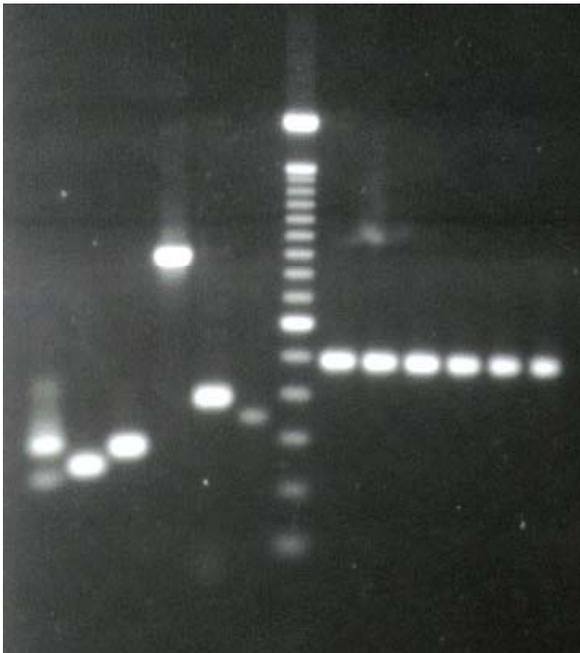


PCR convencional o PCR de punto final
versus
PCR en Tiempo Real

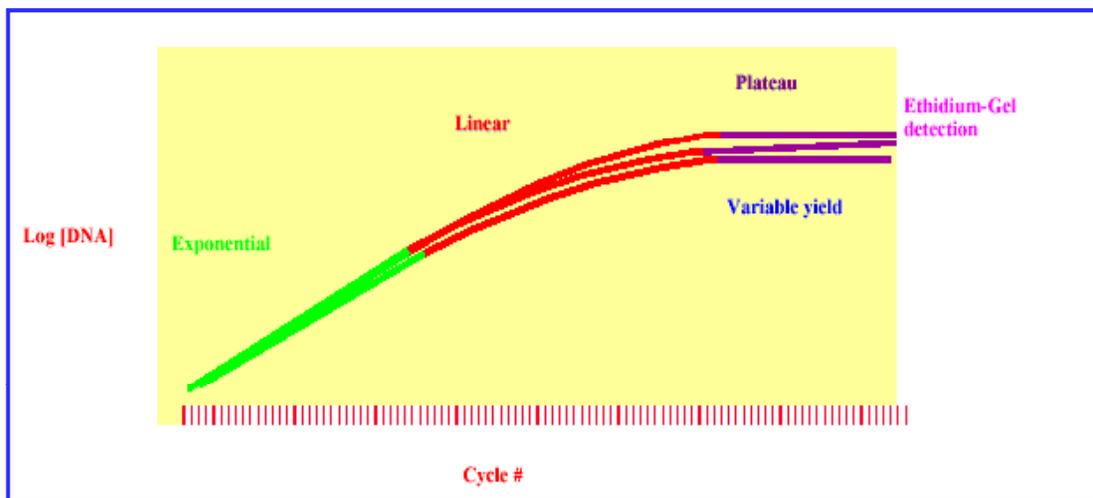
PCR convencional no es cuantitativo

PCR clásico



- La cantidad de producto no está relacionada con la cantidad de DNA inicial
- Herramienta cualitativa (presencia o ausencia)
- El bromuro de etidio es poco sensible, cuando se detecta ya se ha sobrepasado la fase exponencial

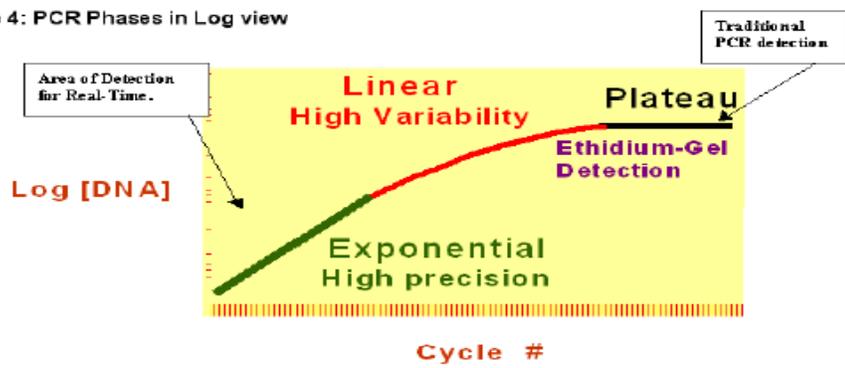
Fases de la PCR



- Exponencial: En cada ciclo se dobla el producto.
- Lineal: enlentecimiento, consumo de componentes, principio de degradación.
- Meseta: Parada de la reacción, agotamiento de componentes, degradación de productos.

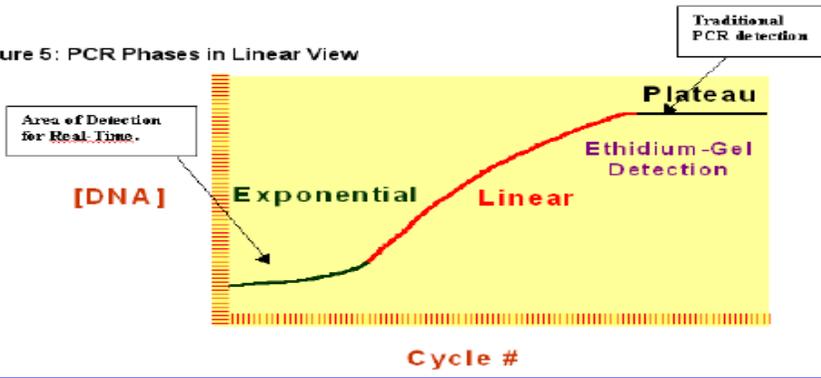
Fases de la PCR

Figure 4: PCR Phases in Log view



Logarítmica

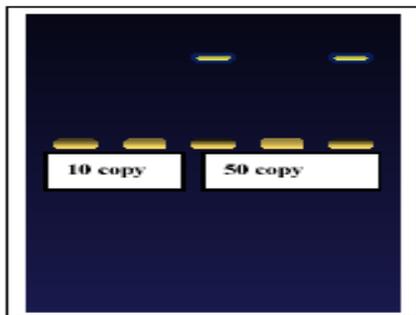
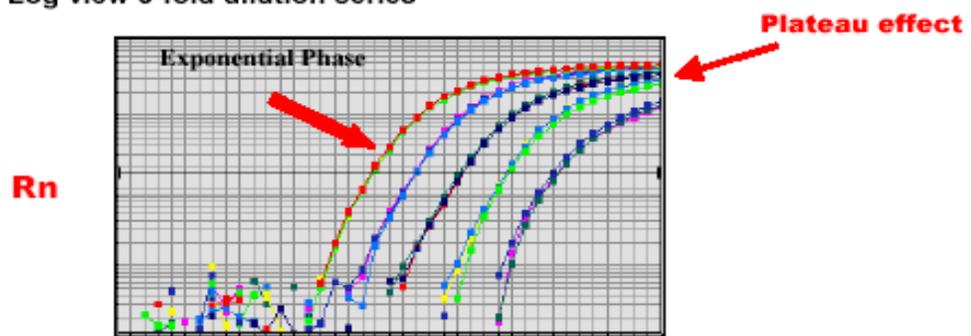
Figure 5: PCR Phases in Linear View



Lineal

Detección en la fase de meseta

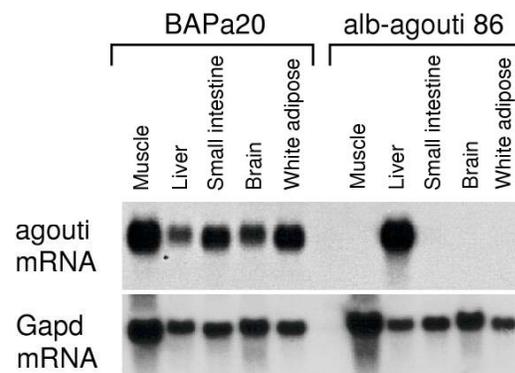
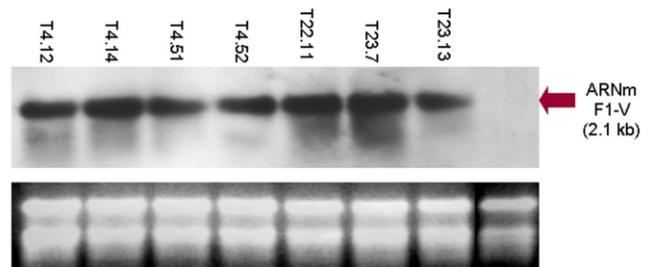
Figure 8: Log view 5-fold dilution series



Problemas de cuantificación en la fase de meseta

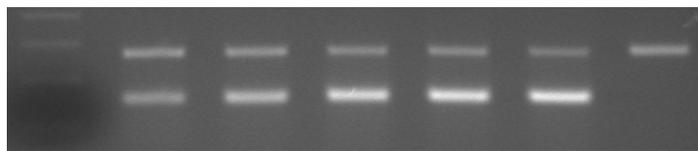
Técnicas de cuantificación

- Northern Blot

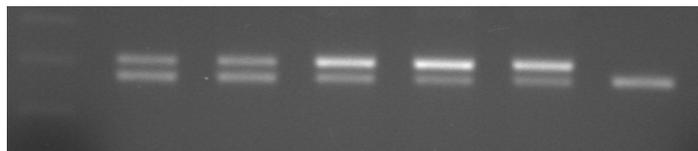


PCR Competitivo o PCR “Mimic”

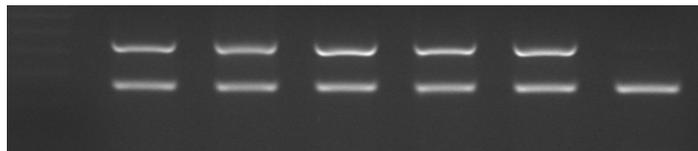
Early expression of p53 responsive genes (24h)



Bax



CD95/Fas



GAPDH

L C 6 8 10 12 M

Necesidad de PCR en tiempo real

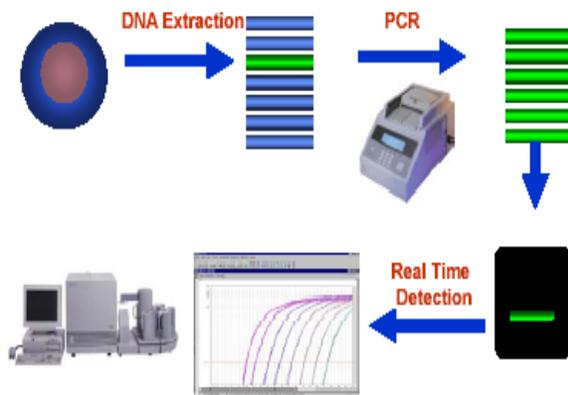
- Necesidad de cuantificar diferencias de expresión de un mRNA (RT-PCR)
- Disponibilidad de muy pequeñas cantidades de mRNA en algunas prácticas laboratoriales:
 - Células obtenidas de microdissección por láser
 - Pequeñas cantidades de tejido
 - Biopsias embrionarias
 - Especímenes de gran valor

PCR en Tiempo Real

Nuevos químicos

Nuevas plataformas instrumentales

Detección de productos PCR en tiempo real

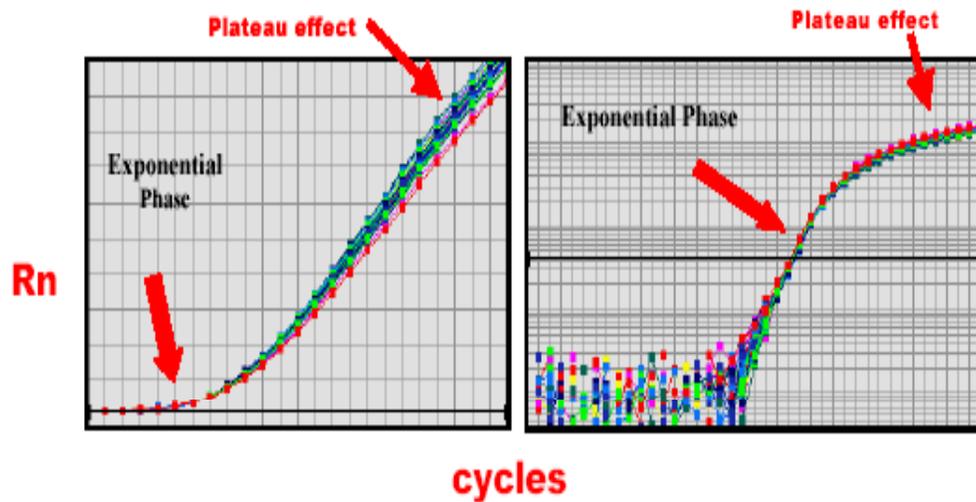


Permite observar la cinética de la reacción

Detección en la fase exponencial

Figure 6: Linear view 96 replicates

Figure 7: Log view 96 replicates



PCR en Tiempo Real

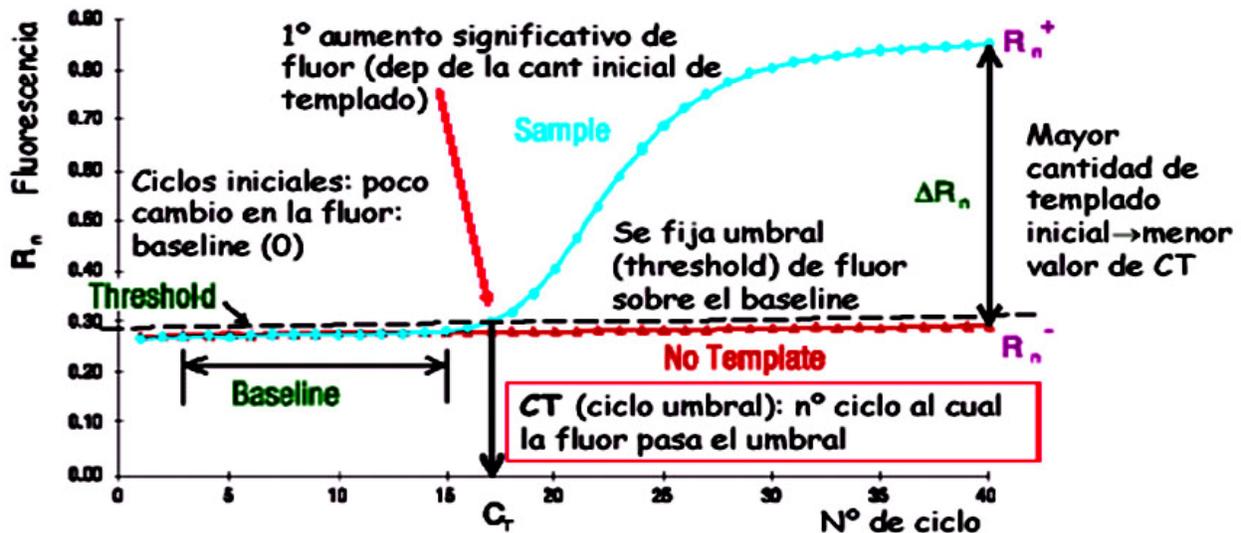
- Toma los datos mientras se producen.
- Cuantificación más exacta sin necesidad de métodos laboriosos.
- Existe una relación cuantitativa entre la cantidad inicial y la cantidad de producto PCR en un ciclo dado.

Polymerase chain reaction (PCR)

Real Time-PCR

Cuantifica la cantidad inicial de templado. Monitorea la fluor emitida durante la reacción como un indicador de la generación del producto de PCR durante cada ciclo de PCR.

Se basa en la detección y cuantificación de las sondas fluorescentes. Esta señal aumenta en proporción directa al aumento del prod. de PCR.



Polymerase chain reaction (PCR)

Real Time-PCR

Cuantificar RNA (previa RT-PCR) o DNA - Mide el aumento del DNA a medida que se amplifica (en tiempo real).

Detección y cuantificación de una sonda fluorescente que se une al DNA. Esta señal aumenta en proporción directa al aumento del producto de PCR.

Termociclador: lector de fluorescencia. Miden la fluorescencia emitida a cada momento en cada tubo.

Polymerase chain reaction (PCR)

Real Time-PCR

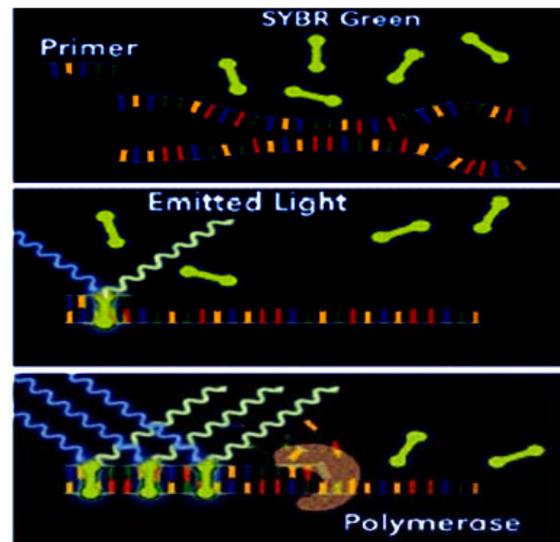
Sistemas de detección por fluorescencia:

*agentes intercalantes

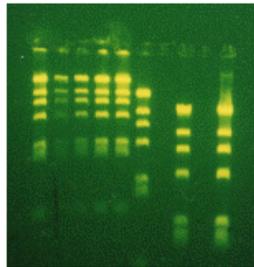
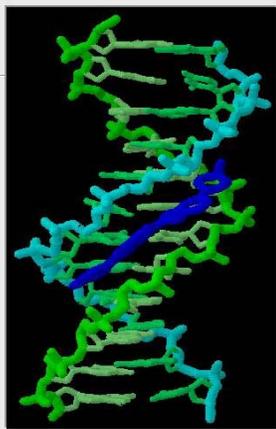
*sondas específicas marcadas con fluorocromos

Agentes intercalantes:

Fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble hélice. El más empleado es el SYBR Green I

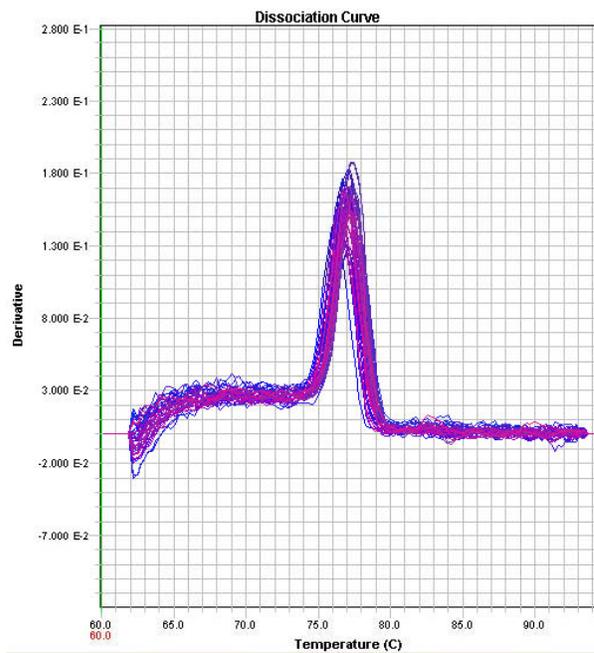


Fluorocromos: SYBR Green

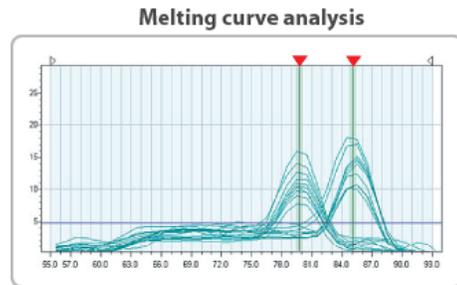


- Se intercala en el surco menor del ADN de doble cadena y emite fluorescencia.
- No es equimolecular.
- Necesaria curva de disociación.

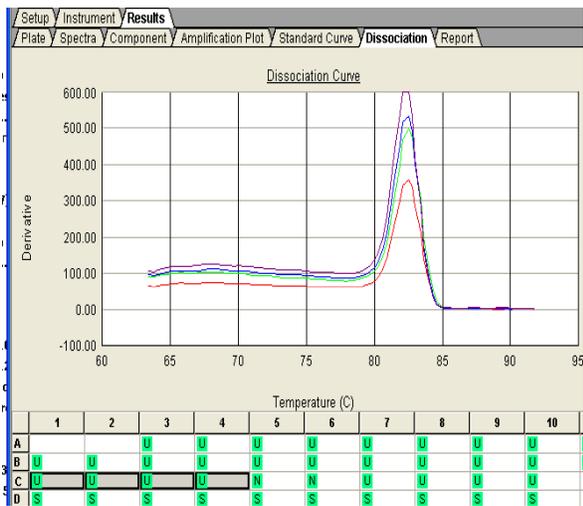
Curva de disociación



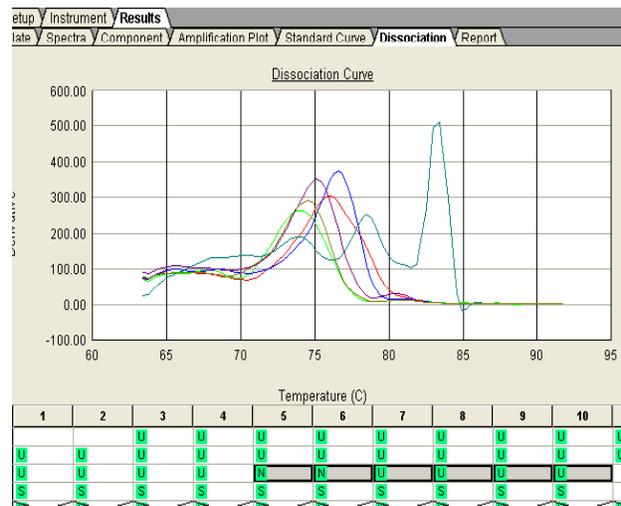
Detector: SYBRGreen Plot: Derivative Step: Stage 3, step 3



Curva de disociación



Muestras problema



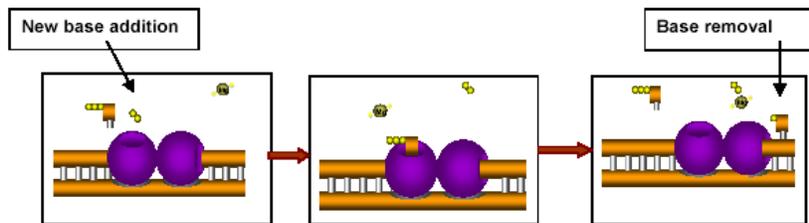
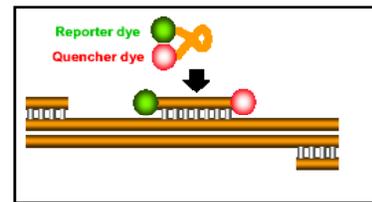
Controles negativos y sin RT

Ventajas e inconvenientes

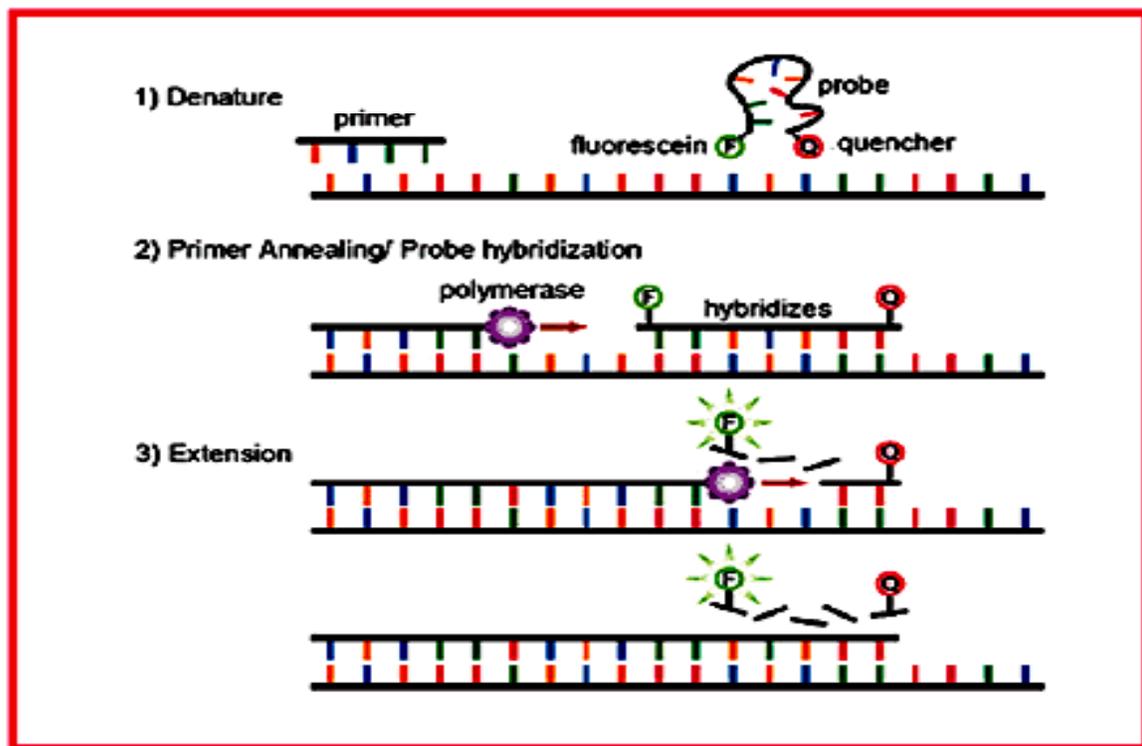
- PCR con SYBR Green:
 - Más barato
 - Los mismos reactivos sirven para analizar cualquier fragmento
 - La especificidad viene dada únicamente por los primers
 - No es equimolecular
 - Se necesita realizar una curva de disociación

Sondas TaqMan

- Actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa.
- Reporter: FAM, VIC.
- Quencher: TAMRA.
- Importante $t^a m$ ($\sim 70^{\circ}C$).
- Equimolecular.



Real Time PCR: Sonda TaqMan



TaqMan® Probe Method

Polymerase chain reaction (PCR)

Real Time-PCR

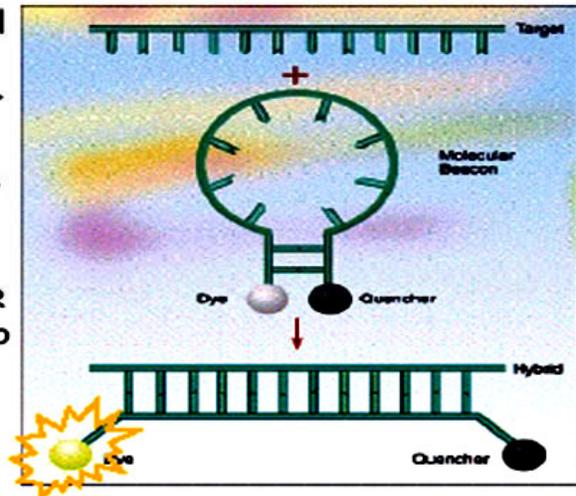
***Molecular beacons:** Los extremos de la sonda: complementarios y marcados con el par fluoróforo/quencher.

En ausencia de una seq complementaria → loop (quenching de fluorescencia).

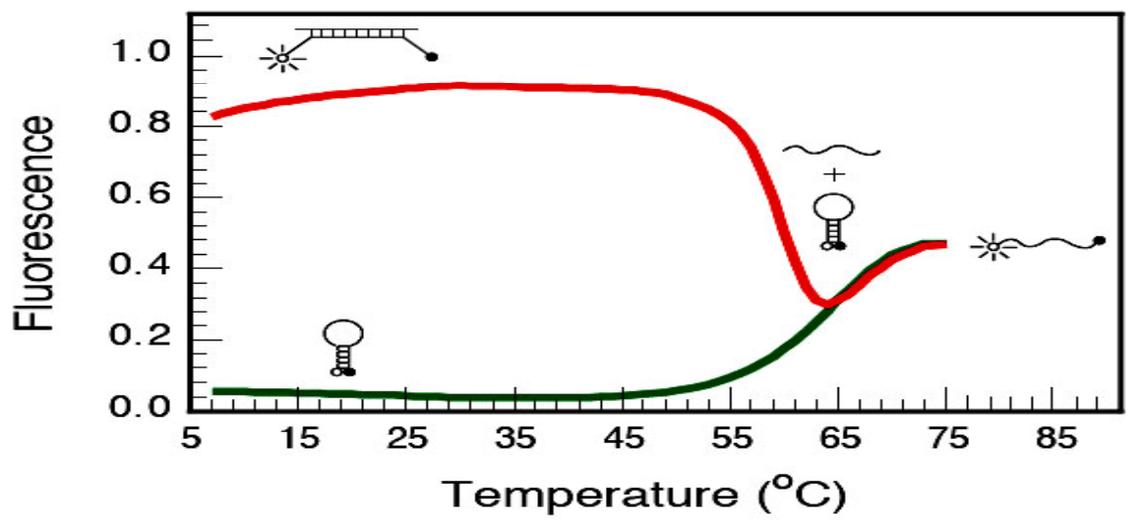
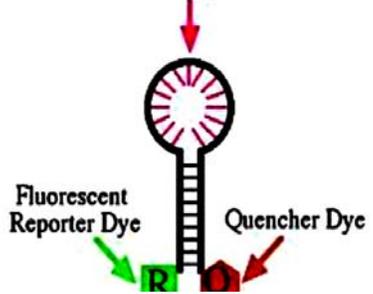
PCR: durante el annealing → unión al DNA target: aumenta la distancia entre el fluoróforo y el quencher → ↑ fluorescencia.

Cuando la t° aumenta en la etapa de extensión, los MB se disocian y no interfieren con la Taq.

Permanecen intactos durante la PCR y se une una y otra vez en cada ciclo para emitir la fluorescencia → proporcional a la cantidad de producto de PCR.



PCR Product-Specific Nucleotides



Ventajas e inconvenientes

- PCR con Sondas TaqMan:
 - Más caro
 - Utilización de sondas específicas para cada fragmento a analizar
 - La especificidad viene dada por los primers y la sonda
 - Es equimolecular
 - No necesita curva de disociación

Aplicaciones de la PCR-TR

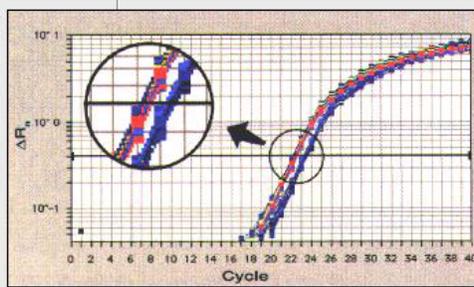
- Cuantificación:
 - Absoluta
 - Relativa
- Determinación de mutaciones.
- Ensayos +- Diagnóstico

Glosario de términos

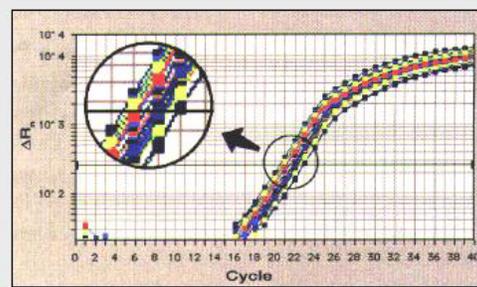
- Cuantificación:
 - Absoluta:
 - Resultado final con unidades (carga viral, copias de mensajero, copias de un gen,...).
 - Se necesita una curva patrón absoluta.
 - Relativa:
 - Resultado sin unidades. Proporciona un porcentaje de incremento o disminución (expresión génica).
 - Se necesita curva patrón (*al menos para prueba de primers*).

Glosario de términos

- Referencia:
 - Señal utilizada para normalizar el experimento.
 - Pasiva: Fluorocromo en todos los tubos (ROX).
 - Activa: endógena (housekeeping) o exógena (construcción).
- Calibrador:
 - Muestra que usamos para comparar las demás.



Internal reference



No internal reference

Glosario de términos

- **Standard (patrón):**
 - Muestra de concentración conocida que nos permite construir la curva de calibrado.
- **Threshold (umbral):**
 - C_t es el ciclo en el cual se detecta un incremento significativo de ΔR_n (fluorescencia). El sistema empieza a detectar la señal asociada al incremento exponencial de producto PCR (Fase exponencial)

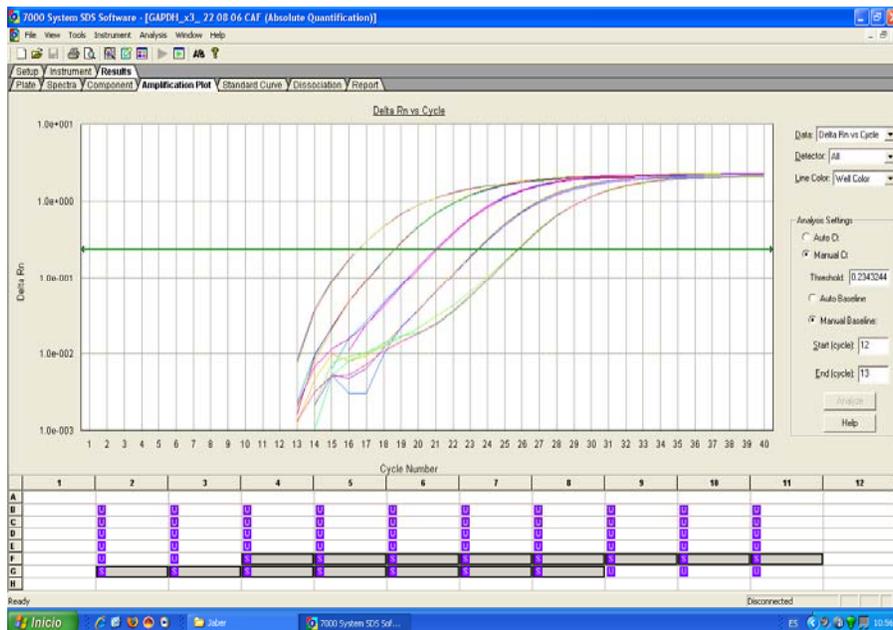
Aplicaciones de la PCR-TR

- Glosario de términos.
- **Cuantificación:**
 - Absoluta
 - Relativa
- Determinación de mutaciones.
- Ensayos +-

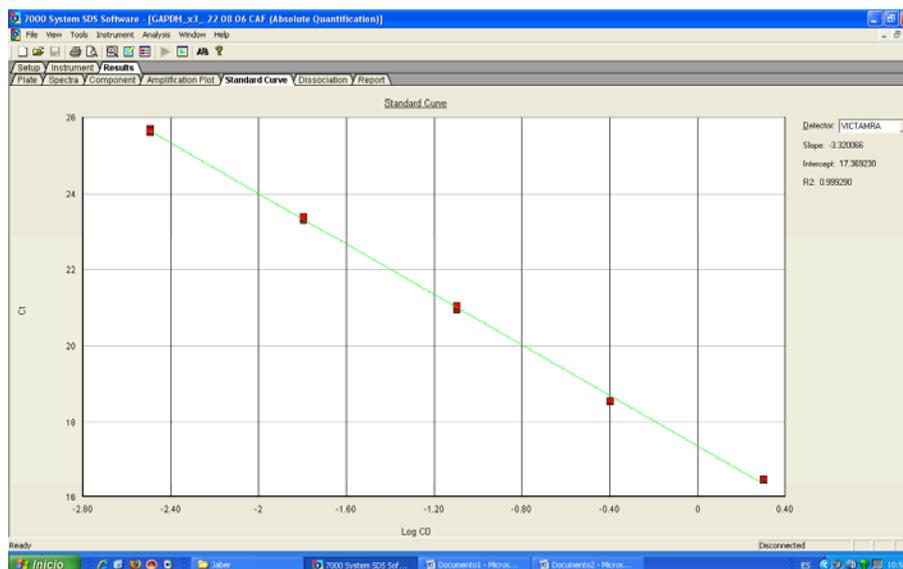
Métodos de cuantificación

- Curva estándar
- Delta Ct
- Método de Pfaffl

Curva estándar



Curva estándar



Curva Patrón

- $y=ax+b$. $Y=Ct$, $X=\log [DNA]$.
- Relaciona cada concentración con su Ct.
- Propia de cada pareja de primers.
- **La pendiente** depende de la eficiencia de los primers y no debería cambiar entre experimentos:
 - 100% ($a=-3.32$).
 - 75% ($a=-4$).
 - Aceptable: $-3 \leq -4$.
 - $a > -3$ contaminación por fluorescencia.

Curva Patrón

- **Correlación (R^2):**
 - $R^2=1$ (perfecta).
 - $R^2 \geq 0.97$ (0.99).
 - Seleccionar el umbral donde R^2 sea máxima.
 - Mantener el umbral entre experimentos.
- **Nº de réplicas:**
 - Al menos 2 réplicas por muestra.
 - Desviación estándar ≤ 0.38
- **Muestra:**
 - Curva absoluta: muestra de [conc] conocida.
 - Diluciones 1/5.

1. Cuantificación Absoluta

- **Validación de la curva patrón:**
 - La precisión de la cuantificación dependerá de la precisión de los patrones.
 - Patrones:
 - DNA plasmidial.
 - DNA genómico.
 - Productos PCR.
 - Grandes oligonucleótidos comerciales.
 - Resultado final relativo a una unidad de interés:
 - Copias/ng de RNA
 - Copias/g tejido, copias/ml sangre.
 - Copias/genoma.
 - Copias/ célula.

1. Cuantificación Absoluta

- Posibles curvas de calibrado (Expresión génica):
 - Productos de RT-PCR u oligonucleótidos:
 - Rápido, conocimiento preciso de [DNA].
 - Inestable, problemas en la reamplificación.
 - DNA recombinante:
 - Muy estable, sin problemas de amplificación, talla similar a transcritos.
 - Construcción del DNAREC, no tiene en cuenta la eficacia de la RT.
 - RNA recombinante:
 - Mimetiza la situación real de retrotranscripción (añadir RNA background).
 - Muy inestable, clonación complicado, purificación, problemas de almacenamiento.

1. Cuantificación Absoluta

- Puntos críticos de la curva patrón:
 - DNA o RNA puro y muy concentrado.
 - Exactitud en la medida de la concentración inicial (7 veces).
 - Pipeteo apropiado: dilución del DNA o RNA original hasta concentraciones similares a las muestras biológicas (10^6 - 10^{12}).
 - Estabilidad de las muestras patrón (RNA).

2. Cuantificación Relativa

- **Curva patrón:**
 - Sencillez en la preparación.
 - La cantidad de producto (n veces) se refiere a la obtenida en el calibrador (1x).
 - No hay unidades.
 - Se puede utilizar cualquier tipo de patrón para la obtención.

2. Cuantificación Relativa

- **Puntos críticos de la curva patrón:**
 - Dilución adecuada del RNA o DNA patrón.
 - La utilización de las mismas muestras en placas distintas permite comparar resultados.
 - Se pueden utilizar patrones DNA para análisis de RNA.
 - Se necesitan curvas patrón para el gen de estudio y el control endógeno.