

Basic Real-time PCR

ดร. อโณทัย โภคาธิกรณ์

PCR คืออะไร

Polymerase Chain Reaction

Polymerase คือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการต่อสาย DNA หรือ RNA จากสายที่มีอยู่แล้ว

Chain reaction คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่ นั่นคือต่อเนื่องกันไปเรื่อยๆ

PCR ก็คือปฏิกิริยาที่มีการสร้างสาย nucleotide ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ถือได้ว่าเป็นเทคนิค ที่มีผลกระทบอย่างมากต่องานทาง molecular ตั้งแต่ปี 1985 ที่ Kary Mullis คิดค้นขึ้นมา เพราะทำให้เราสามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้มหาศาลจากจำนวนเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยภายในเวลาไม่นาน ด้วยหลักการง่ายๆ

ส่วนประกอบของ PCR

1. template คือต้นฉบับของ DNA ที่เราต้องการจะเพิ่มจำนวน
2. primers คือสาย DNA ที่เป็น single strand ที่จับคู่ได้กับปลายของ template ทั้งสองด้าน โดยจะมีด้าน 3' เป็น hydroxyl group ที่จะสามารถต่อกับ nucleotides อื่นได้
3. polymerase คือเอนไซม์ที่จะใช้เพื่อการต่อสายของ DNA
4. nucleotides ทั้ง 4 ตัว (A-adenine, C-cytosine, G- guanine, T-thymine) ที่เอาไว้ต่อกันเป็น DNA สายใหม่
5. PCR machine คือเครื่องมือที่ใช้สำหรับปรับเปลี่ยนอุณหภูมิไปมา

ขั้นตอนพื้นฐานของ PCR

ปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่วนไปวนมา 30 ถึง 40 รอบ ในเครื่อง thermocycler คือ

Denaturation: ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นการทำลายพันธะระหว่าง nucleotides ทำให้สาย DNA ที่มีวนเกลียวอยู่เป็นคู่แยกออกจากกันเป็นเส้นตรง 2 เส้น และที่อุณหภูมินี้ปฏิกิริยาต่างๆจากเอนไซม์ในรอบก่อนหน้านั้นจะหยุดลงหมด

Annealing: ที่อุณหภูมิประมาณ 50°-60°C เพื่อให้ primer ไปเกาะติดกับ template เพื่อเตรียมตัวตั้งต้นต่อสายคู่ของ template

Extension: ที่อุณหภูมิ 72°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ polymerase ทำให้มีการนำ base ต่างๆมาต่อทางด้าน 3' ของ primer โดยต่อให้ complementary กับ sequence บน template ที่ primer มาเกาะไว้แล้วนั่นเอง

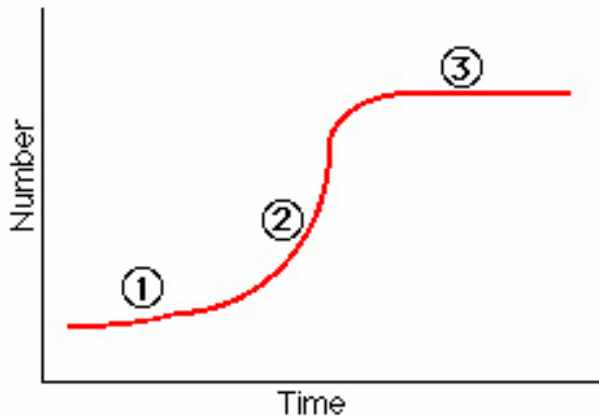
ทำให้เกิดการสร้าง DNA ต่อเนื่องได้มากเพราะเป็นการสร้างแบบเพิ่มจำนวนทวีคูณ คือถ้าเริ่มจาก DNA template สายคู่สายเดียว เมื่อถึงวงจรที่สอง จะมีจำนวน PCR product เพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ ซึ่งแต่ละคู่เมื่อผ่านขั้นตอนของ PCR ในรอบที่สามจะได้ PCR product ออกมาเป็น 2³ คู่ การเพิ่มจะเป็นแบบ exponential ได้ product ใน n cycle เป็น 2ⁿ คู่ นั่นคือในรอบที่ 30 จะมีจำนวน DNA เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนทั้งหมดถึง 2³⁰ = 1,073,741,764 คู่

ธรรมชาติของปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากคุณสมบัติของส่วนประกอบข้างต้น รวมทั้งสภาวะของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละการทดสอบทำให้ในความเป็นจริง ปฏิกิริยาของ PCR ที่เกิดขึ้นเมื่อนำปริมาณ product ที่เพิ่มขึ้นมา plot เทียบกับเวลาจะได้เป็นรูปตัว S แบบหัวทางตรงท่อนอย ดังรูปที่ 1 นั่นคือ ในช่วงแรก product จะเพิ่มจำนวนที่ละไม่มากนัก เรียกว่า lag phase (1) แต่เมื่อมีจำนวนมากขึ้นถึงระดับหนึ่ง จำนวน product จึงจะเพิ่มแบบทวีคูณ เรียกว่า exponential phase (2) จนกระทั่งไม่มี polymerase หรือ nucleotides เหลืออยู่ ทำให้ปริมาณคงที่เป็นระยะที่เรียกว่า plateau phase (3)

เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications
วันที่ 16 - 17 พฤศจิกายน 2549

ณ ห้องประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



รูปที่ 1 แสดงจำนวนของ product ที่เกิดจาก PCR เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไประยะเวลาหนึ่ง

Real-time PCR คืออะไร

แปลตรงตัวได้ความหมายที่สุดคือ PCR ในขณะที่กำลังเกิดขึ้นจริงๆ ทำให้สามารถติดตาม PCR ในช่วง exponential phase ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งนำไปสู่การวัดปริมาณได้ โดยมีสมการของ PCR ดังนี้

$$X_n = X_0(1 + E)^n$$

โดย X_n คือ ปริมาณ PCR product ที่ cycle ที่ n
 X_0 คือ ปริมาณเริ่มต้นของ template
 E คือ Amplification efficiency
 n คือ cycle number

สมการเหล่านี้ เราไม่ต้องจดจำเลย เพราะเครื่อง Real-time PCR ทุกชนิดมี software ที่รองรับการคำนวณปริมาณให้เราอยู่แล้ว เพียงแต่เราต้องเข้าใจธรรมชาติของปฏิกิริยา และวิธีการในการติดตามเก็บค่าต่างๆ ระหว่างที่ปฏิกิริยาดำเนินอยู่ รวมทั้งการแก้ไขปรับปรุงสภาวะเพื่อให้ปฏิกิริยามีประสิทธิภาพสูงสุดเท่าที่จะทำได้ จึงจะทำให้ผลที่ได้ถูกต้องแม่นยำ

ความแตกต่างระหว่าง Conventional กับ Real-time PCR

ใน PCR แบบธรรมดา (conventional PCR) เราจะไม่สามารถรู้ได้ว่าจะเกิดอะไรขึ้นระหว่างทาง เราต้องกะประมาณเอาว่าต้องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่รอบ จึงจะได้ product ที่เพียงพอต่อการตรวจวัด และต้องมีการ run gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบดูทั้งปริมาณและขนาดของ product เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ในขณะที่ในระบบ Real-time PCR เราสามารถติดตามดูปฏิกิริยาได้ทุกระยะระหว่างที่กำลังดำเนินอยู่ และสามารถกำหนดจุดที่จะเก็บข้อมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์ในภายหลังได้ นอกจากนี้เรามีวิธีพิสูจน์ตรวจสอบ product ได้โดยใช้วิธีดู melting curve หลังปฏิกิริยา โดยไม่ต้องนำมา run gel อีก

ข้อดีหลักของ Real-time PCR

- สามารถติดตามผลได้ในขณะที่เกิดขึ้นจริง
- ไม่ต้องมีขั้นตอนหลัง PCR (ได้ผลลัพธ์มากขึ้น ลดโอกาสการปนเปื้อน)
- การทำงานแต่ละรอบมักจะเร็วกว่าแบบธรรมดา
- วัดได้มากขึ้นจนถึง 10^{10} เท่า (wider dynamic range)

เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications
วันที่ 16 - 17 พฤศจิกายน 2549

ณ ห้องประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

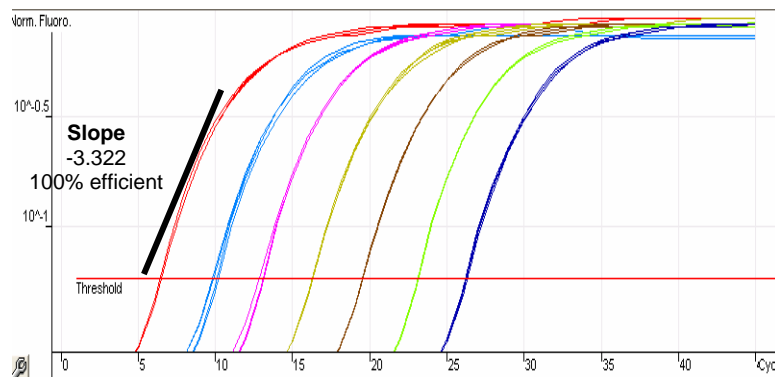
- สามารถตรวจวัดความแตกต่างได้ถึงขั้นที่ต่างกันเพียง 1 เท่า
- สามารถตรวจยืนยัน product ที่ได้โดยการวิเคราะห์ melting point
- มีความจำเพาะสูงที่สุด ไวที่สุดและ reproducible ที่สุด
- สำหรับงานทาง RNA จะใช้ปริมาณตั้งต้นของ RNA น้อยกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 1000 เท่า
- ค่าใช้จ่ายไม่ได้แพงกว่าการทำ PCR วิธีเดิม (ยกเว้นค่าเครื่องมือ)

ข้อดีของ Real-time PCR

- ยังไม่ ideal สำหรับ multiplexing
- การเริ่มต้นต้องการความชำนาญและการสนับสนุนดูแล (มากกว่าวิธีธรรมดาเล็กน้อย)
- เครื่องมือราคาสูง
- มี intra- และ inter- variation สูงเพราะวัดได้ละเอียด

สิ่งที่เกี่ยวข้องใน Real-time PCR

- PCR product ที่มีการ label ด้วยสารเรืองแสง (fluorophore)
- Primer และ probe ที่ออกแบบเพื่อให้ได้ปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพ (Efficiency) มากที่สุด
- เมื่อนำสัญญาณในช่วง exponential phase ของแต่ละ cycle มา plot ใน log scale ดังรูป 2 จะสามารถคำนวณ PCR efficiency ได้ $= [10^{(-1/\text{slope})}-1]$ สูตรเหล่านี้เพียงรู้ไว้เป็นพื้นฐาน ไม่ต้องจำเลย เพราะเครื่อง Real-time PCR แต่ละชนิดจะมี software จัดการให้เราหมด efficiency ของ PCR ควรมีค่าอยู่ที่ 90- 100% (ideal slope = -3.322 ซึ่งเป็น 100% efficiency คือการที่ได้จำนวนเพิ่มเป็น 2 copy ทุกรอบ ในขณะที่หาก slope = -3.462, efficiency จะเท่ากับ 1.95 นั่นคือได้ 1.95 copy/cycle) มี variable หลายตัวที่มีผลต่อ efficiency ของ PCR เช่น ความยาวของ amplicon, secondary structure และการออกแบบ primer



รูปที่ 2 แสดงสัญญาณ fluorescence จาก standard ใน real-time PCR เมื่อ plot ใน log scale ใน exponential phase ของปฏิกิริยา จะสามารถหา slope เพื่อตรวจดูประสิทธิภาพ (efficiency) ของ PCR ได้

Real-time PCR Chemistries

ส่วนประกอบแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆคือ

1. **Generic dye based:** ใช้สารสี (dye) ที่สามารถจับกับ DNA ทั่วๆไปได้ ที่นิยมใช้กันก็คือ SYBR Green I

เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง **Introduction to Real time-PCR and its applications**
วันที่ 16 - 17 พฤศจิกายน 2549

ณ ห้องประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. **Probes based:** ใช้ probe ซึ่งเป็นสาย DNA เส้นเดียวที่มี sequence ที่เรากำหนดแล้วติด (label) ด้วย fluorophore ลักษณะต่างๆกันไป มีการออกแบบ probe ลักษณะนี้ออกมามากมาย เพื่อเอื้อต่อการตรวจวัดโดยวิธี real-time PCR ยกตัวอย่างเช่น

- Taqman/Dual-labelled probes
- MGB Hybridisation probes
- Molecular Beacons
- AmpliFluor probes
- LUX (Light Upon eXtension) probes
- Yin-Yang (Displacement Hybridisation)
- Scorpions
- DNA Invader etc

สำหรับลักษณะของ Probes based นี้ น่าจะมีการปรับปรุงพัฒนาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆอย่างไม่หยุดยั้ง ดังนั้นการทำความเข้าใจกับตัวต้นแบบไว้บ้างจะช่วยให้ทำความเข้าใจกับตัวอื่นๆได้ง่ายขึ้น

สำหรับกลุ่มที่เป็นต้นแบบ 2-3 ชนิดแรกจะแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ

1. Hydrolysis probes (ตัวอย่างเช่น Taqman, Beacons, Scorpions)
2. Hybridization probes (ตัวอย่างเช่น Light Cycler)

1. **Hydrolysis probes:** probe ลักษณะนี้เป็น dual-labelled probe คือ มีทั้งตัวระงับสัญญาณ (quencher fluorophore) และ reporter fluorophore อยู่บน probe เส้นเดียวกัน ซึ่งขณะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง (intact) ตัว quencher จะดูดแสง fluorescence ของ reporter fluorophore ไว้ แต่เมื่อมีการ amplify target sequence เกิดขึ้น polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติของ 5'-exonuclease activity จะ hydrolyze probe ทำให้เกิดการแยกตัวของ reporter และ quencher fluorophore ดังนั้น fluorescence ของ reporter fluorophore จะถูกวัดได้ ในระหว่างแต่ละรอบของ PCR cycle แสง fluorescence จะเพิ่มขึ้นเพราะมีจำนวน reporter fluorophore ที่เป็นอิสระสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ

2. **Hybridization probes:** probe ลักษณะนี้ probe เส้นหนึ่งจะติดไว้ด้วย donor fluorophore ที่ 3' end และ probe อีกเส้นที่ติดกันจะมี acceptor fluorophore ติดอยู่ เมื่อทั้งสอง fluorophore อยู่ใกล้กัน (ภายใน 1-5 nucleotide) แสงที่เปล่งออกมาของ donor fluorophore จะไปกระตุ้น (excite) acceptor fluorophore ทำให้เกิดสัญญาณ fluorescence (FRET-fluorescent Resonance Energy Transfer) ที่สามารถวัดได้ ในช่วง annealing phase และช่วงแรกๆของ extension phase ของ PCR reaction ในแต่ละรอบของ PCR cycle จะมีการ anneal โดย hybridization probe เพิ่มมากขึ้น ทำให้สัญญาณ fluorescence เพิ่มขึ้น

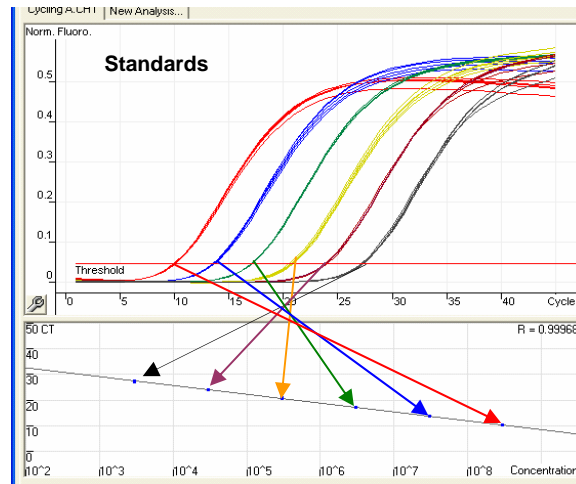
ลักษณะการใช้งาน Real-time PCR

แบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆคือ

การใช้งานในเชิงวิเคราะห์ปริมาณ (Quantification analysis) มีพื้นฐานที่การวัด fluorescence ของตัวเปล่งแสง (fluorophore) ในปฏิกิริยาในเชิงปริมาณ เราจะสามารถมองเห็นการเพิ่มของ product ได้ในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนในทุกๆรอบระหว่าง PCR (รูป S shape ของสัญญาณจะค่อยๆปรากฏเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบที่ทำ) และการวิเคราะห์การวัด fluorescence ในแต่ละรอบในช่วงเวลาหนึ่งๆทำได้โดยใช้คอมพิวเตอร์ทั้งหมด สัญญาณในช่วง exponential phase จะสัมพันธ์กับปริมาณตั้งต้นของ target template ดังตัวอย่างของ standard 5 ความเข้มข้นในรูปแบบที่ 3 ซึ่งเมื่อนำมา plot กราฟ จะได้เป็นเส้นตรงที่ทำให้เราสามารถเทียบค่าหาความเข้มข้นของ unknown ซึ่ง amplify โดยใช้สภาวะเดียวกันได้

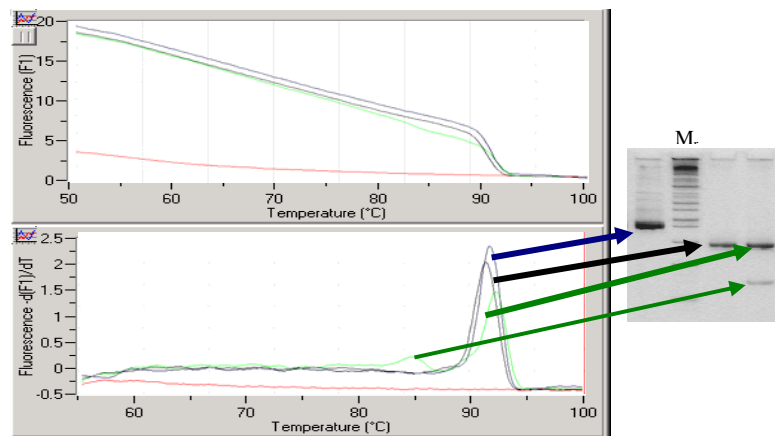
เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications
วันที่ 16 - 17 พฤศจิกายน 2549

ณ ห้องประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



รูปที่ 3 แสดงการวัดปริมาณ fluorescence จาก standard ใน real-time PCR และกราฟเส้นตรงที่ได้ ซึ่งแสดงจำนวนรอบและความเข้มข้นของ standard ณ ตำแหน่งใน exponential phase ของปฏิกิริยา

การวิเคราะห์ Melting curve analysis เป็นการใช้เพื่อวิเคราะห์ PCR product ที่เกิดขึ้น โดยมักจะทำทันทีหลังจากจบการ PCR โดย set ให้มีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 95°C และวัดสัญญาณ fluorescence ตลอดเวลา จะพบว่าสัญญาณจะค่อยๆ ลดลงดังแสดงในกรอบบนของรูปที่ 4 เนื่องจาก PCR product ที่เป็นสายคู่แยกตัวออกจากกัน ซึ่ง DNA จาก product แต่ละชนิด จะมี melting temperature เฉพาะตัว คือจุดที่คู่ base pair ของ nucleotide จะแยกออกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมด ทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณอย่างฉับพลัน จุดนั้น โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นกับความยาวและปริมาณ G และ C ที่มีใน DNA แต่ละชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้เพื่อแยก PCR product ออกจาก product ที่ปนเปื้อนได้ ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 4 เมื่อ software นำสัญญาณ fluorescence ที่วัดได้ของแต่ละอุณหภูมิมาเปลี่ยนให้เป็นกราฟระหว่าง dF/dT กับอุณหภูมิดังในกรอบล่างของรูป 4 จะได้เป็นรูป peak สำหรับ product แต่ละตัว PCR product ที่ถูกต้องมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง (โดยทั่วไปจะสูงกว่า 80°C) ในขณะที่ non-specific product หรือ primer-dimer จะให้ peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำกว่า ดังนั้น melting curve analysis ของ PCR product จึงมักใช้เพื่อยืนยันว่าเป็น product ที่ต้องการ ทำให้ไม่ต้องมีการ run gel electrophoresis หลังจากการ PCR



รูปที่ 4 แสดงการวัด fluorescence จาก PCR product เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ ในกรอบบน และเมื่อเปลี่ยน scale ให้เป็น dF/dT จะได้กราฟดังรูปในกรอบล่าง ซึ่งแสดงอุณหภูมิที่เป็น melting temperature ของ PCR product แต่ละตัว โดยเทียบกับขนาดเมื่อ run gel electrophoresis ตามที่ลูกศรชี้

ลักษณะของ quantification ใน real-time PCR

Absolute quantification: ใช้ known concentration template สร้าง standard curve เพื่อหาค่าของ unknown, standards ต้องมีการวัดปริมาณอย่างถูกต้องแม่นยำ ใช้ได้ดีกับการหา viral load

Relative quantification: มีได้หลายลักษณะ เช่นเทียบสัดส่วนความเปลี่ยนแปลงระหว่าง treated กับ control sample หรือสัดส่วนความเปลี่ยนแปลงระหว่าง calibrator กับ unknown แต่หลักก็คือจะได้ผลเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลง (fold change) ไม่ใช่ค่าความเข้มข้นที่แท้จริง

Comparative quantification (Normalization): เป็นการเทียบ target template กับ reference gene ในระบบนั้นๆ ซึ่งจะเรียกว่าเป็น **Endogenous/Internal control** โดยทั่วไปจะใช้ housekeeping gene ที่มีมากและสม่ำเสมอ แต่ควรทำการทดสอบ endogenous control ที่เลือกดูว่าเหมาะสมหรือไม่ก่อนหรืออาจใช้มากกว่า 1 ตัว

Multiplexing: คือการ amplify target มากกว่า 1 ชนิดใน reaction เดียวกัน ซึ่งสามารถทำได้ทั้งใน generic dye based และ probes based โดยในลักษณะแรก เช่นการใช้ SYBR green I จะใช้วิธีเลือก different melting points ของ target แต่ละตัว ส่วนใน probes based ก็ใช้ fluorophore ต่างๆกันสำหรับ target แต่ละตัว (FAM, TET, VIC and JOE) ซึ่งในปัจจุบันเว็บไซต์ต่างๆของผู้ผลิต Real-time chemistries มักจะมีรายละเอียดให้เลยว่าควรจะใช้ donor และ acceptor คู่ไหนสำหรับงานอะไร

วิธีการเลือกใช้เทคนิคใน real-time PCR

SYBR Green: มีข้อด้อยคือไม่ specific ต้องเสียเวลา optimize ,ต้องทำ melting point curve determination, amplicon ยาวทำให้ signal มากขึ้น ,อาจทำ multiplex ได้หากทำร่วมกับ melting point analysis

ไม่ควรเลือกใช้ SYBR Green กับ allelic discrimination assays, multiplex reaction (แต่ถ้าออกแบบดีก็อาจทำได้ แต่ไม่ง่าย), การ amplify rare transcripts, การตรวจหา pathogen ที่มีปริมาณน้อยๆ

Assay Development (การเริ่มพัฒนา assay)

- เลือก sequence
- เลือก primer และ probe
- เลือก quencher dye และ internal reference
- ตั้งค่าสำหรับ thermocycler

Assay Validation

- ทดสอบ primer pair ทุกคู่กับ probe ด้วย known template (plasmid clone, sDNA, RNA)
- ใช้ assay conditions มาตรฐาน คือ 300-400 nM primers, 100 nM probe, 3mM MgCl₂
- ใช้ dilution ต่างๆของ template (อาจเป็น sDNA, sRNA หรือ total RNA) ในการสร้าง standard curve
- Correlation coefficient ของ standard curve ควรจะมากกว่า 0.99
- ถ้า slope ของ standard curve ของ primer pair ที่ดีที่สุด คือประมาณ -3.5 ให้เพิ่ม MgCl₂ เป็น 5 mM
- ถ้า slope สูงกว่า -3.6 ให้เปลี่ยน primers (เพราะ efficiency จะน้อยกว่า 0.8957)
- Assay ที่ดีที่สุดจะต้องมี slope = -3.3 (efficiency = 1.0092)

Real-time PCR systems ที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน

ABI Prism 7900HT Sequence Detection System
BioRad iCycler

เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง **Introduction to Real time-PCR and its applications**
วันที่ 16 - 17 พฤศจิกายน 2549

ณ ห้องประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Corbett Research Rotor-Gene 3000
SmartCycler
MJ Research Chromo4
Idaho Technology Rapid Cycler
Roche LightTyper & LightCycler
Stratagene Mx3000P
Stratagene Mx4000 Multiplex Quantitative PCR System

Website ที่มีประโยชน์ต่อการ design assay

<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3> www.cgi

มีโปรแกรม **Primer 3** ซึ่งนำ sequence ที่เราต้องการหา primers และ probes มาแปลลงไป แล้วใส่ setting ต่างๆที่ต้องการได้ ทั้งแบบ SYBR and dual-labelled probes

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>

เป็นเว็บไซต์ที่มี **Oligonucleotide properties calculator** ใช้คำนวณคุณสมบัติของสาย nucleotides ที่ต้องการได้ ทั้งเป็น primer และ probe

<https://eclipse.epochbio.com/mainmenu.asp>

มีโปรแกรม **MGB Eclipse v3.0** ซึ่งใช้สำหรับ design Eclipse MGB probe and primer ต้องขอ user name, pass word

http://www.artus-biotech2.com/en/framesets/index_news.php

มีข้อมูลที่เป็นประโยชน์มากมายเกี่ยวกับ Real-time PCR

<http://www.meltcalc.de/>

มีโปรแกรมสำหรับ design hybridisation probe สนับสนุนโดย Corbett Research

www.premierbiosoft.com

เป็นที่รวมของโปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับ Real-time PCR (แต่ไม่ฟรี)

<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=11036>

มีข้อมูลความรู้เกี่ยวกับ Real-time มากมายเช่นกันค่ะ ของ Invitrogen

<http://tib-molbiol.gene-quantification.info/>

มีข้อมูลความรู้เกี่ยวกับ Real-time มากมายอีกที่ค่ะ ของ TIB MOLBIOL

http://www.appliedbiosystems.com/support/apptech/#rt_pcr

ข้อมูลเกี่ยวกับ Real-time PCR อีกเช่นกันของ Applied Biosystems

www.chemicon.com และ www.assayarchitect.com

มีข้อมูลเกี่ยวกับ Molecular Biology and Bioluminescence ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Real-time PCR รวมทั้งโปรแกรมออกแบบ probe ของ Millipore แต่ต้องขอ user name, pass word

Real-Time PCR Chemistry Suppliers (อาจจะมียากหรือน้อยกว่านี้ในบ้านเรา)

- Roche Diagnostics (Thailand) Ltd. www.roche-applied-science.com
- Amersham Biosciences www.amersham.com
- Applied Biosystems www.appliedbiosystems.com
- Chemicon www.chemicon.com
- Fisher Biotec www.fisherbiotec.com
- Qiagen www.qiagen.com

Publications เกี่ยวกับพื้นฐานของ Real-time PCR และ chemistries ที่ควรรู้อ่าน

"Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Biotechniques 22, 130-131 (1997)

"Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Anal Biochem 245, 154-160 (1997).

"Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification." Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Biotechniques 24, 954-958 (1998).

"The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control." Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. Biotechniques 22, 176-181 (1997).

"Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method." Chen X, Zehnbauser B, Gnirke A, Kwok PY. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 10756-10761 (1997).

"Detection of Energy Transfer and Fluorescence Quenching." Morrison LE. Nonisotopic DNA Probe Techniques, Kricka LR, Ed. pp. 311-352 (1992).

"Intracellular oligonucleotide hybridization detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET)." Sixou S, Szoka FC Jr, Green GA, Giusti B, Zon G, Chin DJ. Nucleic Acids Res 22, 662-668 (1994).

"Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence." Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Nat Biotechnol 17, 804-807 (1999).

"A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer." Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. Nucleic Acids Res 25, 2516-2521 (1997).

"Real time quantitative PCR." Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Genome Res 6, 986-994 (1996)

Applications of Real-Time PCR

SNP genotyping – Allelic Discrimination

"Use of real-time RT-PCR for the detection of allelic expression of an imprinted gene." Suda T, Katoh M, Hiratsuka M, Fujiwara M, Irizawa Y, Oshimura M. Int J Mol Med 12(2):243-6 (2003).

"Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers." Latorra D, Campbell K, Wolter A, Hurley JM. Hum Mutat 22(1):79-85 (2003).

"Rapid allelic discrimination from real-time DNA amplification." Sevall JS. Methods 25(4):452-5 (2001).

"High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers." Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, Hamer DH. Genome Res 11, 163-169 (2001).

"Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection."
Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. Nucleic Acids Res 28, 3752-3761 (2000).

"Seven-color, homogeneous detection of six PCR products." Lee LG, Livak KJ, Mullah B, Graham RJ, Vinayak RS, Woudenberg TM. Biotechniques 27, 342-349 (1999).

Mutation Detection

"Rapid single-tube screening of the C282Y hemochromatosis mutation by real-time multiplex allele-specific PCR without fluorescent probes." Donohoe GG, Laaksonen M, Pulkki K, Ronnema T, Kairisto V. Clin Chem 46, 1540-1547 (2000).

"Rapid detection of CYP2C9*3 alleles by real-time fluorescence PCR based on SYBR Green." Hiratsuka M, Agatsuma Y, Mizugaki M. Mol Genet Metab 68, 357-362 (1999).

"Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutation by real-time fluorescence polymerase chain reaction and peptide nucleic acid clamping."
Kyger EM, Krevolin MD, Powell MJ. Anal Biochem 260, 142-148 (1998).

Microdeletion genotypes

"Quantitative real-time PCR for gene dosage determinations in microdeletion genotypes." Covault J, Abreu C, Kranzler H, Oncken C. Biotechniques. 35(3):594-6, 598 (2003).

Haplotyping

"Mitochondrial DNA haplotyping revealed the presence of mixed up benign and neoplastic tissue sections from two individuals on the same prostatic biopsy slide." Alonso A, Alves C, Suarez-Mier MP, Albarran C, Pereira L, Fernandez de Simon L, Martin P, Garcia O, Gusmao L, Sancho M, Amorim A. J Clin Pathol 58(1):83-6 (2005).

"Rapid, long-range molecular haplotyping of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) *3A, *3B, and *3C." von Ahsen N, Armstrong VW, Oellerich M. Clin Chem 50(9):1528-34 (2004).

Quantitative microsatellite analysis

"Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma."
Ogino S, Odze RD, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. Am J Surg Pathol 30(9):1175-83 (2006).

"A SYBR green-based real-time PCR method for detection of haemopoietic chimerism in allogeneic haemopoietic stem cell transplant recipients." Bai L, Deng YM, Dodds AJ, Milliken S, Moore J, Ma DD. Eur J Haematol 77(5):425-31 (2006).

"Quantitative microsatellite analysis to delineate the commonly deleted region 1p22.3 in mantle cell lymphomas." Balakrishnan A, von Neuhoff N, Rudolph C, Kamphues K, Schraders M, Groenen P, van Krieken JH, Callet-Bauchu E, Schlegelberger B, Steinemann D. Genes Chromosomes Cancer 45(10):883-92 (2006).

Reverse-transcription PCR.

"Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods." Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. *Anal Biochem* 285, 194-204 (2000).

"Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR." Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. *Mol Vis* 6, 178-183 (2000).

"Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain." Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R. *PCR Methods Appl* 4, 234-238 (1995)

Determination of identity at highly polymorphic HLA loci

"Loss of heterozygosity, a frequent but a non-exclusive mechanism responsible for HLA dysregulation in non-Hodgkin's lymphomas." Drenou B, Tilanus M, Semana G, Alizadeh M, Birebent B, Grosset JM, Dias P, van Wichen D, Arts Y, De Santis D, Fauchet R, Amiot L. *Br J Haematol* 127 (1):40-9 (2004).

"Association of maternal histocompatibility at class II HLA loci with maternal microchimerism in the fetus." Berry SM, Hassan SS, Russell E, Kukuruga D, Land S, Kaplan J. *Pediatr Res* 56(1):73-8 (2004).

Microarray validation

"Gene expression profiling of clinical stages II and III breast cancer." Folgueira MAAK, Brentani H, Katayama MLH et al. *Braz J Med Biol Res.* [online], vol. 39, no. 8 [cited 2006-11-08], pp. 1101-1113 (2006).

Viral load

"Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR." Watzinger F, Ebner K, and Lion T. *Molecular Aspects of Medicine* 27(2-3): 254-298 (2006).

"Molecular and diagnostic clinical virology in real time." Niesters HG. *Clin Microbiol Infect* 10(1):5-11 (2004).

"Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay." Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Valdes A, Galimany R, Esteban R, Guardia J. *J Viral Hepat* 8(6):465-71 (2001).

"Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using fluorescent hybridization probes." Ho SK, Yam WC, Leung ET, Wong LP, Leung JK, Lai KN, Chan TM. *J Med Microbiol* 52(Pt 5): 397-402 (2003).

Mitochondrial DNA studies

"Real-time PCR analysis of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion in nonmelanoma skin cancer and its use as a quantitative marker for sunlight exposure in human skin." Harbottle A, Birch-Machin MA. *Br J Cancer* 19;94(12):1887-93 (2006).

"Real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA point mutation." Wong LJ, Bai RK. *Methods Mol Biol* 335:187-200 (2006).

"Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer." Tan DJ, Chang J, Liu LL, Bai RK, Wang YF, Yeh KT, Wong LJ. BMC Cancer Apr 18;6:93 (2006).

Methylation detection

"Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer." Hu S, Ewertz M, Tufano RP, Brait M, Carvalho AL, Liu D, Tufaro AP, Basaria S, Cooper DS, Sidransky D, Ladenson PW, Xing M. J Clin Endocrinol Metab 91(1):98-104 (2006).

"Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects." Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, Henrique R, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Westra WH, Sidransky D. J Clin Oncol 20;23(27):6569-75 (2005).

"Quantitative detection of methylated SOCS-1 , a tumor suppressor gene, by a modified protocol of quantitative real time methylation-specific PCR using SYBR green and its use in early gastric cancer detection." Chan MW, Chu ES, To KF, Leung WK. Biotechnol Lett 26 (16):1289-93 (2004).

DNA damage (microsatellite instability) measurement

"Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase gene, the expression of thymidylate synthase mRNA and the microsatellite instability phenotype of colorectal cancer." Merkelbach-Bruse S, Hans V, Mathiak M, Sanguedolce R, Alessandro R, Ruschoff J, Buttner R, Houshdaran F, Gullotti L. Oncol Rep 11(4):839-43 (2004).

"Detection of microsatellite instability by real time PCR and hybridization probe melting point analysis." Dietmaier W, Hofstadter F. Lab Invest 81(10):1453-6 (2001).

Radiation exposure assessment

"Effects of low-dose ionizing radiation on gene expression in human skin biopsies." Goldberg Z, Schwiertert CW, Lehnert B, Stern R, Nami I. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1;58(2):567-74 (2004).

Prenatal diagnosis from fetal cells in maternal blood

"Recovery and amplification of placental RNA from dried maternal blood spots: utility for non-invasive prenatal diagnosis." Jorgez CJ, Simpson JL, Bischoff FZ. Reprod Biomed Online 13(4):558-61 (2006).

"Use of real-time polymerase chain reaction for the detection of fetal aneuploidies." Zimmermann B, Levett L, Holzgreve W, Hahn S. Methods Mol Biol 336:83-100 (2006).

"Quantitative analysis of intact fetal cells in maternal plasma by real-time PCR." Zhong XY, Hahn S, Steinborn A, Holzgreve W. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol Aug 30 (2006)

Chromosomal translocations in human disease genes,

"Rapid simultaneous amplification and detection of the MBR/JH chromosomal translocation by fluorescence melting curve analysis." Bohling SD, King TC, Wittwer CT, Elenitoba-Johnson KS. Am J Pathol 154, 97-103 (1999).

"Fluorescence melting curve analysis for the detection of the bcl-1/JH translocation in mantle cell lymphoma." Bohling SD, Wittwer CT, King TC, Elenitoba-Johnson KS. Lab Invest 79, 337-345 (1999).

"Long Range Polymerase Chain Reaction-Based Diagnosis of Friedreich Ataxia in the Clinical Molecular Diagnostics Laboratory." Wick MJ, Matthias-Hagen VL, Day JW, Gomez CM, Glennen RC. Mol Diagn 3, 3-9 (1998).

Detection of inactivation at X-chromosome

"Differences in the pattern of X-linked gene expression between fetal bovine muscle and fibroblast cultures derived from the same muscle biopsies." Nino-Soto MI, Nuber UA, Basrur PK, Ropers HH, King WA. Cytogenet Genome Res.111 (1):57-64 (2005).

Trisomies and single-gene copy numbers

"Rapid determination of trisomy 21 from amniotic fluid cells using single-nucleotide polymorphic loci." Nagy B, Ban Z, Lazar L, Nagy RG, Papp C, Toth-Pal E, Papp Z. Prenat Diagn 25(12):1138-41 (2005).

Intraoperative cancer diagnostics

"The diagnostic accuracy of reverse transcription-PCR quantification of cytokeratin mRNA in the detection of sentinel lymph node invasion in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison with immunohistochemistry." Garrel R, Dromard M, Costes V, Barbotte E, Comte F, Gardiner Q, Cartier C, Makeieff M, Crampette L, Guerrier B, Boule N. Clin Cancer Res 15;12(8):2498-505 (2006).

"Temperature-controlled primer limit for multiplexing of rapid, quantitative reverse transcription-PCR assays: application to intraoperative cancer diagnostics." Raja S, El-Hefnawy T, Kelly LA, Chestney ML, Luketich JD, Godfrey TE. Clin Chem 48(8):1329-37 (2002).

"Real-time rapid reverse transcriptase-polymerase chain reaction for intraoperative diagnosis of lymph node micrometastasis: clinical application for cervical lymph node dissection in esophageal cancers." Yoshioka S, Fujiwara Y, Sugita Y, Okada Y, Yano M, Tamura S, Yasuda T, Takiguchi S, Shiozaki H, Monden M. Surgery 132(1):34-40 (2002).

Monitoring post transplant solid organ graft outcome

"Two years' experience of acute rejection monitoring of intestinal transplant recipients by real-time PCR assessment of granzyme B and perforin up-regulation: considerations on diagnostic accuracy." Corti B, Altamari A, Gabusi E,

Pinna AD, Gruppioni E, Lauro A, Pirini MG, Fiorentino M, Ridolfi L, Grigioni WF, Grigioni AD. Transplant Proc 38(6):1726-7 (2006).

"Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences." Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Am J Hematol 81(10):735-46 (2006).

Drug therapy efficacy/drug monitoring

"Similar reduction of cytomegalovirus DNA load by oral valganciclovir and intravenous ganciclovir on pre-emptive therapy after renal and renal-pancreas transplantation." Kalpoe JS, Schippers EF, Eling Y, Sijpkens YW, de Fijter JW, Kroes AC. Antivir Ther 10(1):119-23 (2005).

"Effects of early corticosteroid treatment on plasma SARS-associated Coronavirus RNA concentrations in adult patients." Lee N, Allen Chan KC, Hui DS, Ng EK, Wu A, Chiu RW, Wong VW, Chan PK, Wong KT, Wong E, Cockram CS, Tam JS, Sung JJ, Lo YM. J Clin Virol 31(4):304-9 (2004).

Pathogen Detection

herpes simplex virus

"Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR." Espy MJ, Uhl JR, Mitchell PS, Thorvilson JN, Svien KA, Wold AD, Smith TF. J Clin Microbiol 38, 795-799 (2000).

Borrelia

"Rapid differentiation of Borrelia garinii from Borrelia afzelii and Borrelia burgdorferi sensu stricto by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the recA gene." Pietila J, He Q, Oksi J, Viljanen MK. J Clin Microbiol 38, 2756-2759 (2000).

"Rapid and sensitive quantification of Borrelia burgdorferi-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR." Morrison TB, Ma Y, Weis JH, Weis JJ. J Clin Microbiol 37, 987-992 (1999).

Leptospira biflexa

"Identification of Leptospira biflexa by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product." Woo TH, Patel BK, Cinco M, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF, Piispanen J. J Microbiol Methods 35, 23-30 (1999).

Leptonema illin

"Real-time homogeneous assay of rapid cycle polymerase chain reaction product for identification of Leptonema illini." Woo TH, Patel BK, Cinco M, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF. Anal Biochem 259, 112-117 (1998).

Leptospira inadai

"Identification of Leptospira inadai by continuous monitoring of fluorescence during rapid cycle PCR." Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Weyant RS, Dohnt MF. Syst Appl Microbiol 21, 89-96 (1998).

Mosquito

"Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant Culex mosquitoes." Paton MG, Karunaratne SH, Giakoumaki E, Roberts N, Hemingway J. Biochem J 346 Pt 1, 17-24 (2000)

Fungus

"Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system." Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H. J Clin Microbiol 38, 586-590 (2000).

"Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DNA in artificially contaminated milk." O'Mahony J, Hill C. Appl Environ Microbiol 70(8):4561-8 (2004).

Contaminant Detection (Mycoplasma, etc.)

"Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction." Ishikawa Y, Kozakai T, Morita H, Saida K, Oka S, Masuo Y. In Vitro Cell Dev Biol Anim 42(3-4):63-9 (2006).

"Sensitive, real-time PCR detects low-levels of contamination by Legionella pneumophila in commercial reagents" Shen H, Rogelj S, Kieft TL. Mol Cell Probes 20(3-4):147-53 (2006).

GMO Detection

"A new PCR-CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events." Nadal A, Coll A, La Paz JL, Esteve T, Pla M. Electrophoresis 27(19):3879-88 (2006).

"Critical points of DNA quantification by real-time PCR--effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms." Cankar K, Stebih D, Dreo T, Zel J, Gruden K. BMC Biotechnol 14;6:37 (2006).

"Quantification of genetically modified soybeans using a combination of a capillary-type real-time PCR system and a plasmid reference standard." Toyota A, Akiyama H, Sugimura M, Watanabe T, Kikuchi H, Kanamori H, Hino A, Esaka M, Maitani T. Biosci Biotechnol Biochem 70(4):821-7 (2006).

"Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection." Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D, Esteve T, Prat S, Pla M. Anal Biochem 15;323(2):164-70 (2003).

เอกสารประกอบประชุมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง **Introduction to Real time-PCR and its applications**
วันที่ **16 - 17 พฤศจิกายน 2549**
ณ ห้องประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

“Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food.” Brodmann PD, Ilg EC, Berthoud H, Herrmann A. J AOAC Int 85(3):646-53 (2002).

“Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food.” Hubner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P. J AOAC Int 84(6):1855-64 (2001).