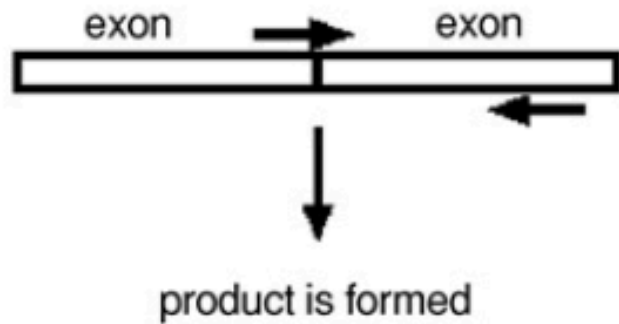
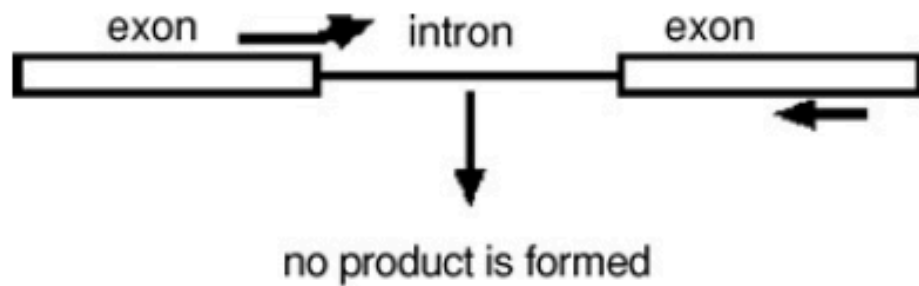
# PCR – Real Time PCR



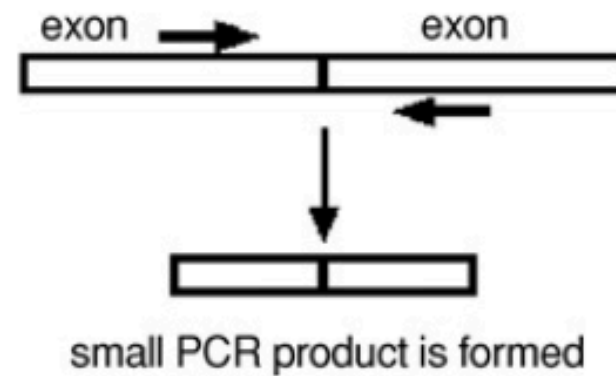
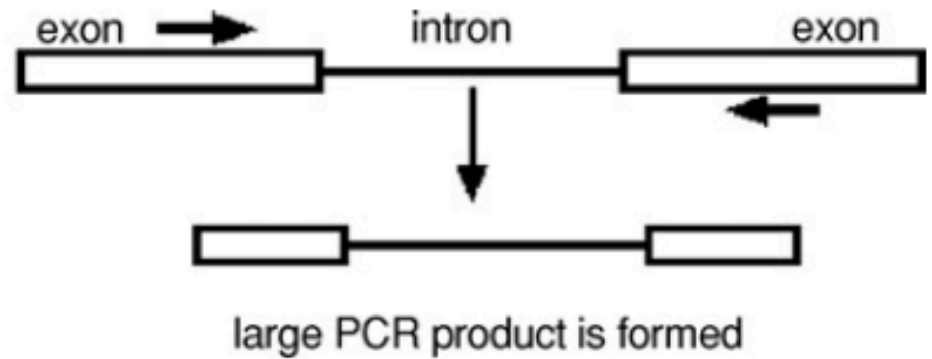
# 1<sup>ο</sup> βήμα: σύνθεση cDNA από RNA



# Σχεδιασμός εκκινητών Real Time PCR

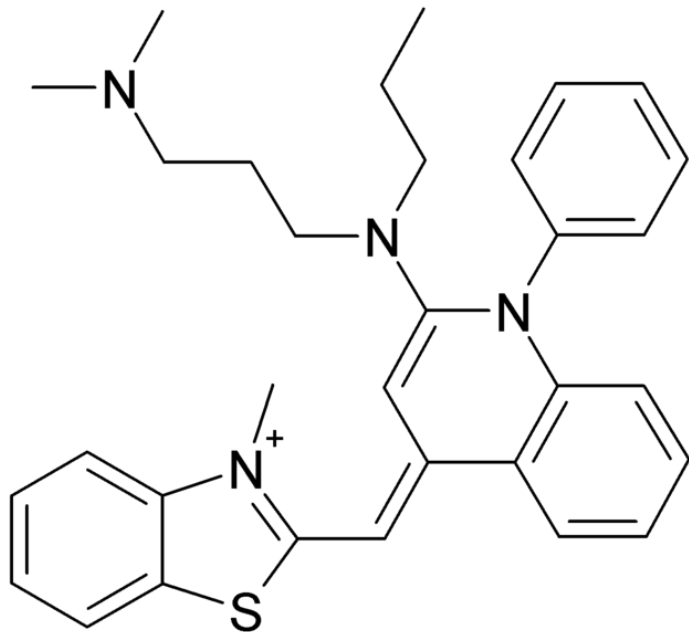


primer straddles an intron



primers flank an intron

# Φθορίζουσες χρωστικές, SYBR Green I

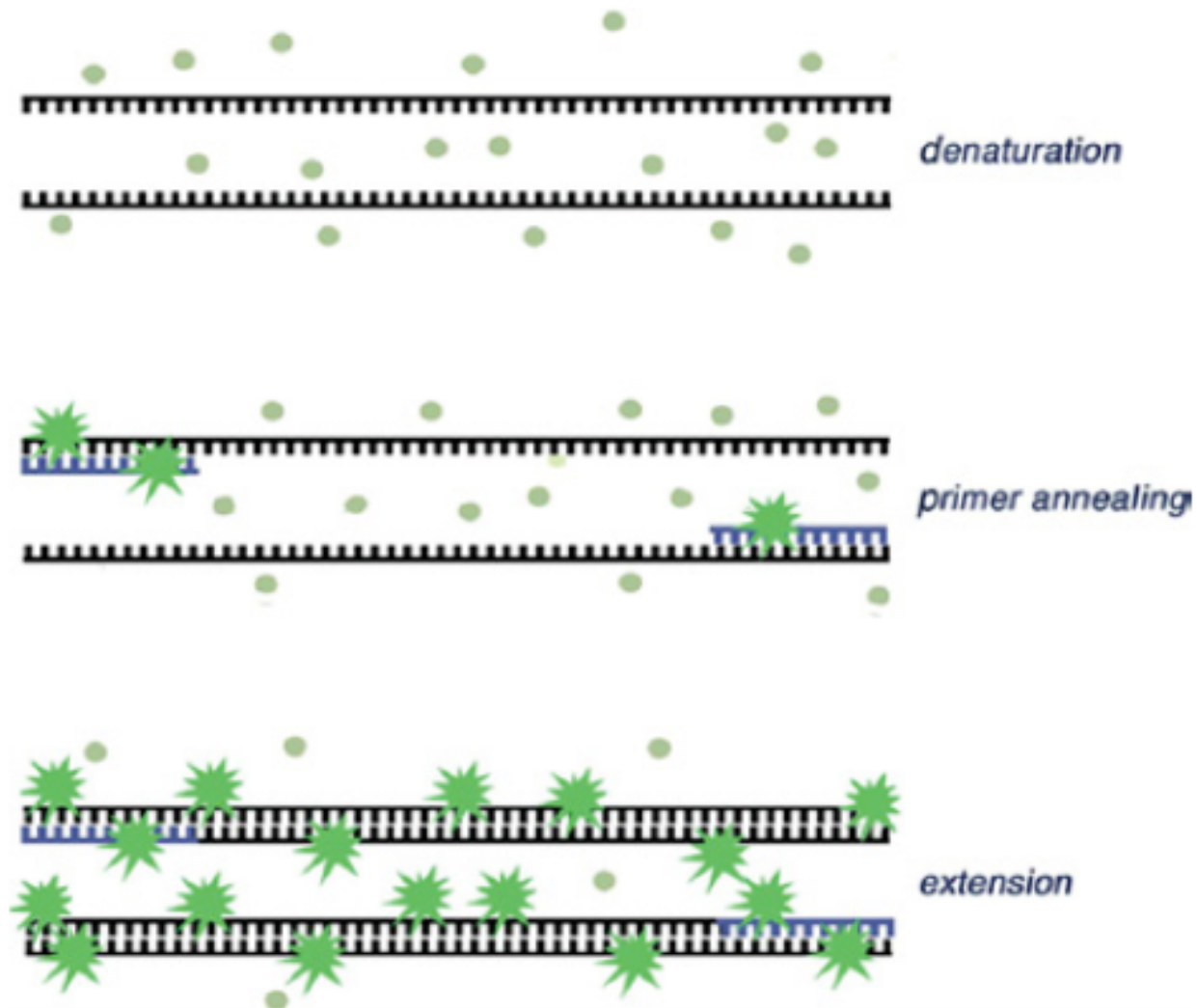


absorbs blue light ( $\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$ )  
emits green light ( $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ )

SYBR® family  
Molecular Probes, Inc.,  
(Life Technologies Corporation)

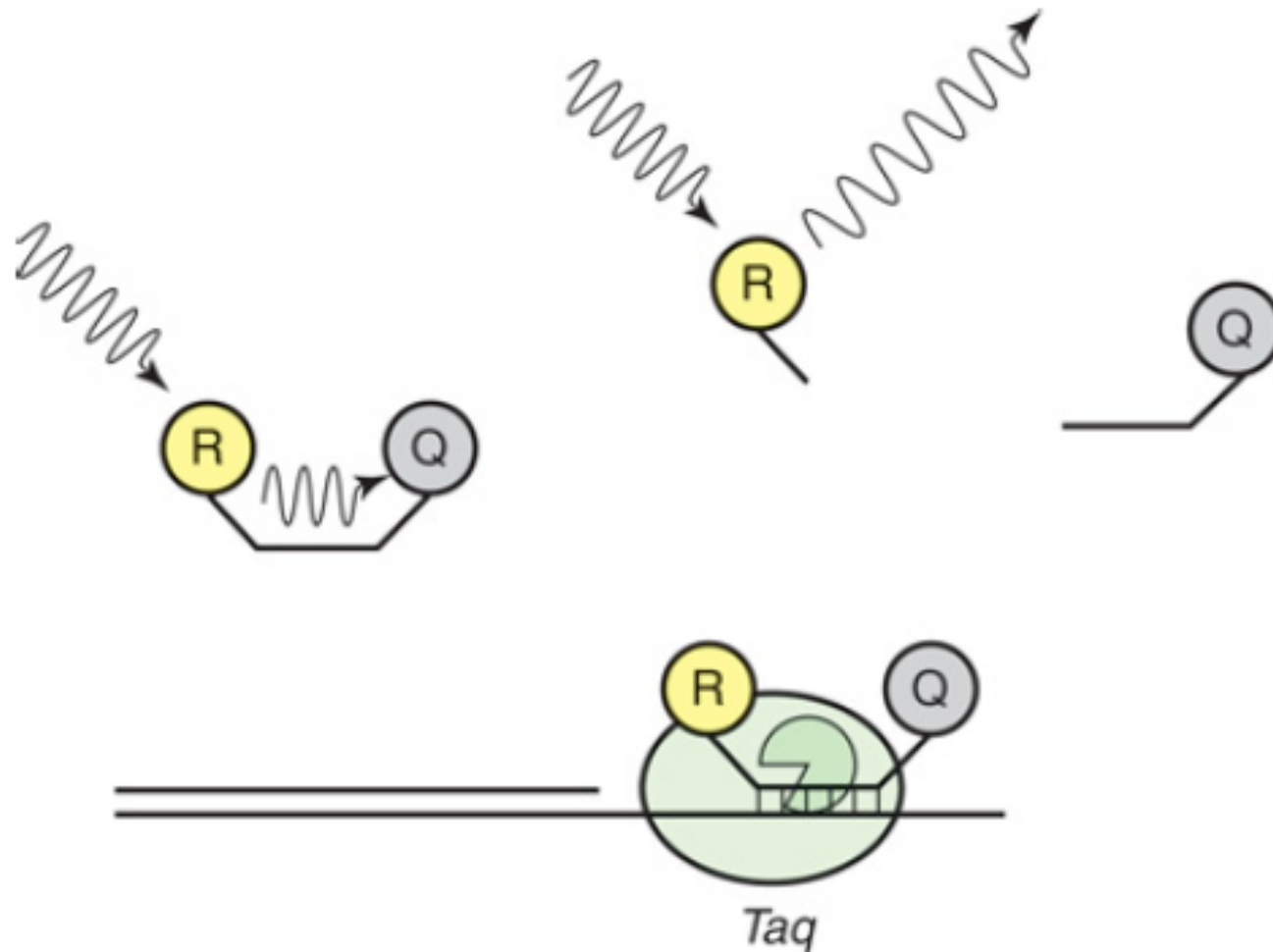


# PCR – Real Time PCR



**Η ενταση του φθορισμού αυξάνει 10-200 φορές  
όταν δεθεί στη μικρή αύλακα του DNA**

# Συμπληρωματικά ειδικό φθορίζοντες ιχνηθέτες: (*strand-specific probes*) *TaqMan*



# Real Time PCR

## Ποιοτικός έλεγχος – μάρτυρες (controls)

### Αρνητικοί μάρτυρες

1. Δείγμα χωρίς εκμαγείο
2. Δείγμα χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση

### Θετικοί μάρτυρες

1. **DNA** (γνωστό δείγμα με την αλληλουχία – στόχο)
2. **RNA** (γνωστό δείγμα με την αλληλουχία – στόχο)



$C_T$

## Κατώφλι ανίχνευσης, cycle threshold

Το επίπεδο σήματος του φθορισμού  
που είναι ικανοποιητικά πάνω από το θόρυβο  
ώστε να θεωρηθεί αξιόπιστο

Δίνει το μέτρο σύγκρισης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων

# PCR – Real Time PCR

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824

Αντίδραση PCR, κύκλος 25



# PCR – Real Time PCR

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824



## Κύκλος 25

Νουκλεοτίδια, εκκινητές, υποστρώματα  
Πολυμεράση, amplicons, κλπ.

**1,000,000 αντίγραφα amplicon**

**Ας υποθέσουμε πως τα 1 000 000 amplicons  
είναι η ελάχιστη ποσότητα που ανιχνεύεται ικανοποιητικά,  
χωρίς θόρυβο**

# PCR – Real Time PCR

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824



## Κύκλος 24;

Περίπου τα ίδια,  
με 500.000 αντίγραφα του amplicon.

## Κύκλος 23;

Περίπου τα ίδια,  
με 250.000 αντίγραφα του amplicon.

## Κύκλος 22;

Περίπου τα ίδια,  
με 125.000 αντίγραφα του amplicon.

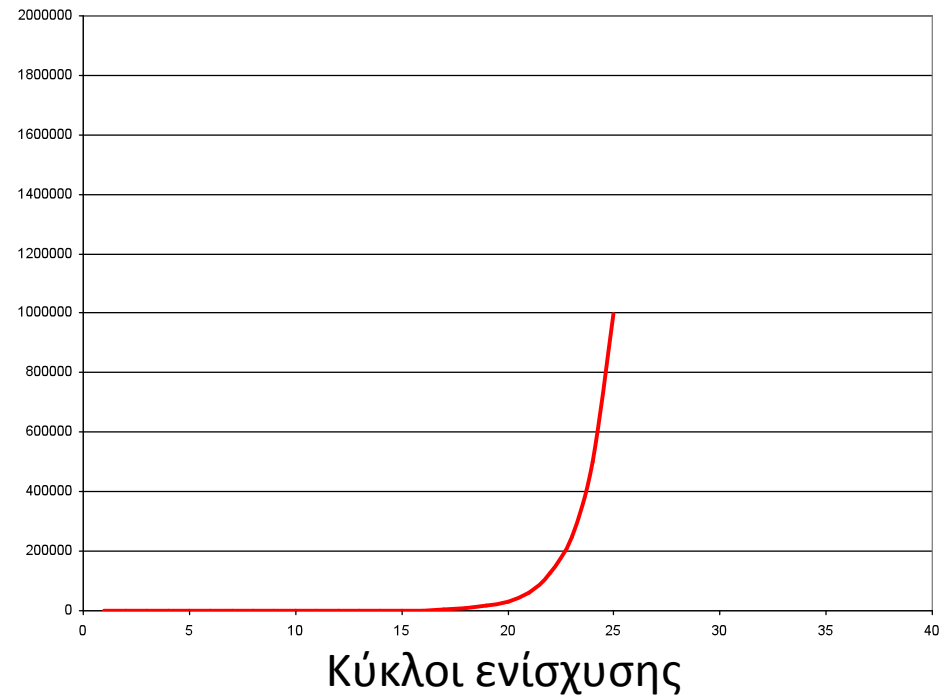
# PCR – Real Time PCR

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824



**Απεικόνιση ποσότητας DNA στο σωλήνα μέχρι τον κύκλο 25**

Ποσότητα DNA



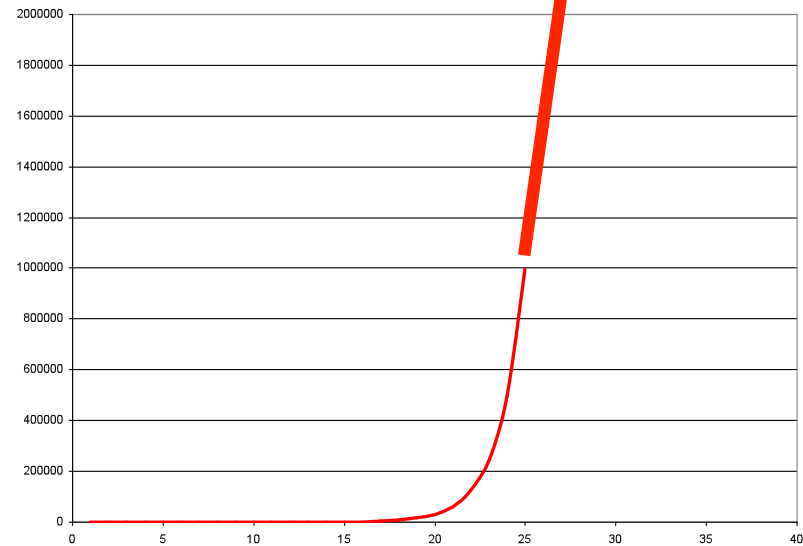
# PCR – Real Time PCR

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824



Ποσότητα DNA

Κύκλος 26;



Κύκλοι ενίσχυσης

# PCR – Real Time PCR

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824



**Μετά τον κύκλο 26;**

2.000.000 amplicons.

**Κύκλος 27;**

4.000.000 amplicons.

**Κύκλος 200;**

(1.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.  
000.000.000.000.000.000.000.000.000 amplicons...



# PCR – Real Time PCR

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824



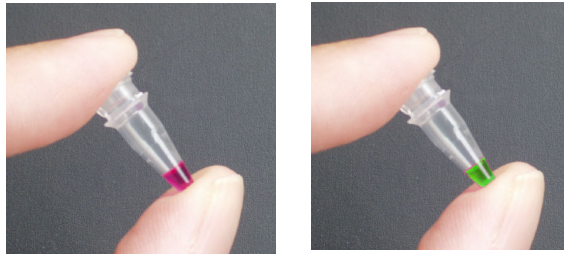
Ποσότητα DNA





# PCR – Real Time PCR

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824



**Αν ξεκινήσω με 4πλάσιο DNA (X4)...**

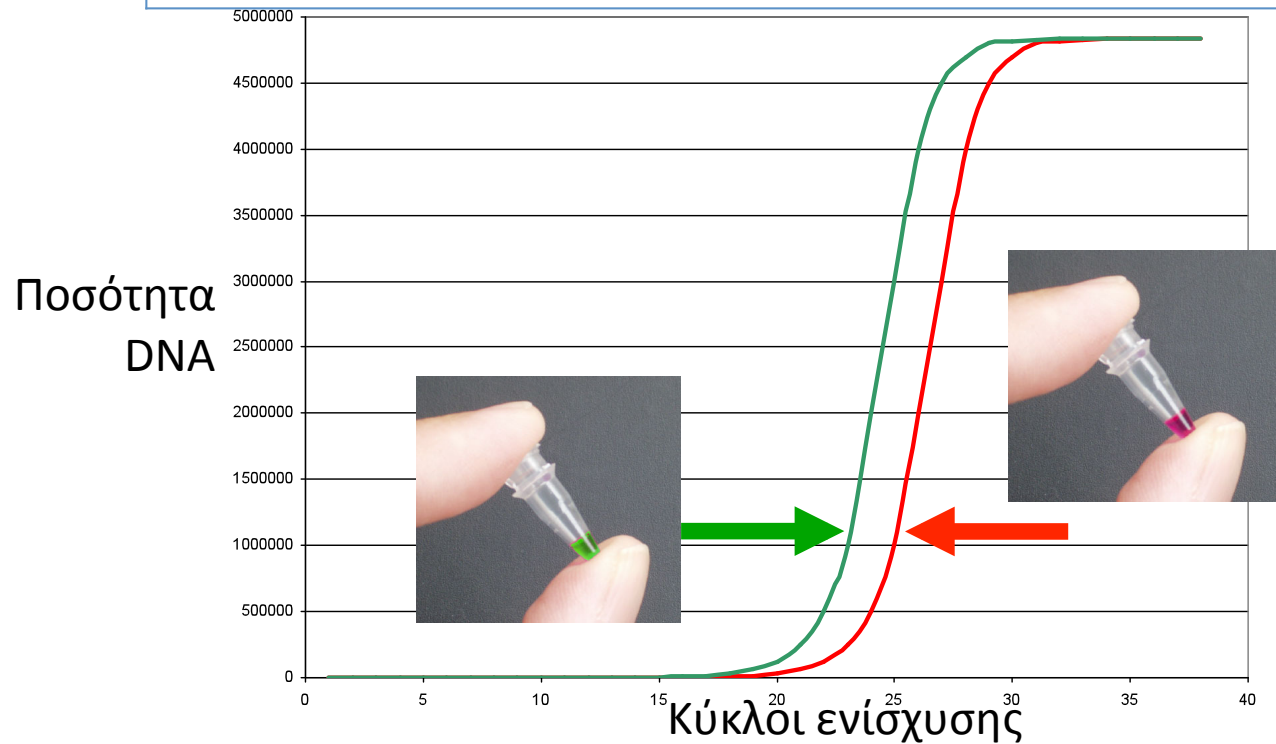
<i>Κύκλος</i>	ΠΡΙΝ	DNA ×4
25	1 000 000	4 000 000
24	500 000	2 000 000
23	250 000	1 000 000
22	125 000	500 000

# PCR – Real Time PCR

...φτάνω στο 1 000 000 amplicons  
δύο κύκλους νωρίτερα

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824

Κύκλος	ΠΡΙΝ	DNA ×4
22	125 000	500 000
23	250 000	<b>1 000 000</b>
24	500 000	2 000 000
25	<b>1 000 000</b>	4 000 000



# PCR – Real Time PCR

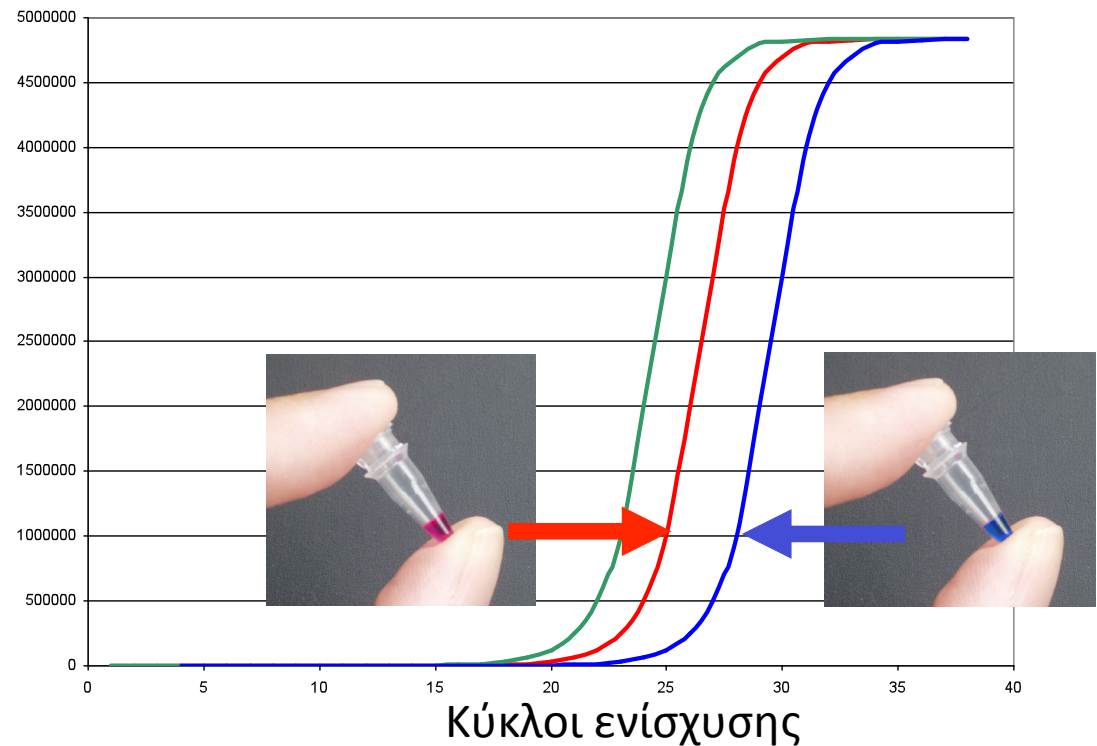
CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1.073.741.824

Αν ξεκινήσω με 1/8 DNA (DNA/8)...

Φτάνουμε το 1 000 000 amplicons 3 κύκλους αργότερα

Κύκλος	ΠΡΙΝ	DNA/8
25	1 000 000	125 000
26	2 000 000	250 000
27	4 000 000	500 000
28	8 000 000	1 000 000

Ποσότητα DNA



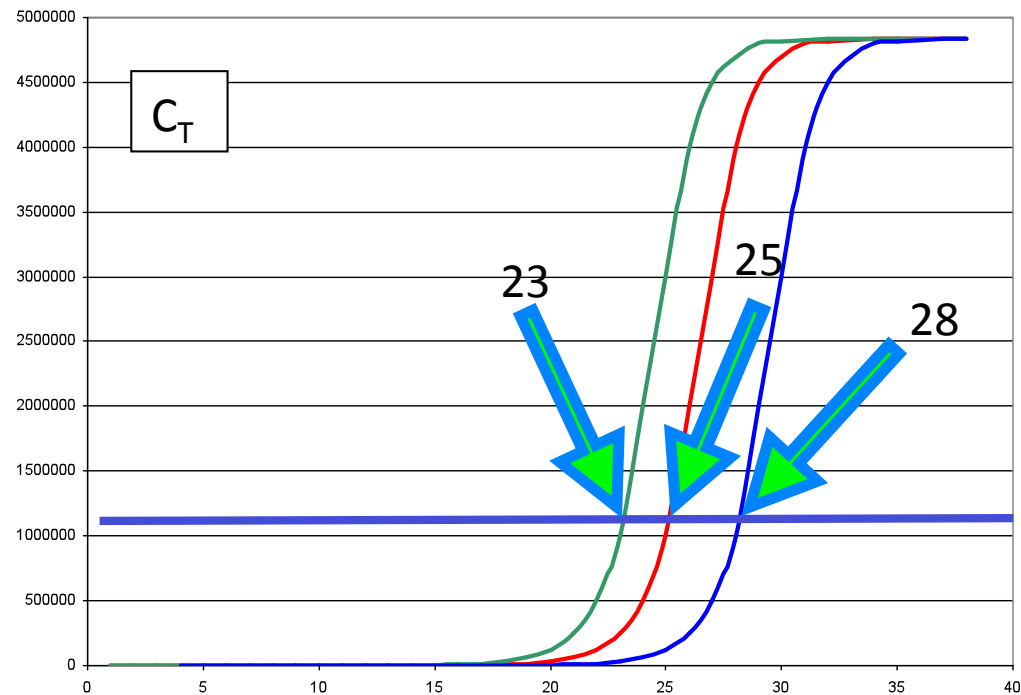
$C_T$

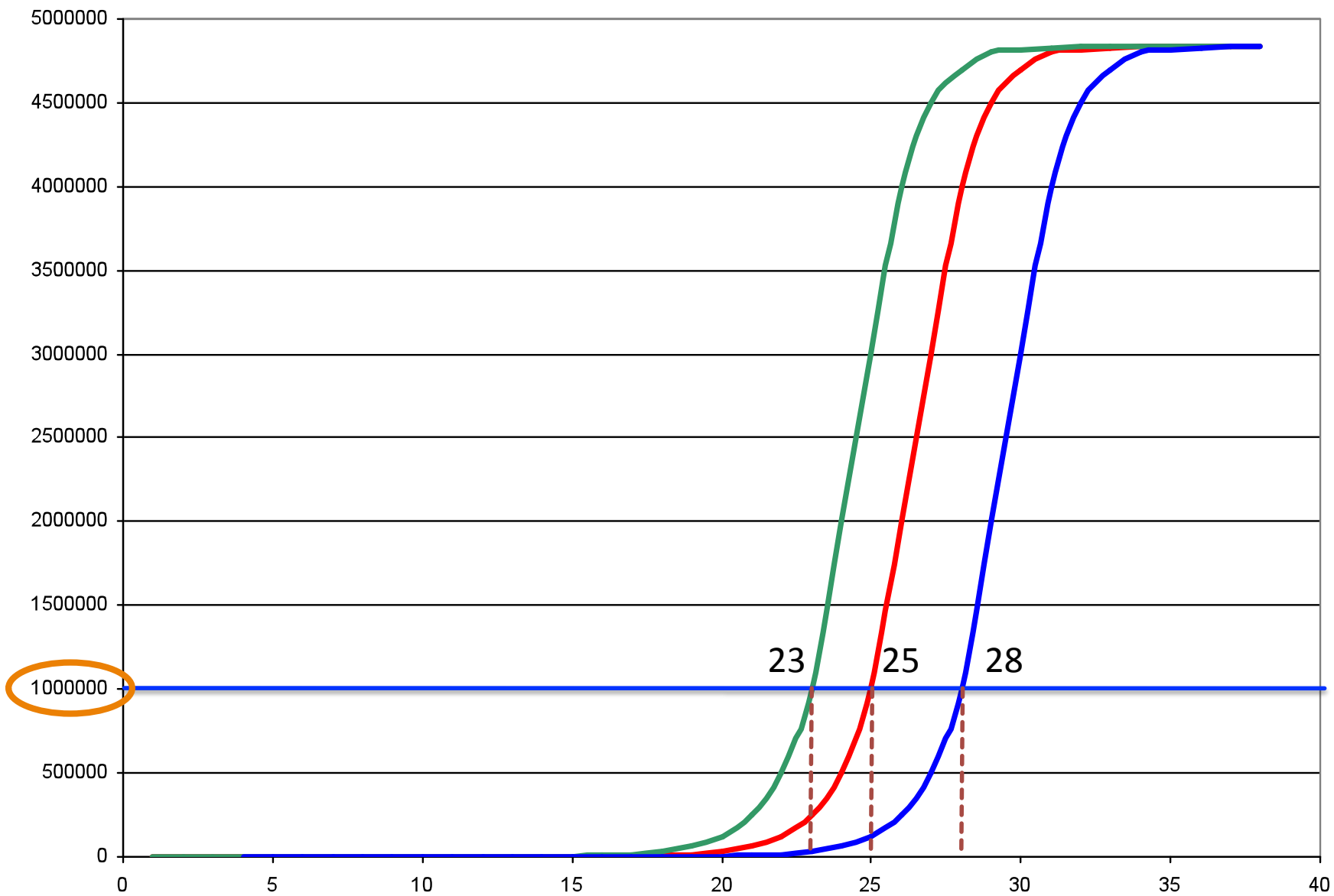
Οι καμπύλες των προϊόντων τέμνουν ένα (αυθαίρετο) κατώφλι.

Αυτό το κατώφλι είναι το  $C_T$

Οι τιμές  $C_T$  σχετίζονται άμεσα με την αρχική ποσότητα DNA:

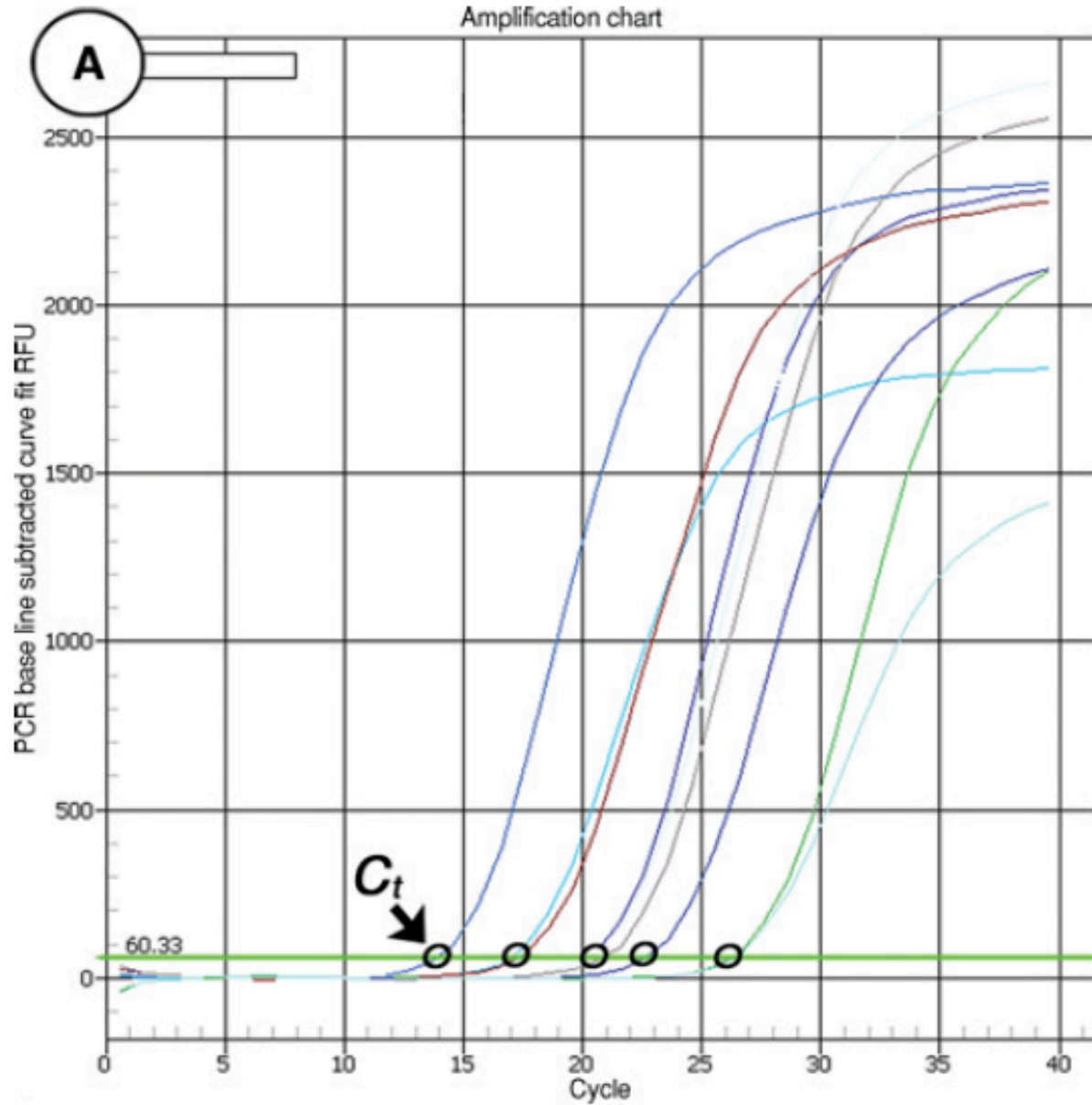
$$\text{Ποσότητα DNA} = 2^{C_T}$$





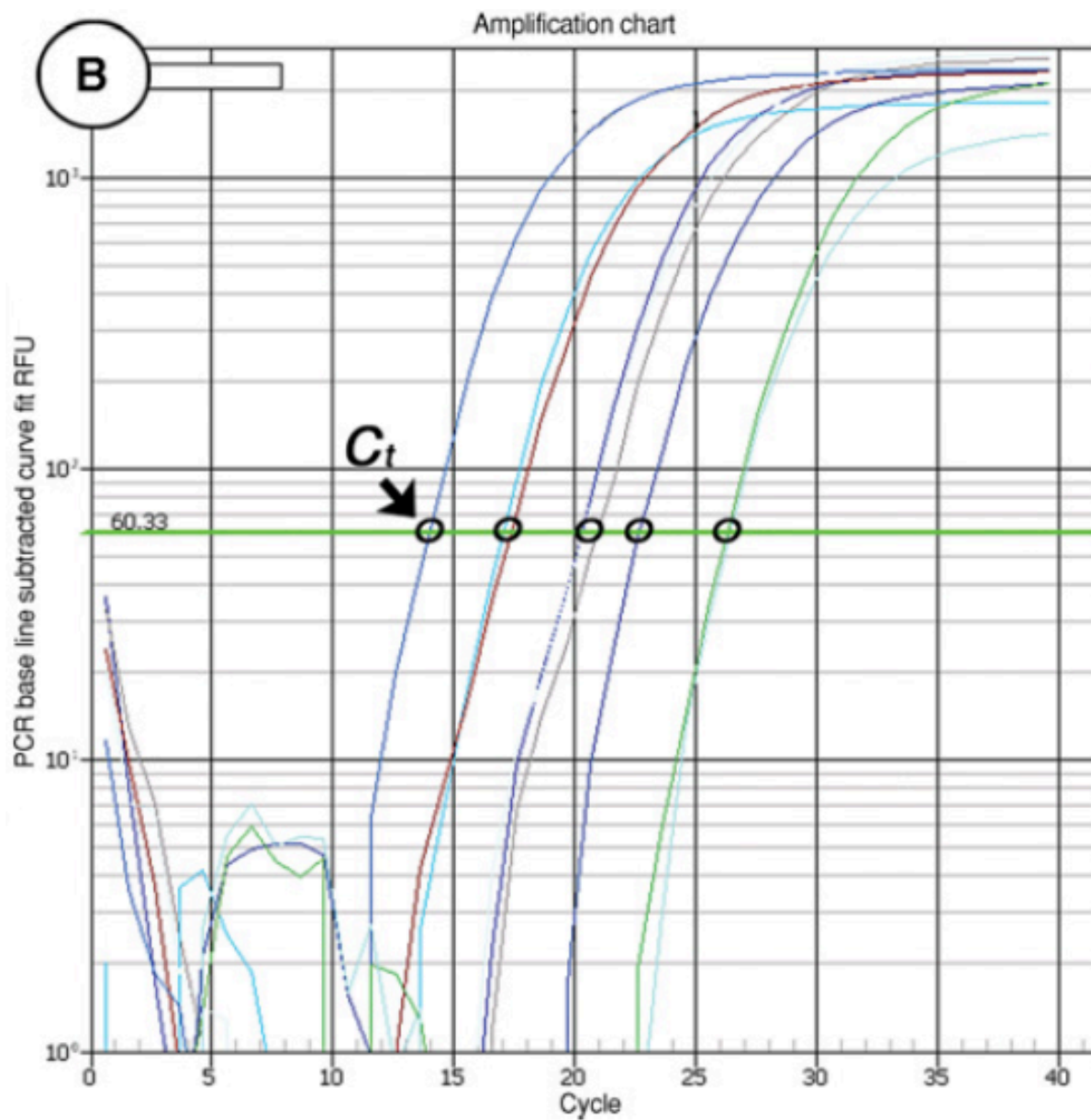
# $C_T$ Γραμμική απεικόνιση

Ποσότητα DNA



# $C_T$ Λογαριθμική απεικόνιση

Ποσότητα DNA





<https://www.youtube.com/watch?v=kvQWKcMdyS4>