

Ingeniería Genética II

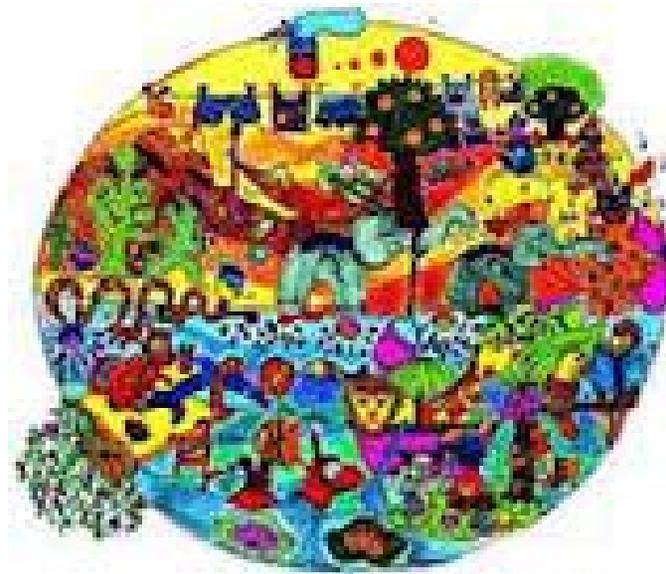
Unidad VI

Métodos de detección para ácidos nucleicos

Deteción de ácidos nucleicos

- La **adquisición** de grandes volúmenes de **información genómica y/o transcriptómica** se están transformando en rutina gracias a la disponibilidad de las **tecnologías NGS**.
- Por otro lado, las **metodologías** basadas en **hibridación de microarreglos** también aportan **abundante información** que convenientemente debe ser validada por métodos individuales.
- De este modo, el desarrollo de **tecnologías de alta sensibilidad** para la **detección de ácidos nucleicos particulares** sigue siendo un **objetivo central** en biología.
- Estos **métodos** sirven para **detectar genomas o transcriptos** en **investigación básica**, o para formular tecnologías asociadas , por ejemplo, a la **detección de patógenos**.

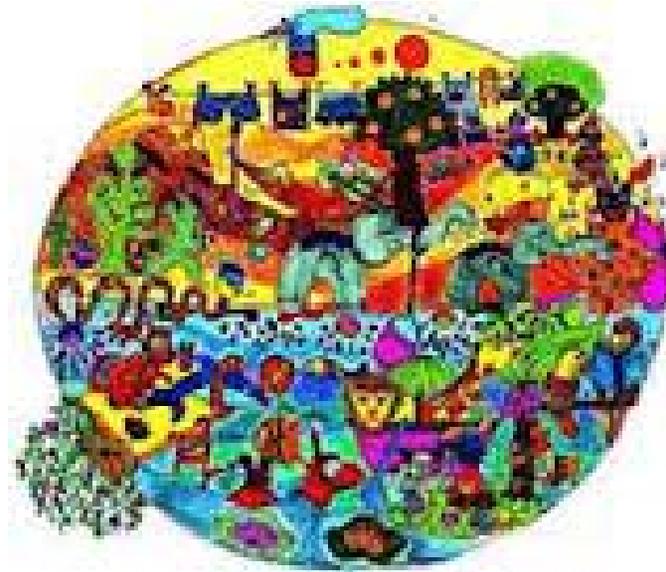
BIODIVERSIDAD



Todas las **entidades biológicas** que habitan este planeta pueden ser **detectadas** por diferentes **aproximaciones metodológicas**

BIODIVERSIDAD

Métodos de detección



GENOTIPO

FENOTIPO

BIODIVERSIDAD

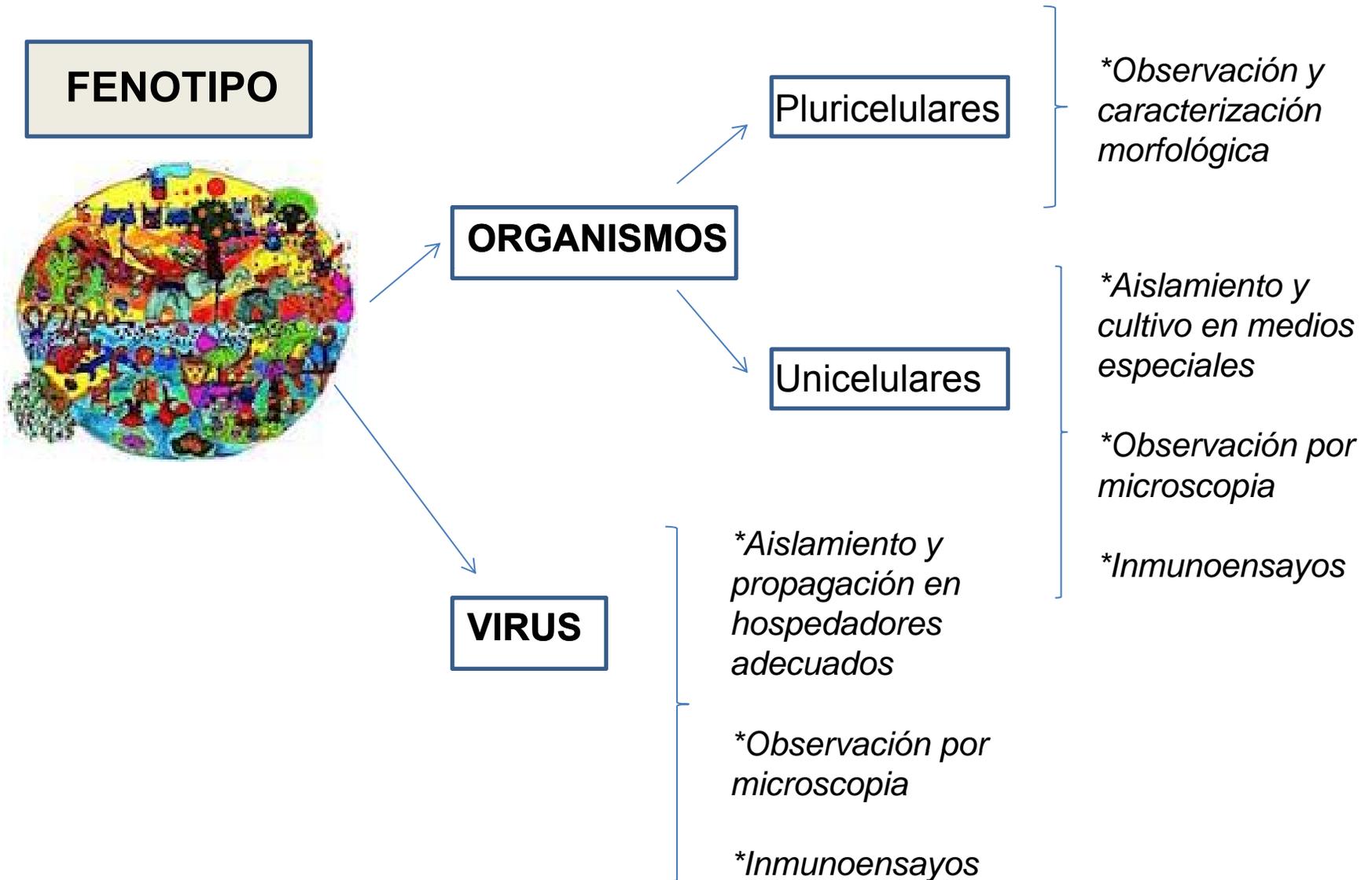
Métodos de detección

- En el **caso** de las **infecciones** (parasitismos entre entidades biológicas), la **detección** de cada entidad puede hacerse de **modo directo** o **indirecto**.
- El **modo directo** involucra **detectar** a cada **entidad** por su **genotipo** o **fenotipo**.
- El **modo indirecto** involucra **detectar** a cada **entidad** al **evaluar** la consecuencia de la **simbiosis**.



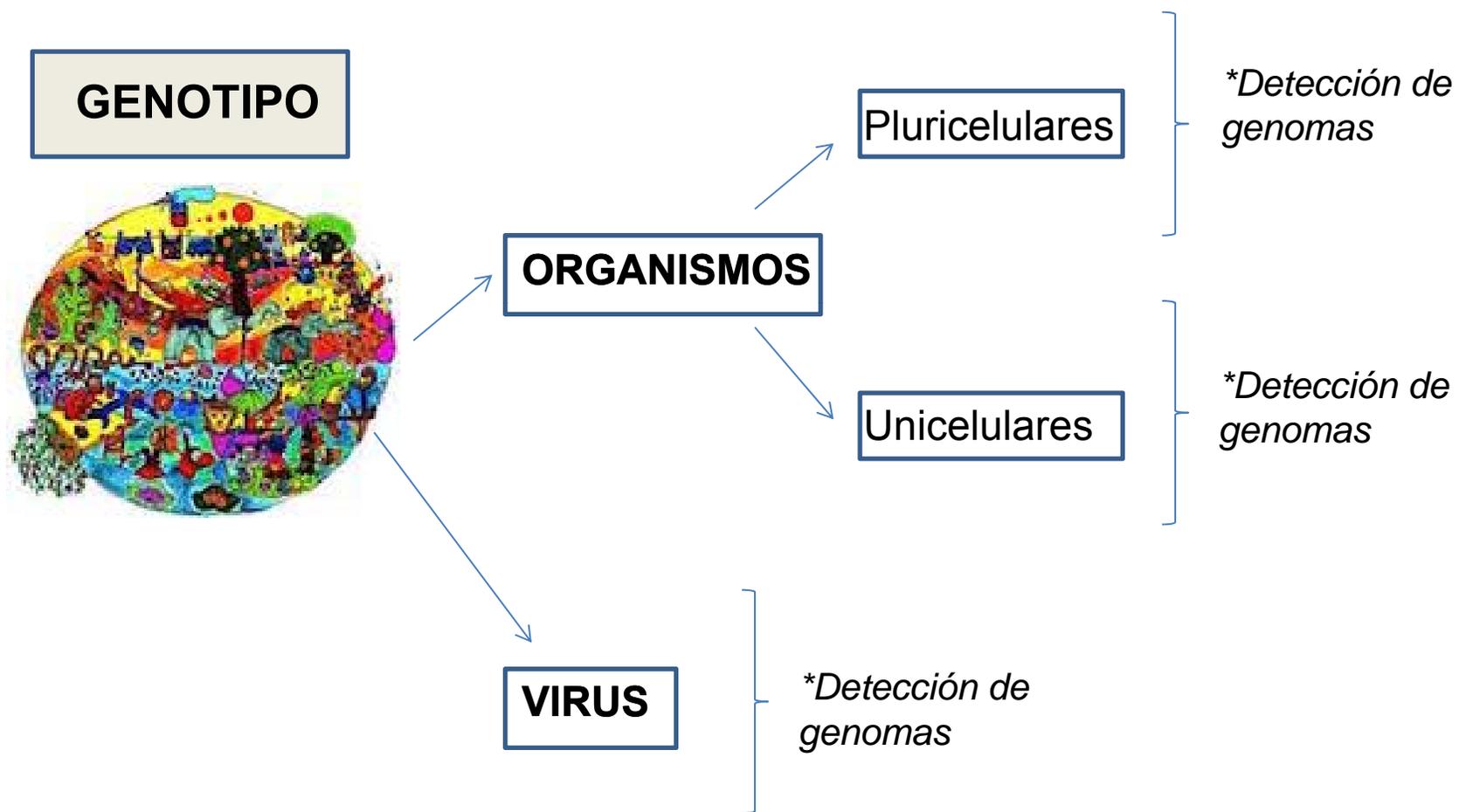
BIODIVERSIDAD

Métodos de detección



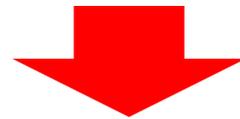
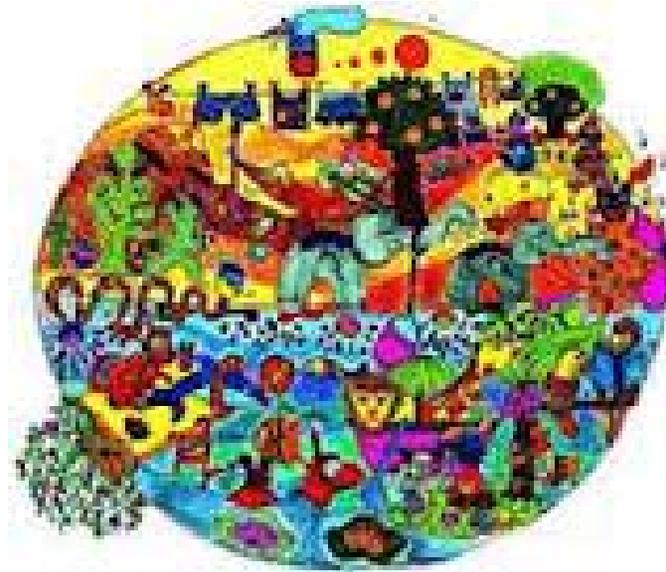
BIODIVERSIDAD

Métodos de detección



BIODIVERSIDAD

Métodos de detección



Presencia de ácidos nucleicos



BIODIVERSIDAD

Métodos de detección

- La **detección de transcriptos** específicos también es un asunto relevante.
- Por ejemplo, la **validación** de los **resultados** arrojados por la **hibridación sobre microarreglos** requiere del uso de métodos de detección específicos.
- Así, no sólo es cuestión de detectar genomas, si no también transcriptos específicos presentes en materia viva.
- En cualquiera de los **dos casos –DNA o RNA-** los **métodos** de detección son **similares** y aplicables para uno u otro.

***¿Cuáles son los métodos
que permiten identificar
ácidos nucleicos de
manera específica?***

BIODIVERSIDAD

Métodos de detección genotípicos

NATs (*Nucleic Acid Amplification Tests*)

- Es el conjunto de **técnicas** que permiten **detectar moléculas genómicas** de organismos y/o virus.
- Generalmente aplicado al diagnóstico de enfermedades infecciosas.

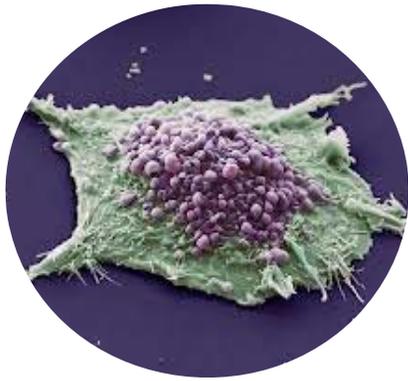
BIODIVERSIDAD

Métodos de detección genotípicos: NAT

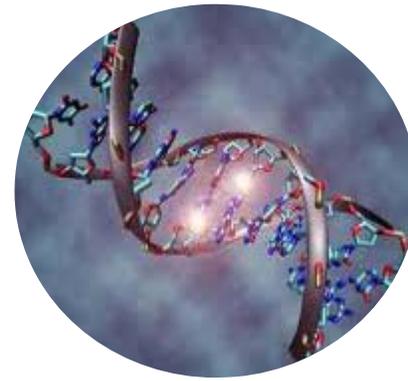
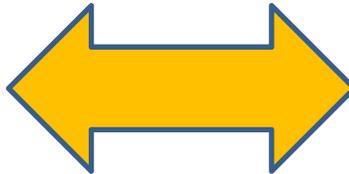
- Considerando que **una célula o virus** posee **una unidad genómica** (segmentada o no de acuerdo a la entidad), la determinación del número de unidades genómicas indicaría el número de células o virus en estudio.
- De esta manera, se torna en un **enfoque indirecto** para establecer el **número de entidades biológicas** que se encuentra en una muestra problema.

BIODIVERSIDAD

Métodos de detección genotípicos: NAT



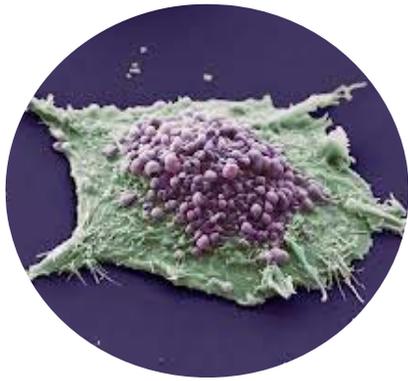
1 entidad biológica



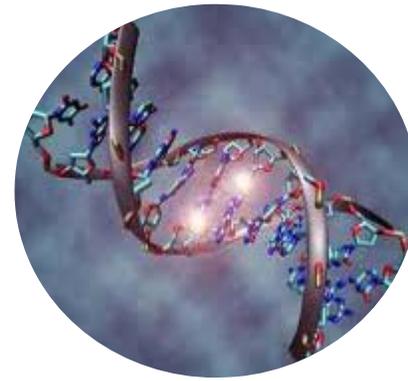
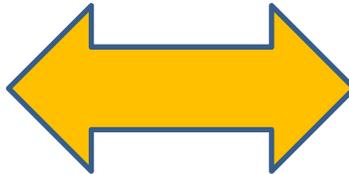
1 unidad genómica

BIODIVERSIDAD

Métodos de detección genotípicos: NAT



1 entidad biológica



1 unidad genómica

La potencial **desventaja** de este conjunto de metodologías está dada en que se detectan **entidades viables y no viables** al mismo tiempo.

***¿Cuál es el método de
detección genotípico más
aplicado?***

Métodos de detección genotípicos

PCR

El método por excelencia es la **PCR** (Reacción en cadena de la polimerasa)

- La PCR es un método que consiste en la replicación exponencial *in vitro* de un fragmento de dsDNA.
- La PCR es un método que permite generar fragmentos precisos para construcciones genéticas, o detectar ácidos nucleicos a partir de muestras problema.



Kary Mullis

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

- La **PCR** está basada en la **replicación de los genomas de dsDNA**.
- Dichos genomas replican de manera **semiconservativa**.
- En la naturaleza, existe una **maquinaria proteica** que se encarga de **desarmar el dúplex** y estabilizar las cadenas de ssDNA.
- Se requieren **cebadores de síntesis**.
- Las **ADN polimerasas** son las encargadas de **replicar el DNA**, tomando de molde uno de los ssDNA, y sintetizando a partir de los cebadores.

PCR

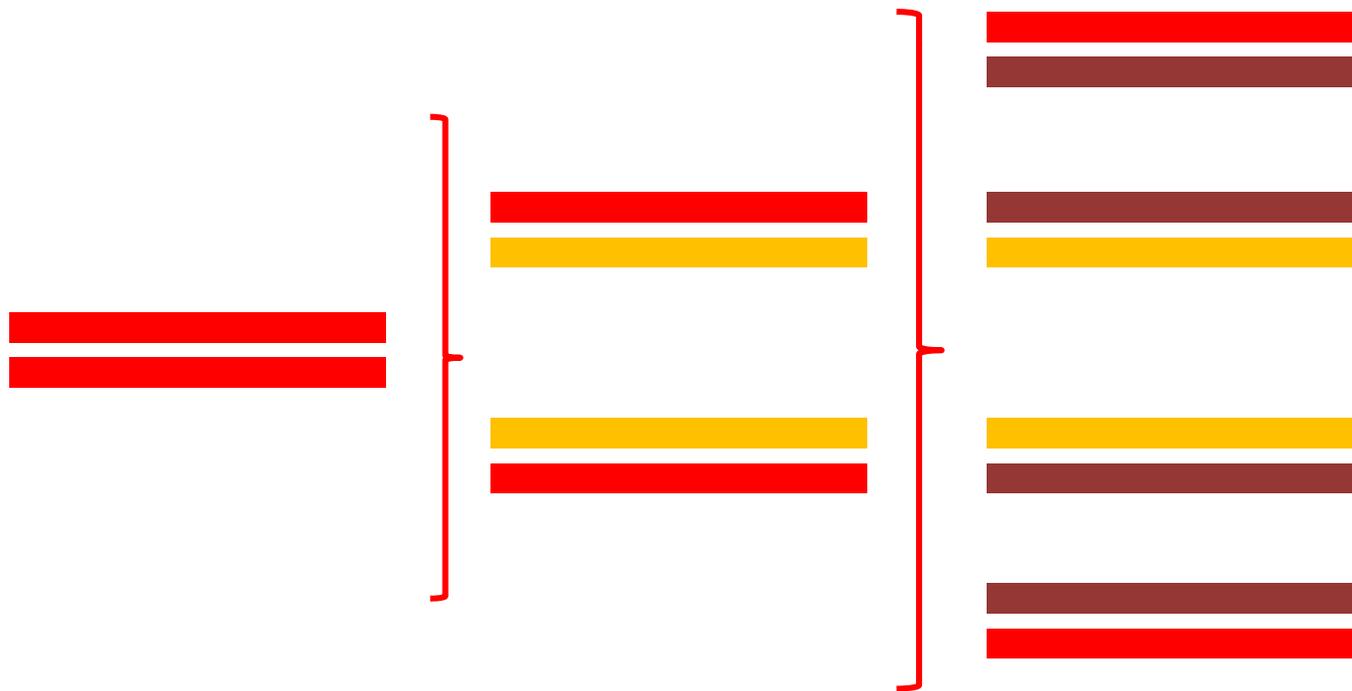
Replicación *in vitro* de dsDNA

- La PCR está basada en la replicación de los genomas de dsDNA.
- Dichos genomas replican de manera **semiconservativa**.
- Existe una **maquinaria proteica** que se encarga de **desarmar el dúplex** y estabilizar las cadenas de ssDNA.
- Se requieren **cebadores de síntesis**.
- Las **ADN polimerasas** son las encargadas de **replicar el DNA**, tomando de molde uno de los ssDNA, y sintetizando a partir de los cebadores.

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

La replicación de los genomas es semiconservativa



Las polimerasas implicadas en la replicación de los genomas requieren de molde para la síntesis de polinucleótidos

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

- La PCR está basada en la replicación de los genomas de dsDNA.
- Dichos genomas replican de manera semiconservativa.
- Existe una **maquinaria proteica** que se encarga de **desarmar el dúplex** y estabilizar las cadenas de ssDNA.
- Se requieren **cebadores de síntesis**.
- Las **ADN polimerasas** son las encargadas de **replicar el DNA**, tomando de molde uno de los ssDNA, y sintetizando a partir de los cebadores.

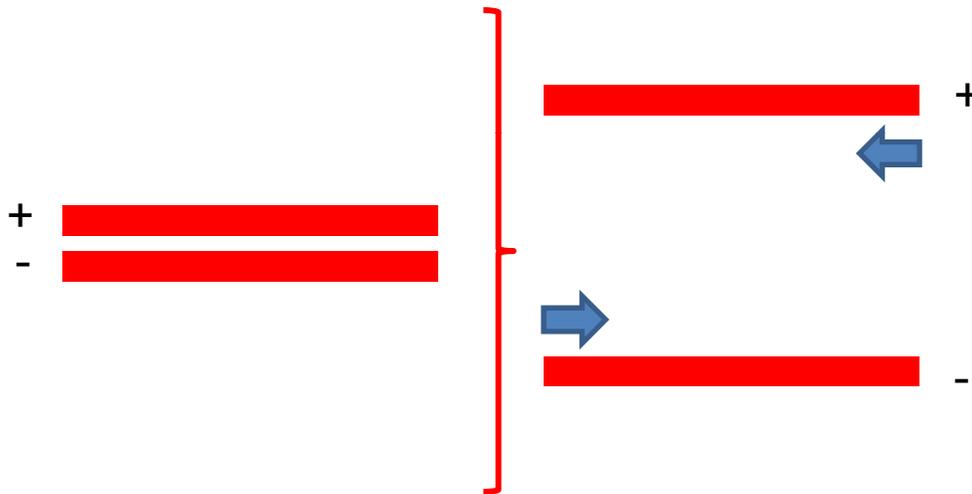
PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

- La PCR está basada en la replicación de los genomas de dsDNA.
- Dichos genomas replican de manera semiconservativa.
- Existe una maquinaria proteica que se encarga de desarmar el dúplex y estabilizar las cadenas de ssDNA.
- Se requieren **cebadores de síntesis**.
- Las **ADN polimerasas** son las encargadas de **replicar el DNA**, tomando de molde uno de los ssDNA, y sintetizando a partir de los cebadores.

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA



En cada una de las cadenas del dsDNA hibrida un oligonucleótido complementario, y exponiendo un OH 3' libre para la síntesis.

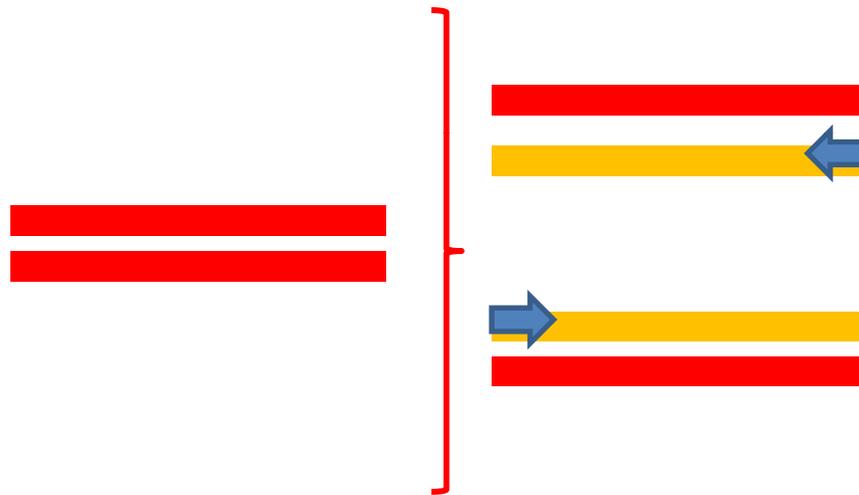
PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

- La PCR está basada en la replicación de los genomas de dsDNA.
- Dichos genomas replican de manera semiconservativa.
- Existe una maquinaria proteica que se encarga de desarmar el dúplex y estabilizar las cadenas de ssDNA.
- Se requieren cebadores de síntesis.
- Las **ADN polimerasas** son las encargadas de **replicar el DNA**, tomando de molde uno de los ssDNA, y sintetizando a partir de los cebadores.

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA



La ADN polimerasa extiende el cebador incorporando nucleótidos complementarios a la otra cadena de ssDNA (molde). Siempre en dirección 5' a 3'.

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

- En virtud de todo lo anterior, se diseñó la PCR considerando:

Necesidad de molde
(ssDNA o dsDNA)

Temperatura para
separar al dúplex

Oligonucleótidos
sintéticos como
cebadores

DNA polimerasa
termoestable

Multiplicidad de ciclos

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

Oligonucleótidos sintéticos como cebadores de reacción (*primers*)

```
CAATCCTTAAGGAGGAAACCATAAAAATCAATTGAAACACAAAAACTAGATAAAGCAC
CTGGATCAGATTTGGTCACAAATGAACTGTTAAAAGTAACGTTACCAGTGATAGCAC
CAAGACTAACAGATCTATTCAATGAAATCCTTGAAACGGAAACCATCCCAGAAGACT
GGACTAAATCGACCATCATACTGCTACATAAGAAAGGAGACAAAGGCGATATAGGAA
ACTACAGGCCGATCAGTTTAAATGTCCAATATTTATAAAAATATTTTCTAAAATCATT
TACAAAGAATCACTAATATACTAGATGAAAACCAACCAAGGAACAAGCTGGTTTTTC
GTAGTAATTTTTTCGACCATAGATCACATACACACTTTAAGACAGATATTACAGAAAT
ATAGAGAATATAATAAAAACGTATTAC
```

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

Oligonucleótidos sintéticos como cebadores de reacción (*primers*)

CAATCCTTAAGGAGGAAACCATAAAATCAATTGAAACACAAAAACTAGATAAAGCAC
CTGGATCAGATTTGGTCACAAATGAACTGTTAAAAGTAACGTTACCAGTGATAGCAC
CAAGACTAACAGATCTATTCAATGAAATCCTTGAAACGGAAACCATCCCAGAAGACT
GGACTAAATCGACCATCATACTGCTACATAAGAAAGGAGACAAAGGCGATATAGGAA
ACTACAGGCCGATCAGTTTAATGTCCAATATTTATAAAATATTTTCTAAAATCATT
TACAAAGAATCACTAATATACTAGATGAAAACCAACCAAGGAACAAGCTGGTTTTTC
GTAGTAATTTTTTCGACCATAGATCACATACACACTTTAAGACAGATATTACAGAAAT
ATAG**AGAATATAATAAAACGTATTAC**

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

Oligonucleótidos sintéticos como cebadores de reacción (*primers*)

5´ CAATCCTTAAGGAGGAAACCAT 3´ *Forward*

CAATCCTTAAGGAGGAAACCATAAAATCAATTGAAACACAAAACTAGATAAAGCAC
CTGGATCAGATTTGGTCACAAATGAACTGTTAAAAGTAACGTTACCAGTGATAGCAC
CAAGACTAACAGATCTATTCAATGAAATCCTTGAAACGGAAACCATCCCAGAAGACT
GGACTAAATCGACCATCATACTGCTACATAAGAAAGGAGACAAAGGCGATATAGGAA
ACTACAGGCCGATCAGTTTAATGTCCAATATTTATAAAATATTTTCTAAAATCATT
TACAAAGAATCACTAATATACTAGATGAAAACCAACCAAGGAACAAGCTGGTTTT
GTAGTAATTTTTTCGACCATAGATCACATACACACTTTAAGACAGATATTACAGAAAT
ATAGAGAATATAATAAAACGTATTAC

3´ TCTTATATTATTTGCATAATG 5´ *Reverse*

PCR

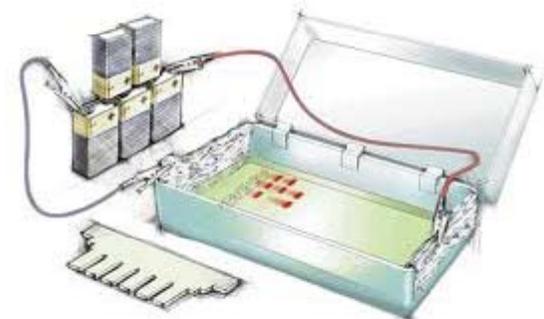
Replicación *in vitro* de dsDNA



Buffer, $MgCl_2$, dNTPs,
Primer para cadena + (Fw),
Primer para cadena – (Rev),
DNApol Termoestable,
DNA molde



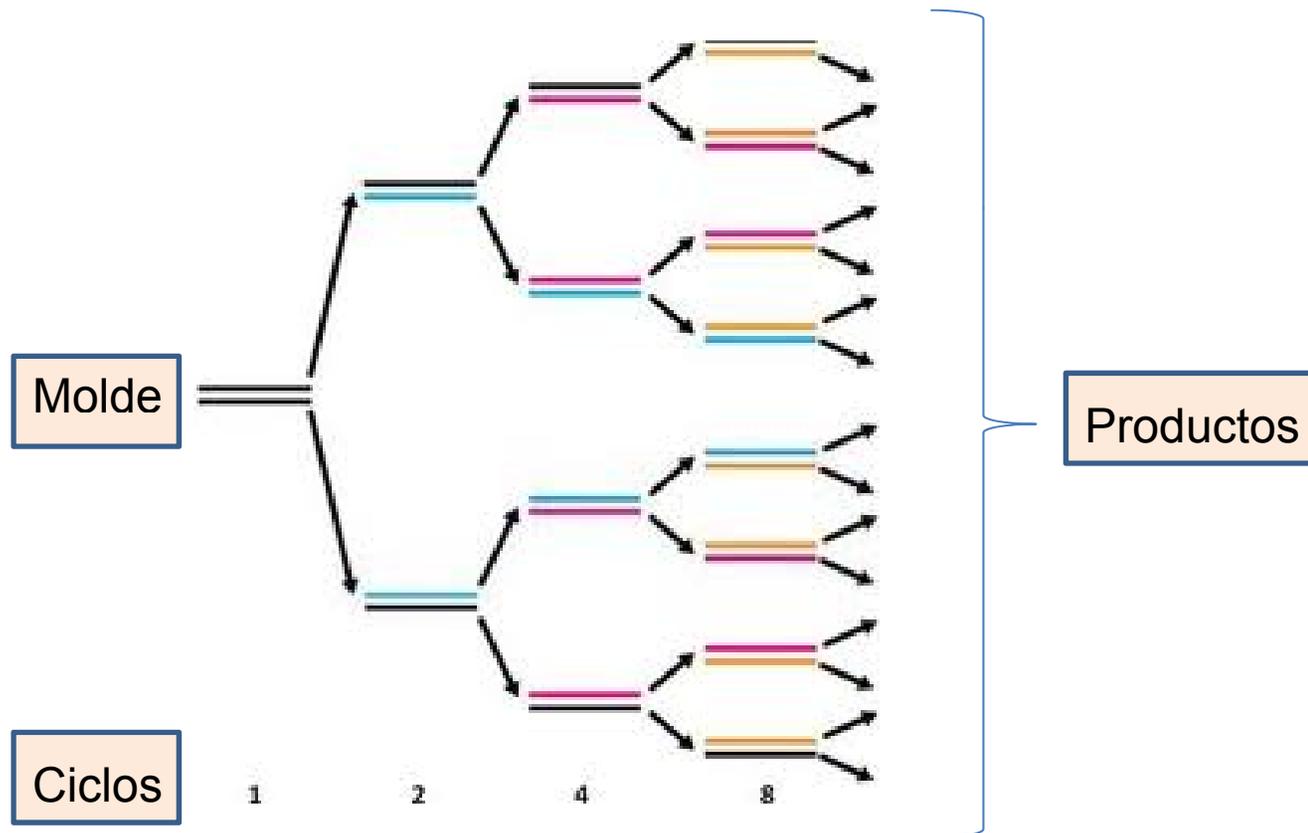
Termociclador
(equipamiento con sistema Peltier
que cicla temperaturas a intervalos
de tiempo automatizables)



Electroforesis

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA



PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

Interpretación matemática de una PCR ideal:



$$P = 2^N \times M$$

Donde...

- P**: cantidad de moléculas producto
- N**: número de ciclos
- M**: cantidad de moléculas molde
- 2**: factor de incremento ciclo a ciclo

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

Interpretación matemática de una PCR real:



$$P = (1 + \alpha)^N \times M$$

Donde...

P: cantidad de moléculas producto

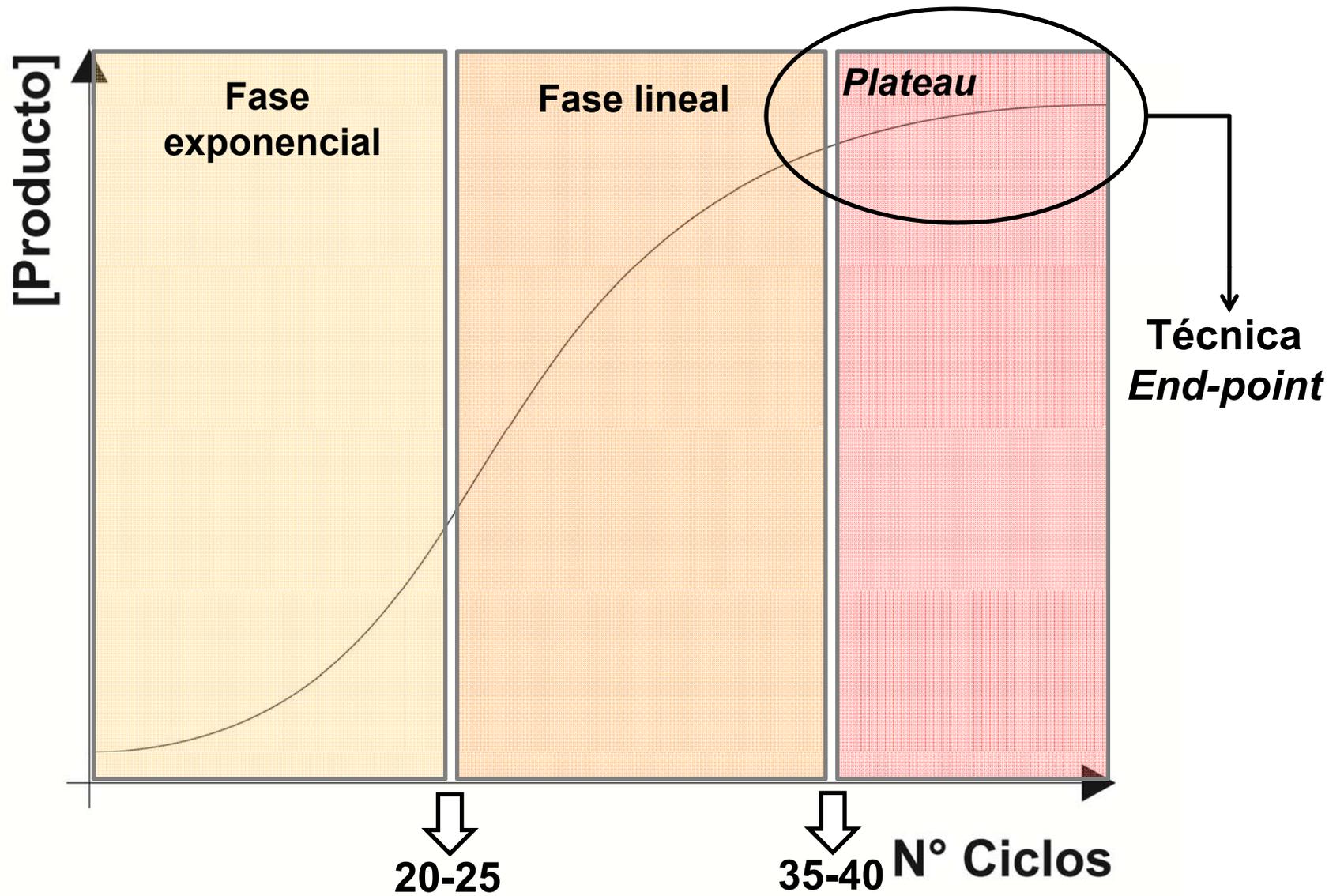
N: número de ciclos

M: cantidad de moléculas molde

(1+α): factor de incremento ciclo a ciclo $0 < \alpha < 1$

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA



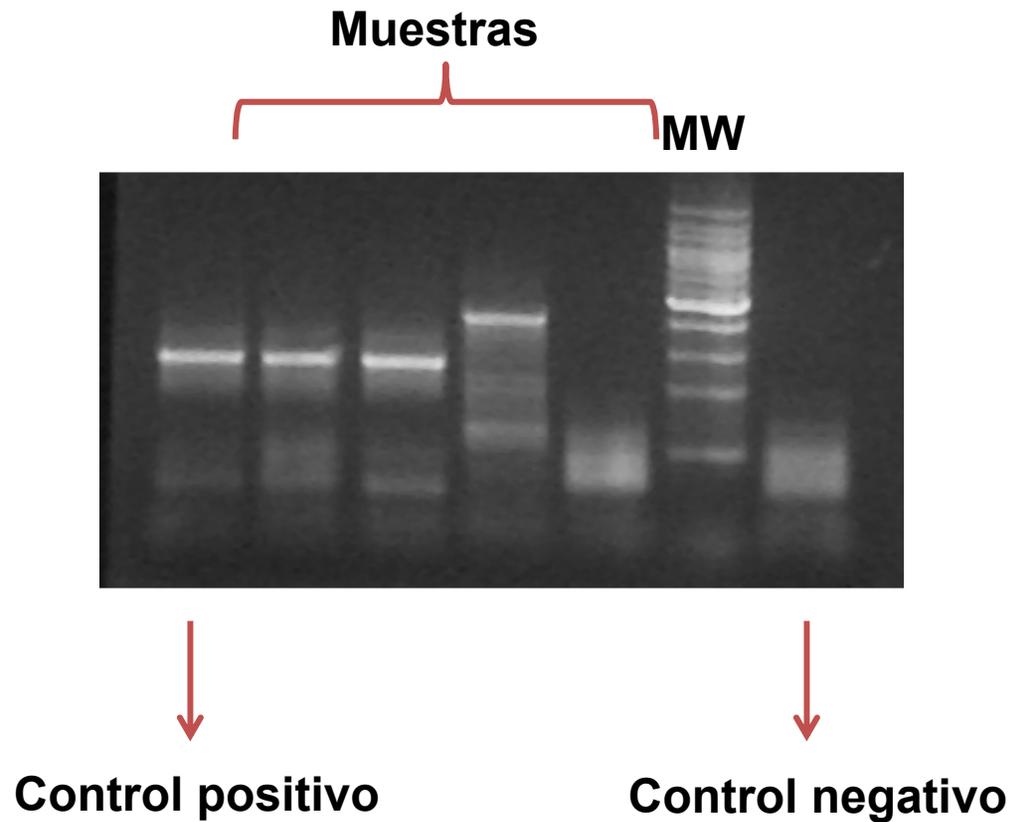
PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

- La **PCR** es una técnica de **END POINT**.
- Esto significa que el **análisis del resultado** se realiza al **final** del proceso.
- El **análisis** se realiza mediante **electroforesis** en geles de agarosa (a veces PAGE), y tinción con **agentes intercalantes** y exposición a **luz UV**.
- Es necesario sembrar también un **marcador de referencia**.
- La presencia de una **banda en el rango de tamaños** predicho sugiere que la **replicación *in vitro*** fue exitosa.

PCR

Replicación *in vitro* de dsDNA

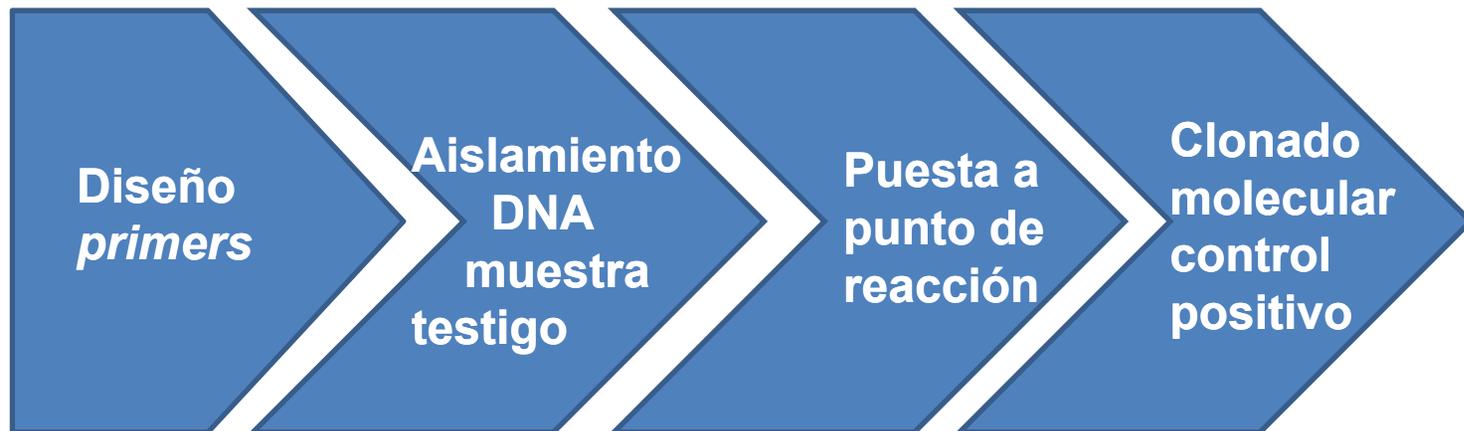


PCR como técnica diagnóstica

- La **PCR** es una excelente **técnica diagnóstica** para cualquier **entidad biológica que posea genoma**.
- Se requiere **conocer** algo de información de **secuencia** para así **diseñar primers específicos**.
- Una vez obtenido un **producto de amplificación** sobre una **muestra testigo**, el mismo puede ser recuperado del gel de la electroforesis y **clonado** en un plásmido (**construcción genética para control positivo**).
- Utilizando la construcción anterior como referencia, es posible **diagnosticar la presencia de la entidad biológica en muestras problemas**.
- Lo mismo vale para la **detección** de un **genoma viral de RNA** o de un **transcripto**, con un **paso previo** de síntesis de **cDNA**.

PCR como técnica diagnóstica

Etapas en el desarrollo del método diagnóstico:



PCR como técnica diagnóstica

Etapas del método diagnóstico:

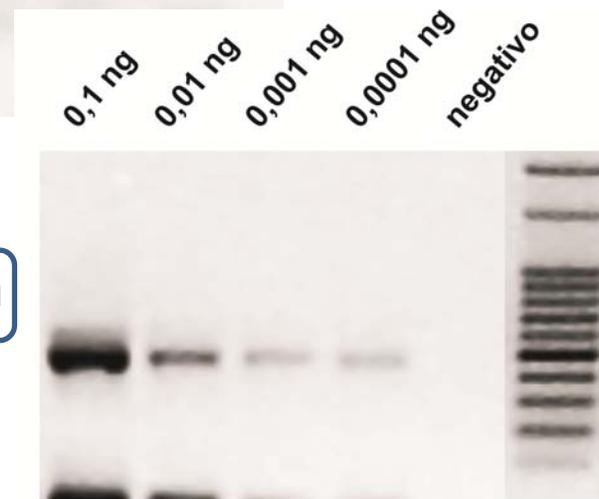
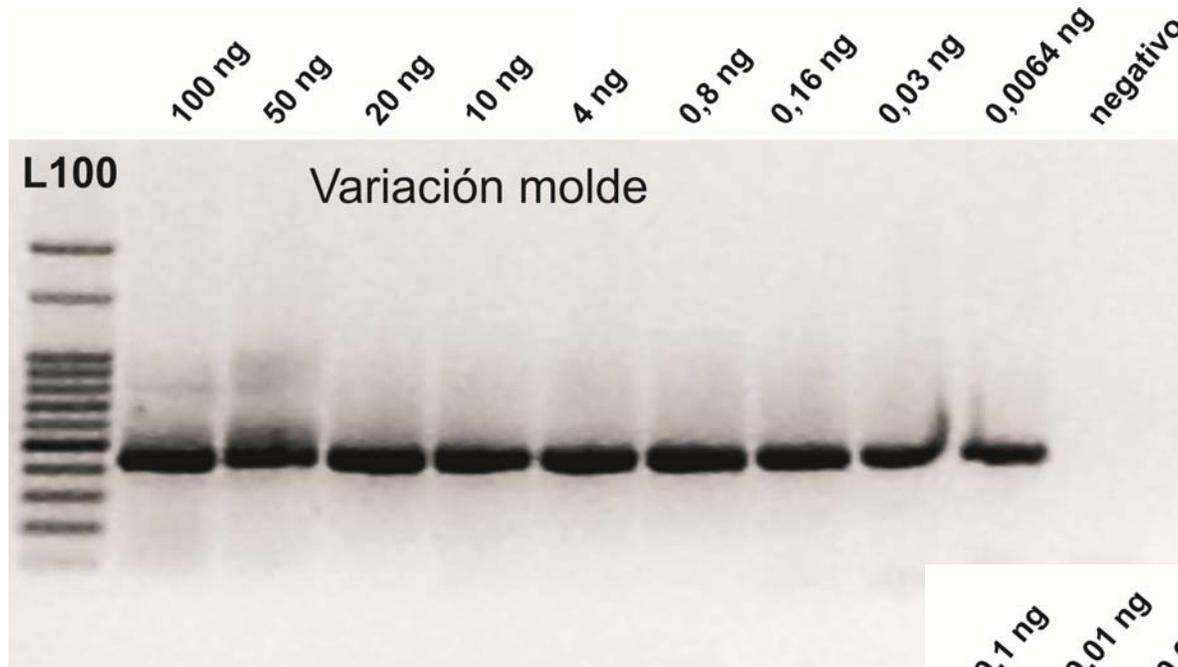


Este diseño sólo permite (utilizando como referencia el control positivo) establecer presencia o ausencia de la entidad biológica en estudio (sensibilidad dada por el método de detección que es la electroforesis).

PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa

- Muchas veces, no sólo se requiere conocer si en una muestra problema se encuentra una entidad biológica particular o un transcripto, si no que también **se busca establecer cuál es la cantidad de la misma.**
- En tales casos, la **aproximación metodológica** debe ser más **exhaustiva.**
- Para ello, y contando con la **construcción genética** que funciona como **control positivo**, es posible realizar una **curva de calibración.**
- A partir de dicha **curva de calibración** con el **estándar externo**, es **posible inferir la cantidad de DNA molde que había en la muestra original**, y a partir de allí, el número de entidades biológicas presente.

PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa



Ejemplos de curvas de calibración

PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa

- La **construcción** utilizada como **control positivo** debe ser **cuantificada mediante sus propiedades espectroscópicas**, y a partir de allí, inferir el número de moléculas de molde utilizadas.
- **Luego** de la **PCR**, la amplificación lograda en la curva de calibración y en las muestras problema debe ser **analizada mediante densitometría** valiéndose de *software* adecuados y de un marcador de masa sembrado en la misma electroforesis.
- Con los datos anteriores puede inferirse el número de moléculas producto obtenidos en cada punto de la curva, y en las muestras problemas.
- Con los **datos de molde y producto de la curva** (aplicando \log_{10}) puede **estimarse la ecuación de una recta**.
- Utilizando la **ecuación anterior**, puede **inferirse la cantidad de molde efectivo** que había en las **muestras problema**.

PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa



Espectrofotómetros de detección de ácidos nucleicos para cuantificar el patrón



Computadora y *software* para análisis de resultado de electroforesis

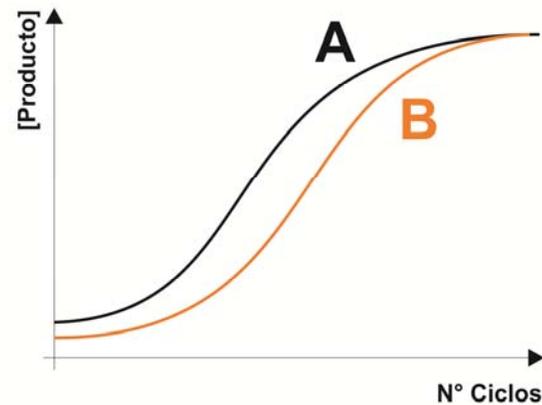
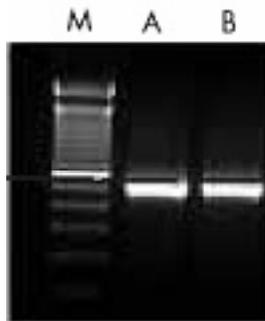
PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa

N° de moléculas de DNA = $(\text{masa}/\text{PM}) \times N^{\circ}\text{Avogadro}$

$\text{PM de un DNA} = (\text{long en pb}) \times \text{masa mol de un pb}$

PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa

La **PCR cuantitativa con estándar externo** es buena para determinar un rango de la cantidad de muestra problema, pero **presenta desventajas** y puede ser **imprecisa** entre distintas muestras. Además, se **comparan reacciones independientes** que pueden no haber progresado igual.



PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa

- Para **compensar** el problema de utilizar un **estándar externo** para inferir la cantidad de ácido nucleico de una muestra problema, existe la posibilidad de realizar una **competición con un estándar interno**.
- En esta aproximación, es necesario generar un **DNA control** (estándar interno) que sea levemente **más pequeño** que el **amplicón** a ser determinado.
- El **estándar interno** se **agrega** en el **tubo de reacción** de la PCR problema y de ese modo, tanto el control como la muestra se someten a las **mismas condiciones del ensayo**.

PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa

Si agregamos el estándar interno, la ecuación para ambos procesos es la siguiente...

$$\frac{P_m (1+\alpha)^N M_m}{P_e (1+\alpha)^N M_e}$$

m = muestra
e = estándar



$$\frac{P_m M_m}{P_e M_e}$$

PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa

Si agregamos el estándar interno, la ecuación para ambos procesos es la siguiente...

$$\frac{P_m (1+\alpha)^{N_x} M_m}{P_e (1+\alpha)^{N_x} M_e}$$

m = muestra
e = estándar

↓

$$\frac{P_m M_m}{P_e M_e}$$

incógnita

PCR como técnica diagnóstica semicuantitativa

- En cualquiera de los dos procedimientos analizados, sería conveniente detectar el producto de amplificación antes de que el proceso finalice.
- Esto condiciona a que la técnica deje de ser de **END POINT** para transformarse en **REAL TIME**.
- Bajo estas consideraciones, surge la modificación tecnológica que dio lugar a la **REAL TIME PCR**, técnica diagnóstica cuantitativa superadora de las opciones antes descritas.

***¿Cómo es la PCR en
tiempo Real?***

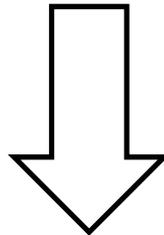
PCR en TIEMPO REAL

Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.

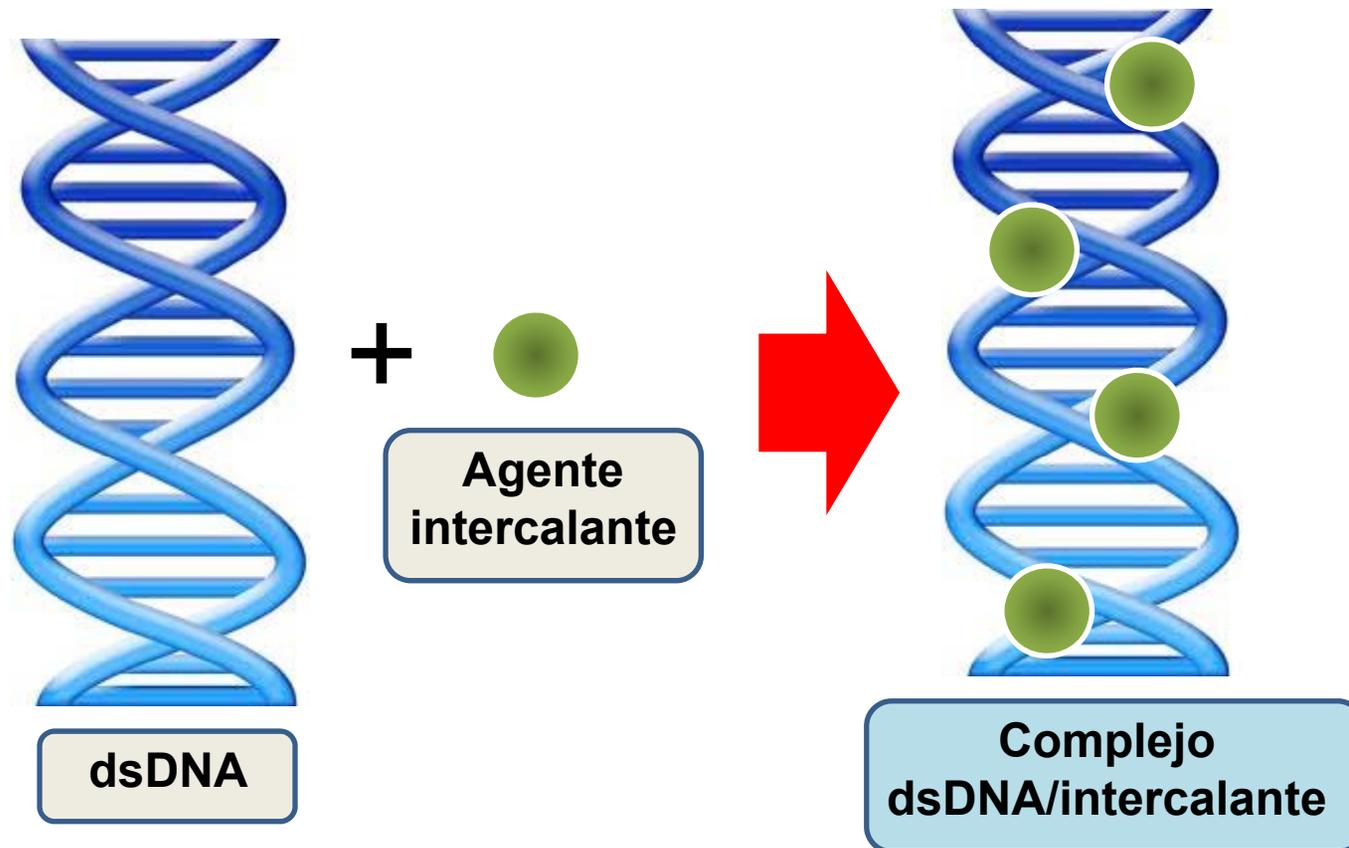
Biotechnology (N Y). 1993 Sep;11(9):1026-30. Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA 94501.

We describe a simple, quantitative assay for any amplifiable DNA sequence that uses a video camera to monitor multiple polymerase chain reactions (PCRs) simultaneously over the course of thermocycling. The video camera detects the accumulation of double-stranded DNA (dsDNA) in each PCR using the increase in the fluorescence of ethidium bromide (EtBr) that results from its binding duplex DNA. The kinetics of fluorescence accumulation during thermocycling are directly related to the starting number of DNA copies. The fewer cycles necessary to produce a detectable fluorescence, the greater the number of target sequences. Results obtained with this approach indicate that a kinetic approach to PCR analysis can quantitate DNA sensitively, selectively and over a large dynamic range. This approach also provides a means of determining the effect of different reaction conditions on the efficacy of the amplification and so can provide insight into fundamental PCR processes.

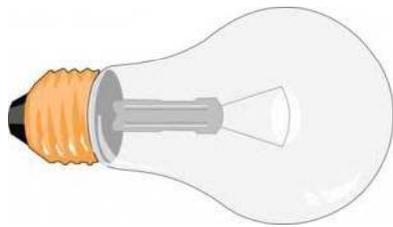


Es una variante de la PCR convencional utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación.

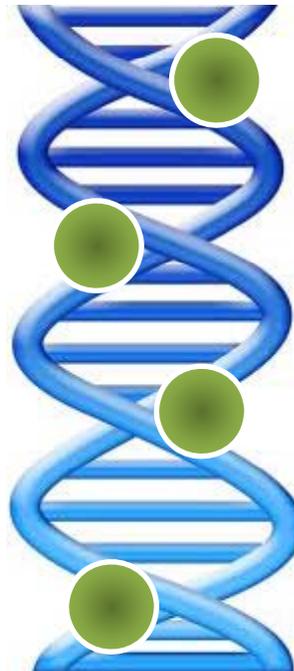
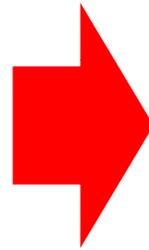
PCR en TIEMPO REAL



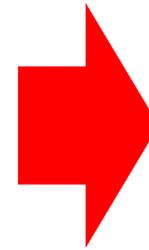
PCR en TIEMPO REAL



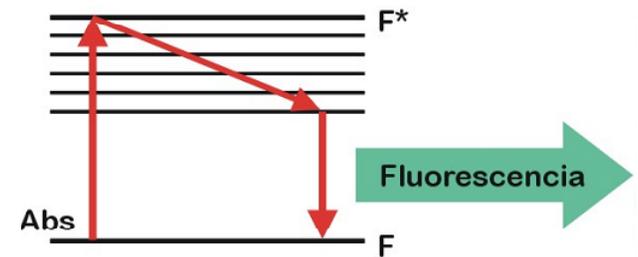
Excitación con luz



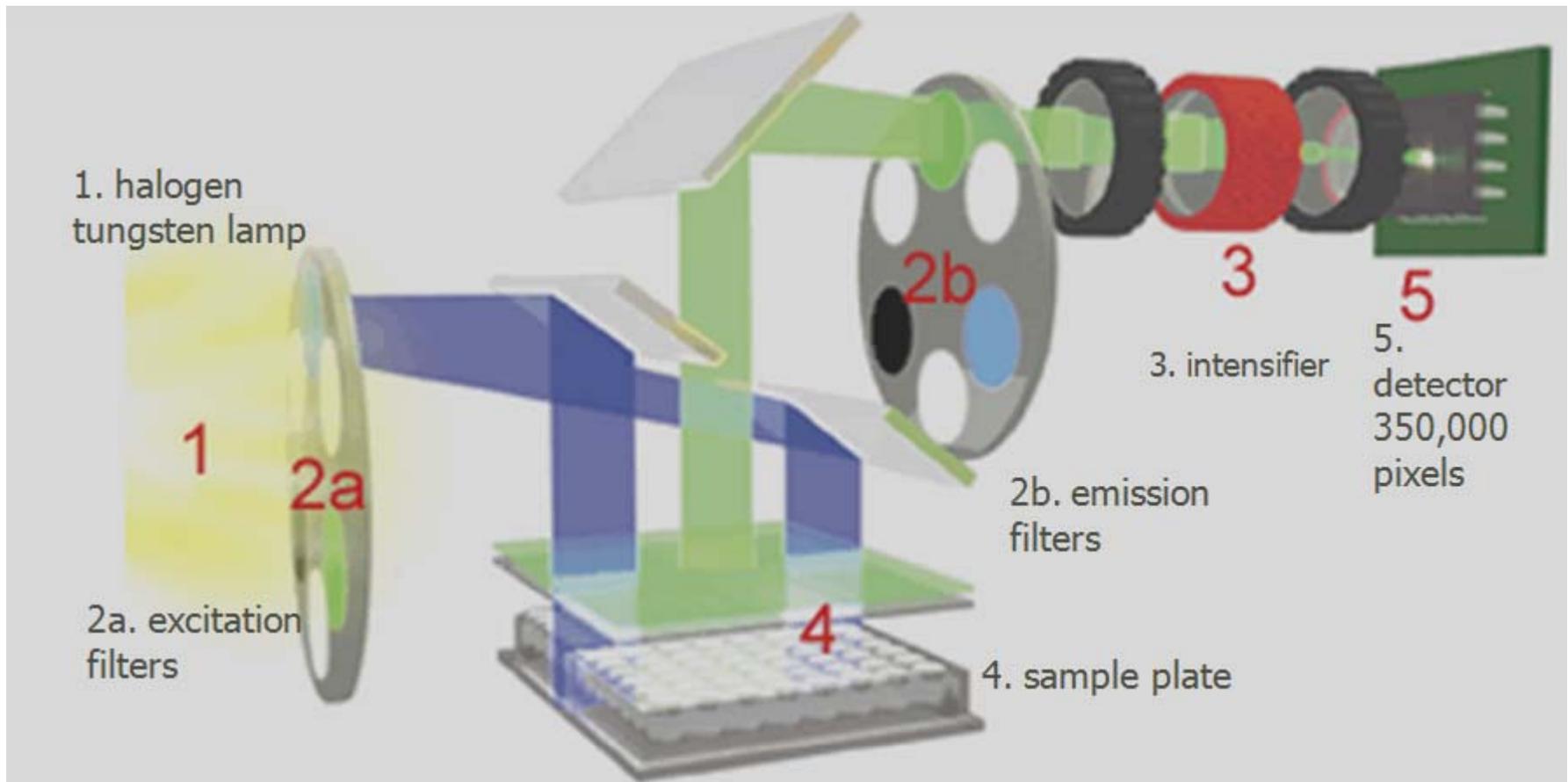
Complejo
dsDNA/intercalante



Detección de fluorescencia
mediante un fluorímetro



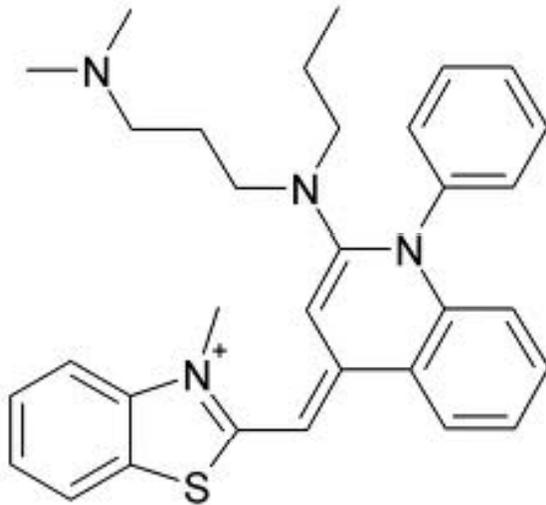
PCR en TIEMPO REAL



PCR en TIEMPO REAL

- La *mix* de reacción se realiza junto con una **sustancia** que forma **complejo** con el **dsDNA**, y que no interfiere con la síntesis.
- El **complejo dsDNA/sustancia** al ser **excitado por una luz** a cierta longitud de onda, **se relaja emitiendo fluorescencia**.
- La emisión de **fluorescencia** es **proporcional** a la cantidad de **complejo dsDNA/sustancia**.
- La **fluorescencia** puede ser **detectada y registrada**, en **tiempo real** ciclo a ciclo.
- **No** existe un paso de **electroforesis** al finalizar el proceso.
- La **Real Time PCR** también es denominada **qPCR** (por *quantitative* PCR)

PCR en TIEMPO REAL



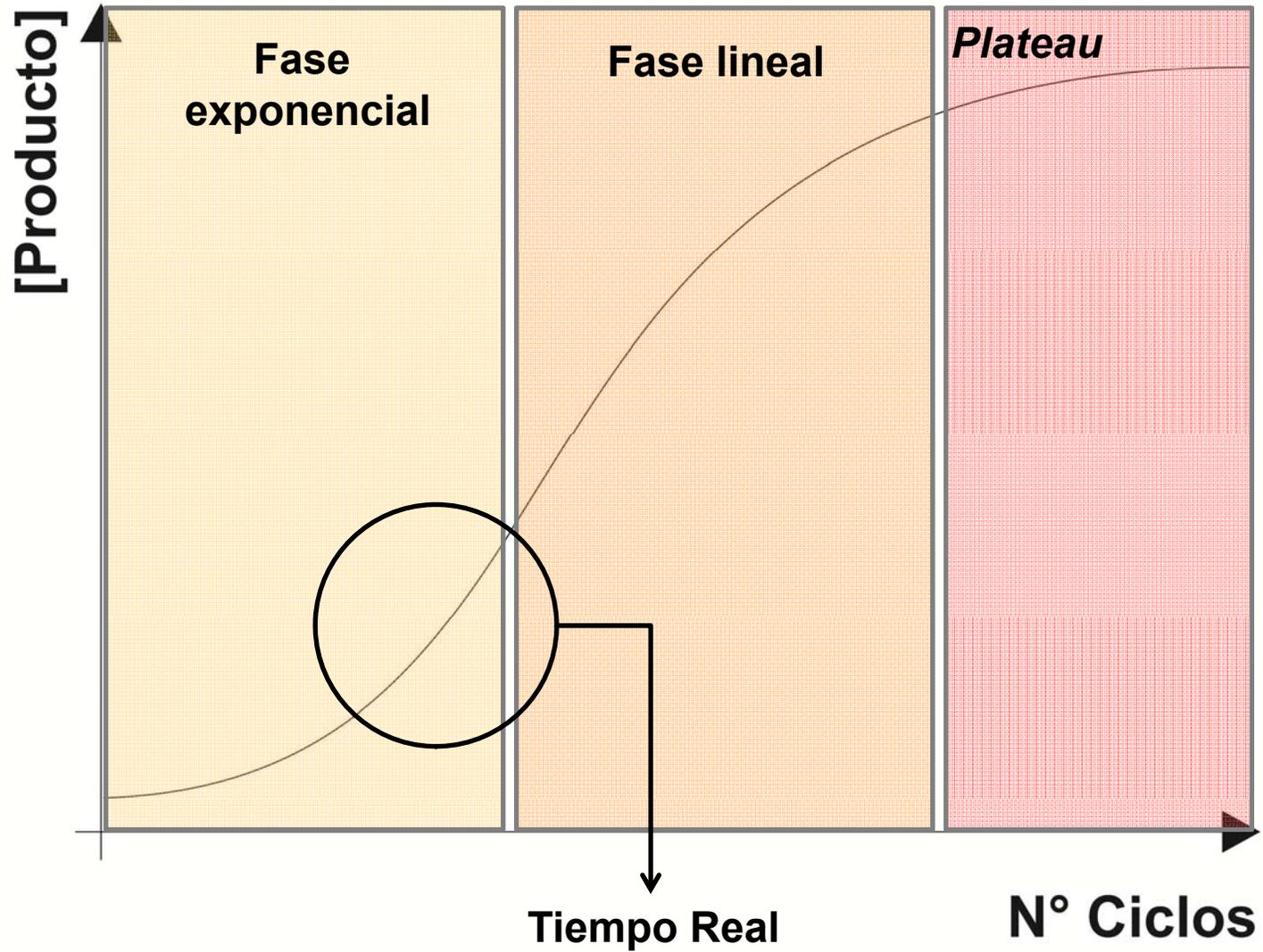
N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine

Conocido como **SyBr Green**

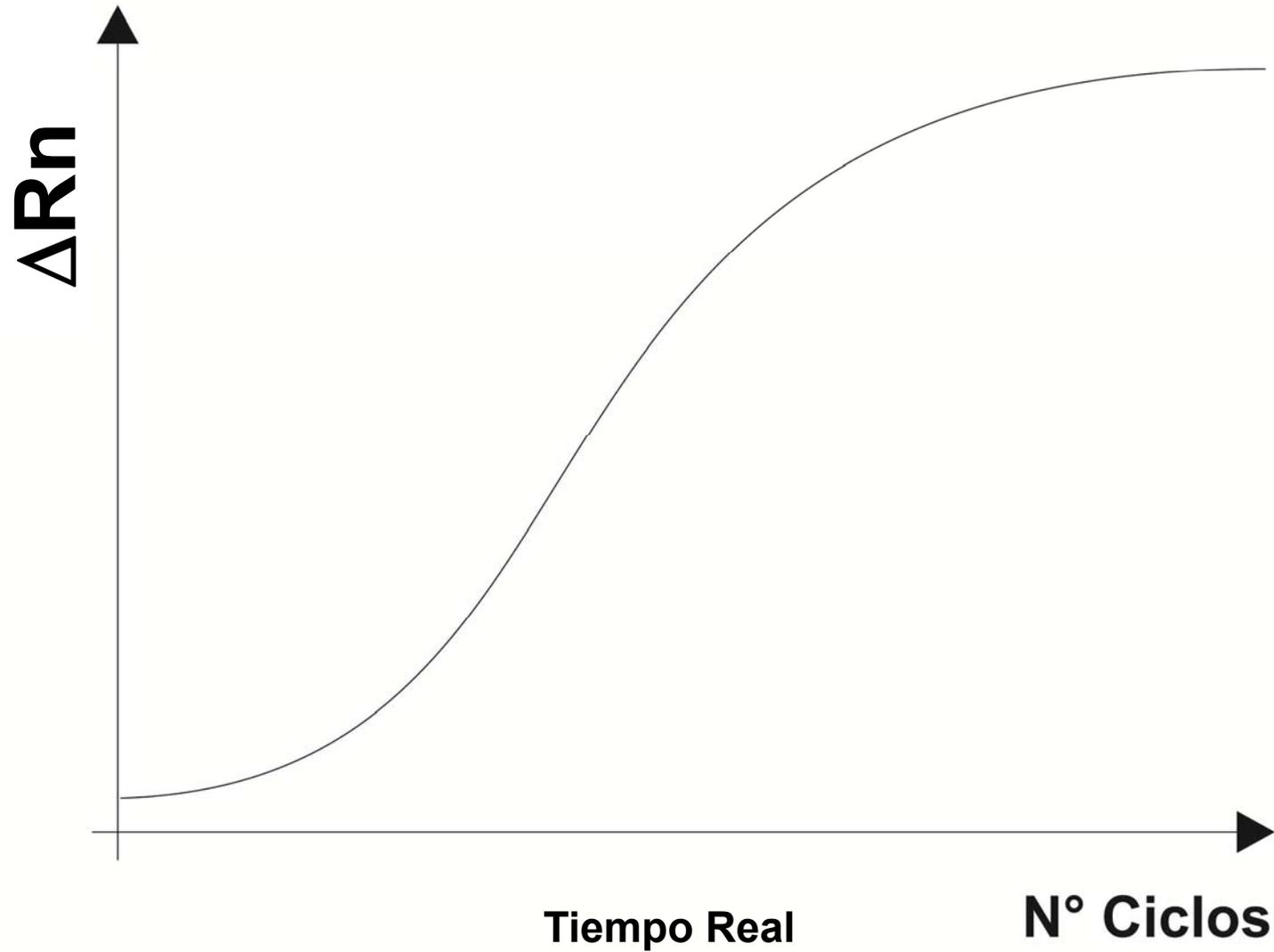
El complejo dsDNA/SyBrGreen...

absorbe a 497 nm (luz azul) y **emite a 520 nm** (luz verde)

PCR en TIEMPO REAL



PCR en TIEMPO REAL



PCR en TIEMPO REAL

ΔR_n



R_n (Normalized Reporter): La intensidad de emisión de fluorescencia de la sustancia indicadora dividida por la intensidad de fluorescencia de una sustancia de referencia pasiva (fluoresceína o rodamina –ROX-).

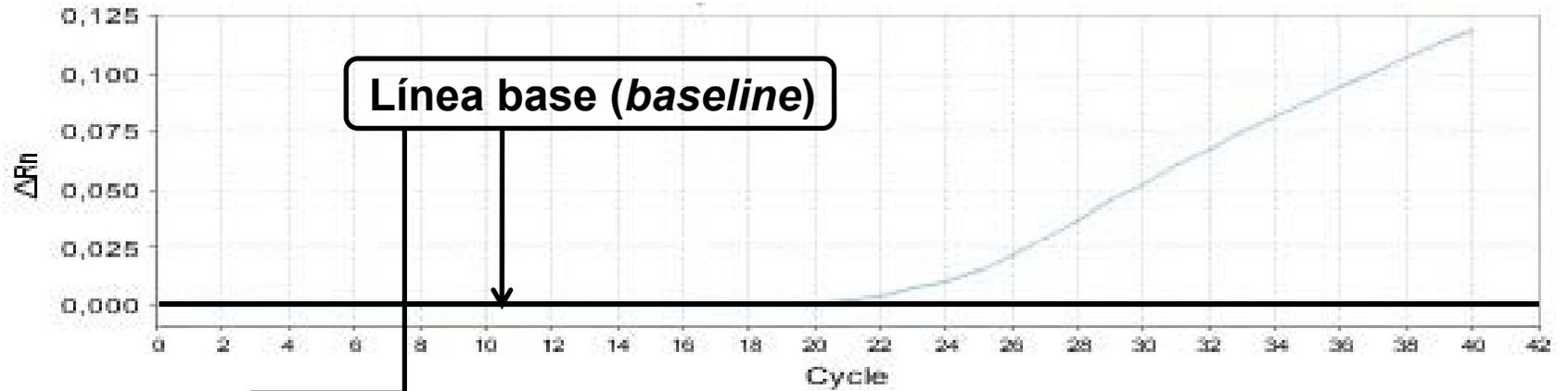
$R_n +$: el valor de R_n de una reacción conteniendo todos los componentes, incluyendo el molde.

$R_n -$: el valor de R_n de una muestra no reactiva. Se determina en los primeros ciclos de la PCR, o de una reacción que no contiene molde.

ΔR_n : Se calcula a partir de $(R_n+) - (R_n-)$

PCR en TIEMPO REAL

Escala lineal

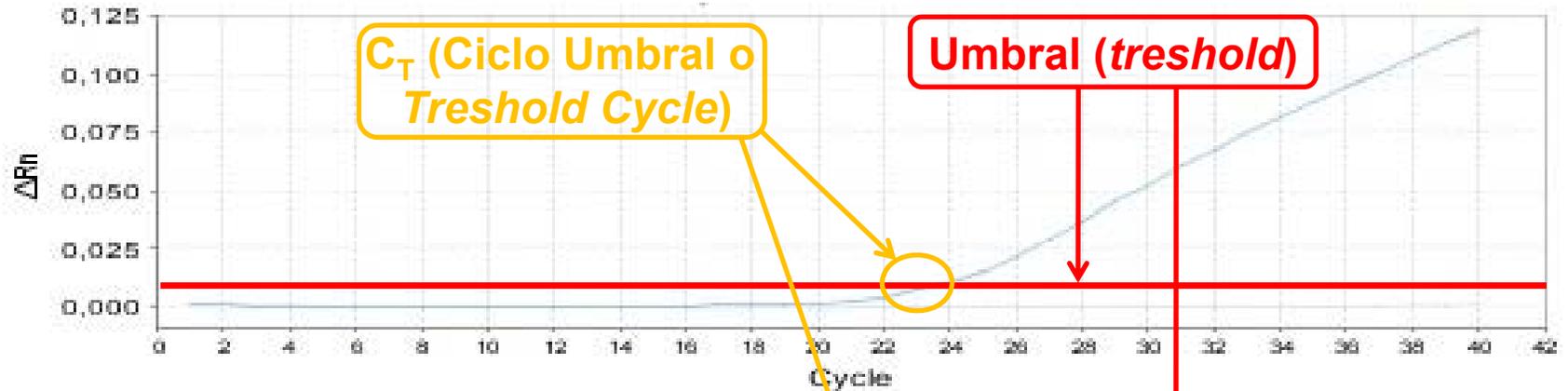


Escala log

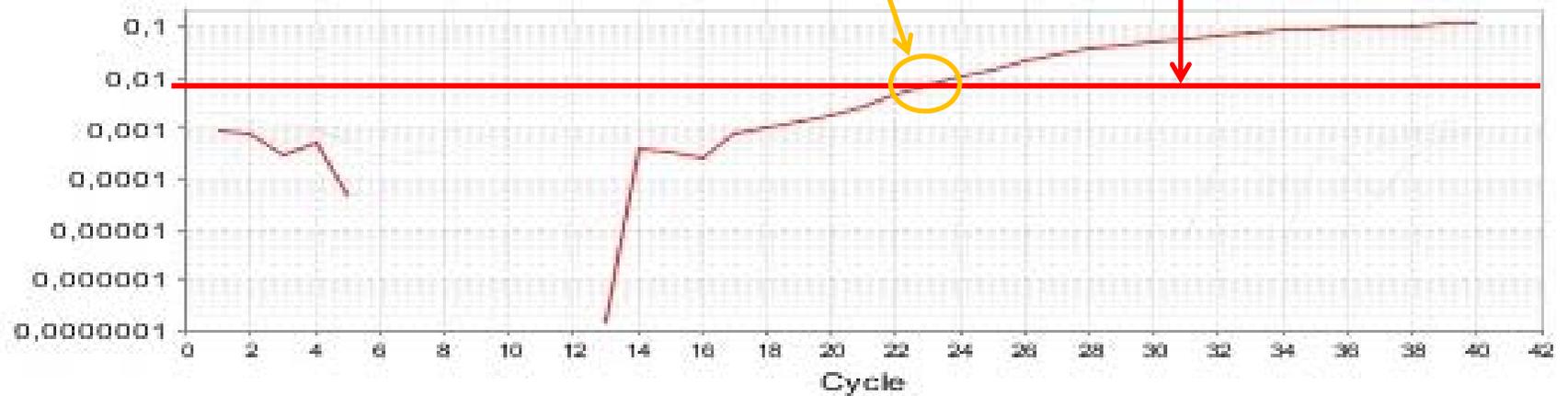


PCR en TIEMPO REAL

Escala lineal



Escala log



PCR en TIEMPO REAL

Línea Base (*Baseline*) → Ciclos iniciales de PCR, donde no hay cambios significativos en la señal de fluorescencia. Determina la fluorescencia basal.

Umbral o *Threshold* → Nivel determinado automática o manualmente en la región exponencial de la curva de amplificación, por encima de la línea base. Determina el nivel de fluorescencia significativamente superior a la fluorescencia basal.

C_T → Ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera el umbral. Se calcula en escala logarítmica, y se emplea para la cuantificación.

PCR en TIEMPO REAL

Etapas en el desarrollo del método diagnóstico:

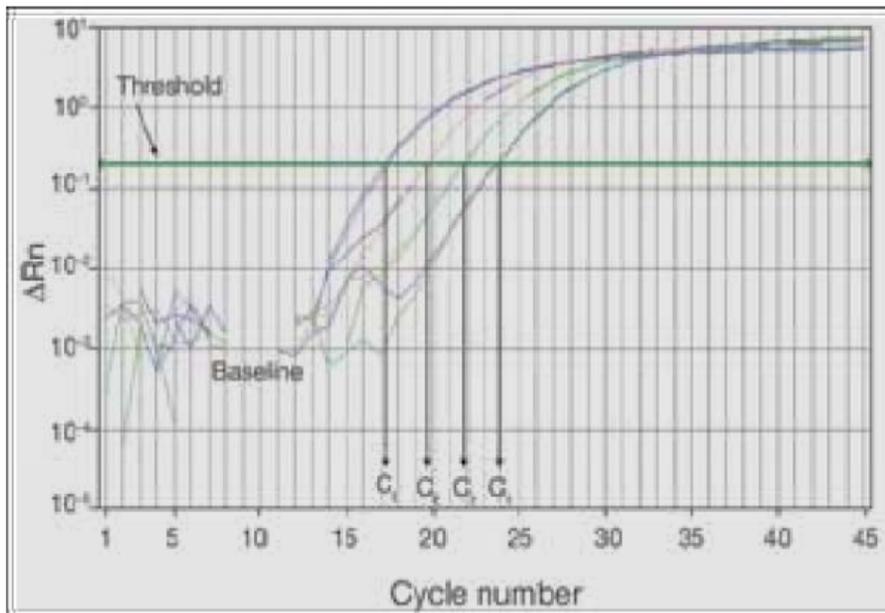


Con el control positivo se deben realizar diluciones seriadas y con ellas, utilizarlas de molde de reacción para estimar los diferentes valores de Ct.

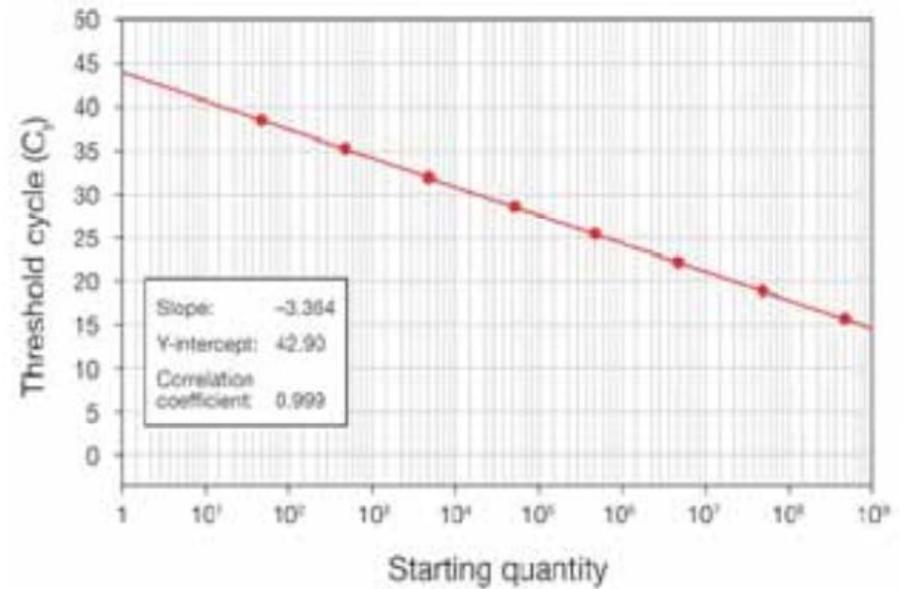
PCR en TIEMPO REAL

- Una vez obtenido el **control positivo**, es necesario realizar una **curva de calibración**.
- Para ello, se utilizan **concentraciones conocidas del control** (mínimo **5 puntos de diluciones 1/10, entre 10^2 y 10^8 moléculas**) y se realiza una **RT-PCR**.
- Luego de determinar los **valores Ct** para **cada muestra**, se **grafica el logaritmo** de la concentración conocida del **DNA control vs** su respectivo **Ct**.
- A partir de lo anterior, se **formula** la ecuación de una **recta**.

PCR en TIEMPO REAL

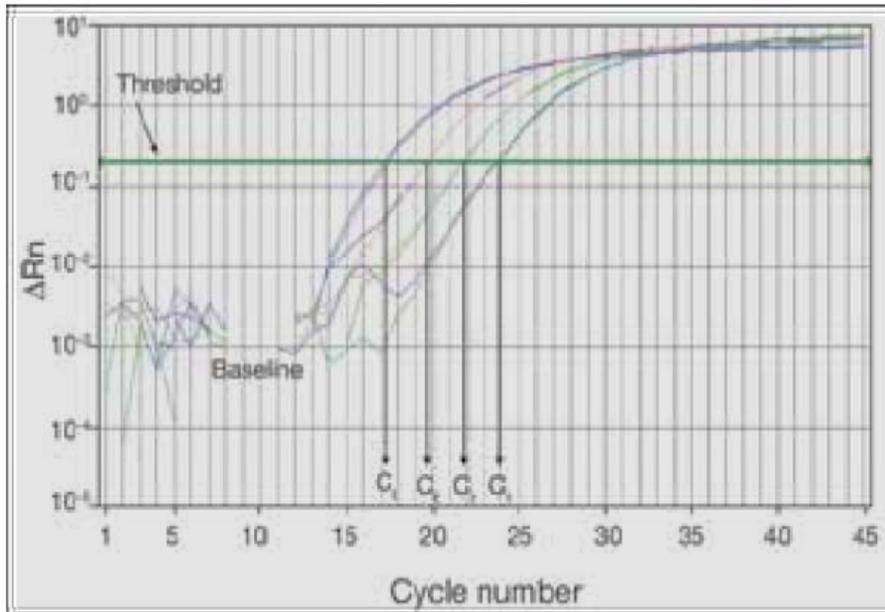


Reacciones con el control

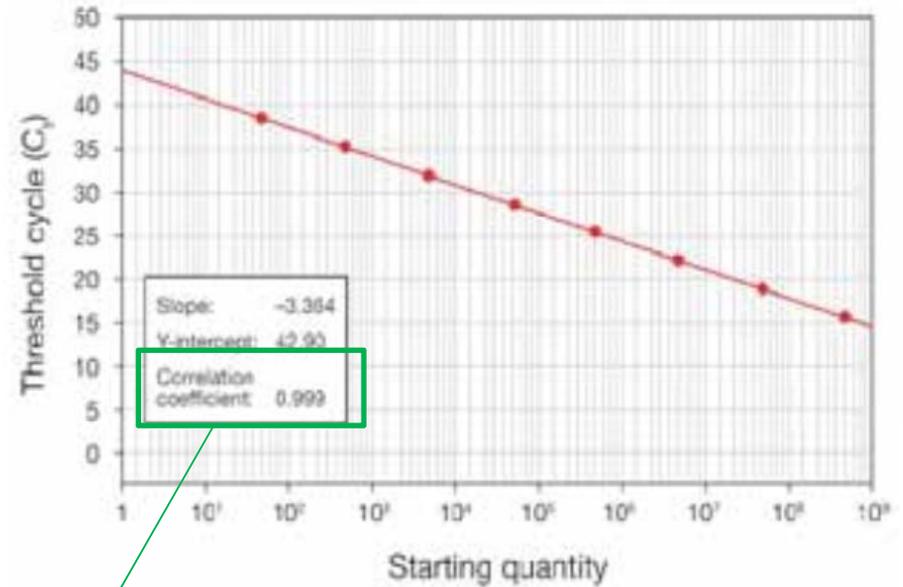


Curva estándar

PCR en TIEMPO REAL



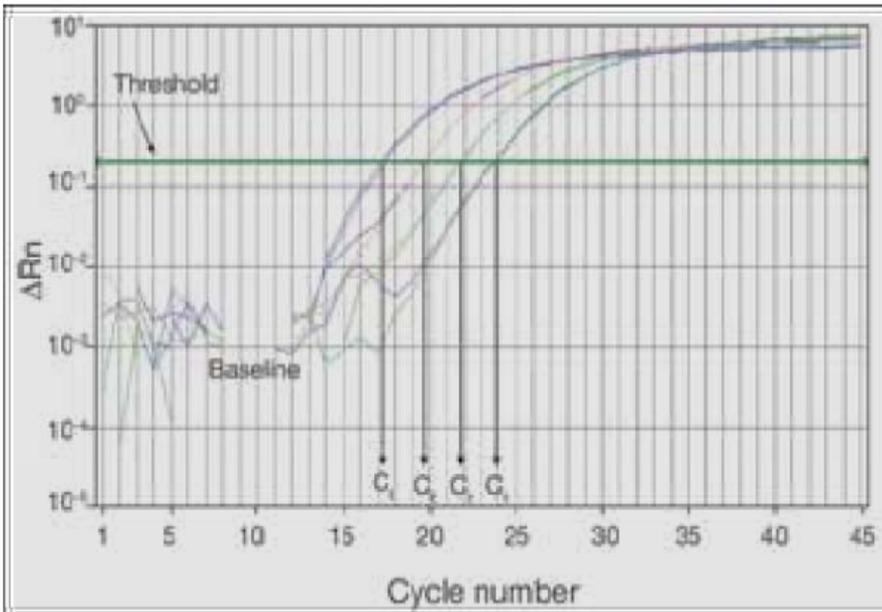
Reacciones con el control



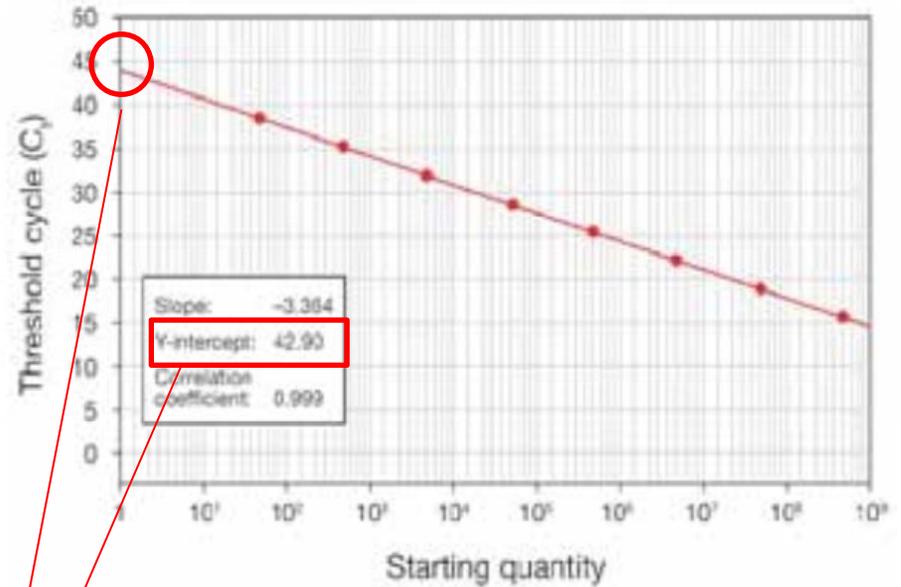
Curva estándar

Coeficiente de correlación

PCR en TIEMPO REAL



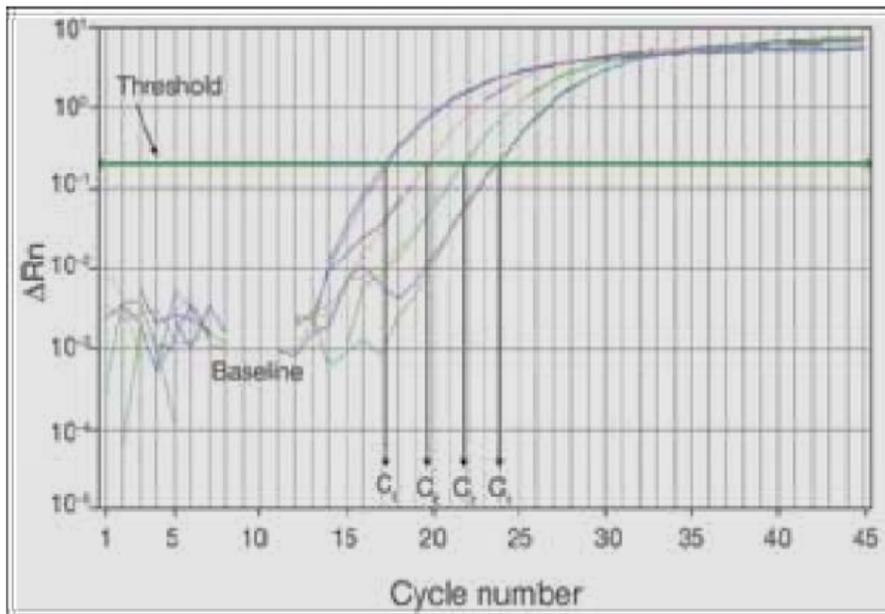
Reacciones con el control



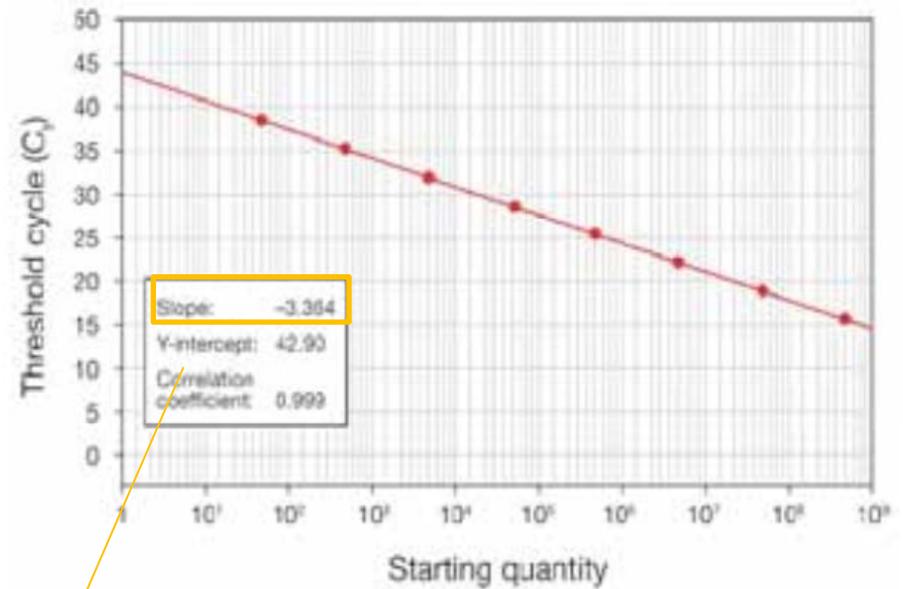
Curva estándar

Límite de detección

PCR en TIEMPO REAL



Reacciones con el control



Curva estándar

La pendiente es una medida de la eficiencia de la reacción Debe ser $> 0,98$

PCR en TIEMPO REAL

- La eficiencia de la reacción se puede estimar a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$



Buena
reacción

Pendiente	Eficiencia
-3,58	90%
-3,32	100%
-3,10	110%

Concentraciones erróneas
reactivos/DNA pol mala
calidad

Situación ideal

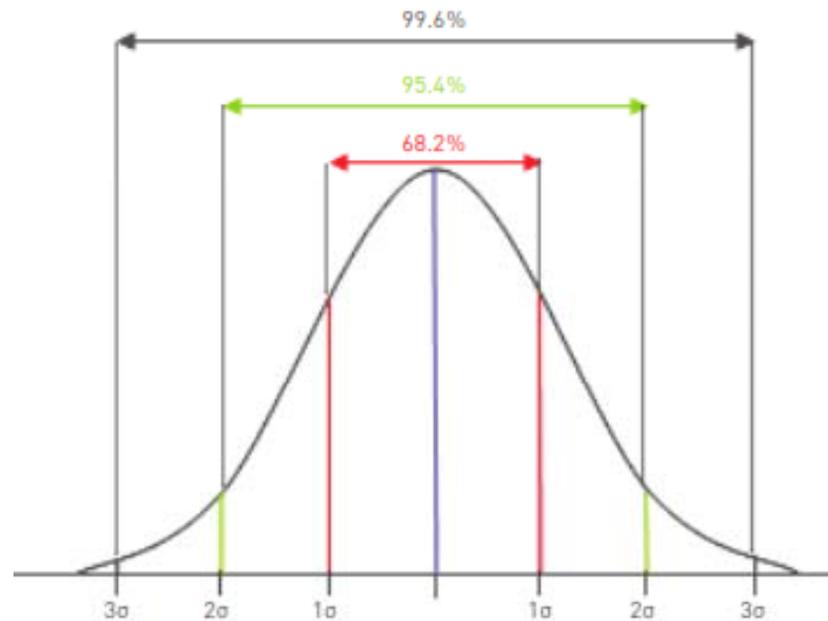
Presencia de inhibidores

PCR en TIEMPO REAL

- Se define como **Rango dinámico** aquel donde un incremento en la concentración de partida resulta en un incremento correspondiente en la amplificación de producto.
- Si el molde es **DNA plasmídico**, el **rango dinámico** debería estar entre **7 y 8 órdenes** de magnitud.
- Si el molde es **genoma** o **cDNA** el **rango dinámico** debería estar entre **3-4 log**.
- Es **importante** realizar, al menos, **tres replicados** por cada muestra que se desea cuantificar.
- Cualquier **dilución** que se prepare (curva o muestras) es recomendable que se realice **en el día del ensayo** y utilizando ***tips* con filtro** y **tubos plásticos de baja afinidad** por los **ácidos nucleicos**.

PCR en TIEMPO REAL

- Cuando la **eficiencia** de la reacción es **100%**, las diferencias de Ct o ΔCt entre una misma muestra **diluida** $\frac{1}{2}$ debería ser **1** (si las diluciones son $\frac{1}{4}$ el ΔCt debería ser 2; y si fueran $\frac{1}{10}$, el ΔCt sería 3,33).



Distribución normal de las medidas

PCR en TIEMPO REAL

- Algunas recomendaciones...

Factors	Recommendations	Criteria
Efficiency	Serial dilution with 5-log dilutions	Slope: ~ -3.3 $R^2 > 0.99$
Precision	Minimum of 3 replicates	Standard deviation <0.167
Sensitivity	High replicate number of reactions for low copy number sample input due to Poisson distribution	Statistical test analysis

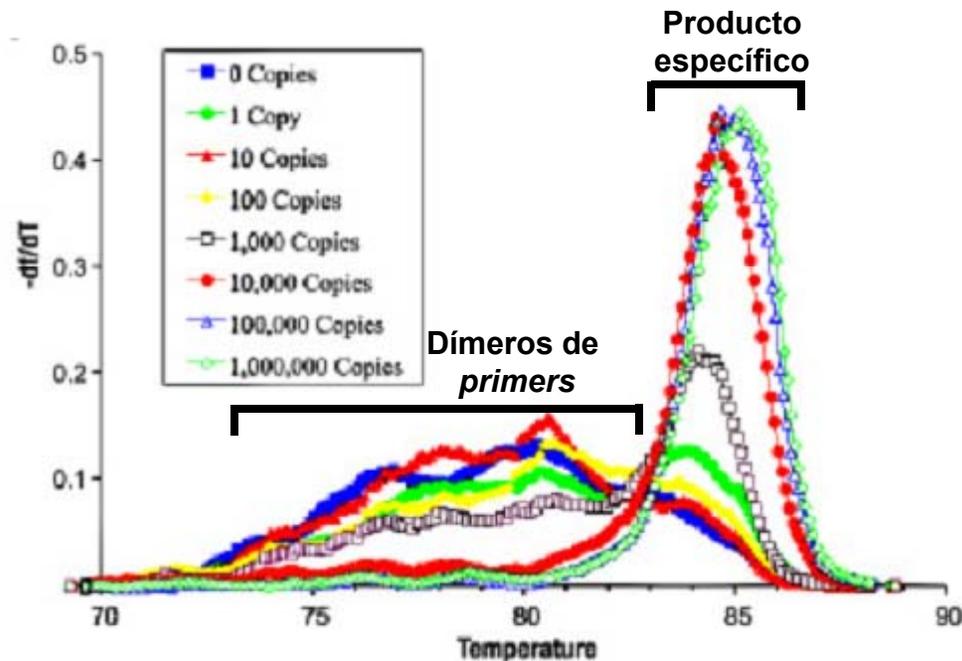
PCR en TIEMPO REAL

- La **Real Time PCR** basada en **SyBr Green** tiene la **ventaja** que es muy **sensible** y relativamente **económica**, y detecta cualquier dsDNA.
- La principal **desventaja** es que el **SyBr Green** puede unirse a cualquier dsDNA, incluyendo **dímeros de primers** y **productos inespecíficos**.

PCR en TIEMPO REAL

Confirmación de especificidad del producto

- Análisis de los resultados → Curva de desnaturalización (“*melting curve*”)
- Reacción final → se calienta desde 50°C hasta 95°C
- Monitoreo de la fluorescencia
- Desnaturalización del dsDNA → caída drástica de la fluorescencia
- Gráfico: $-(dF/dT)$ vs T → diferentes picos = diferentes productos



PCR en TIEMPO REAL

*¿Existen métodos de **Real Time PCR** más específicos?*

PCR en TIEMPO REAL

Con sondas



Empleo de sondas marcadas con **fluoróforos** y **quenchers**

Molécula (**F**) que absorbe energía y pasa a un estado excitado (**F***) → Al volver a **F** emite el exceso de energía → **Fluorescencia**

Moléculas (**Q**) que aceptan la energía de **F*** → Disipan esta energía → Calor o fluorescencia

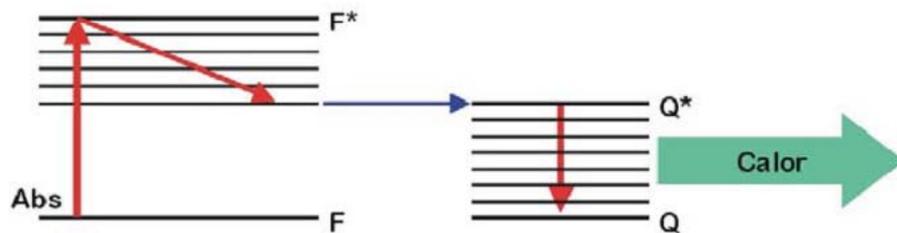
PCR en TIEMPO REAL

Con sondas

Dos mecanismos de actuación

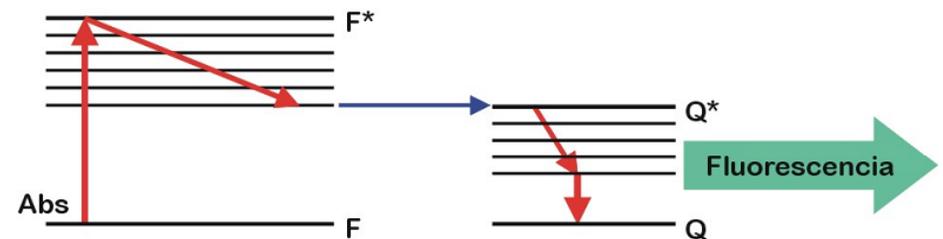
Quenching

Quenching colisional



F: en contacto o muy próximo al **Q** → transferencia de energía a **Q** → disipación en forma de calor

Quenching FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*)



F: transferencia de energía a **Q** → disipación en forma de fluorescencia de mayor longitud de onda (menor energía) → dependiente de la distancia entre **F** y **Q**

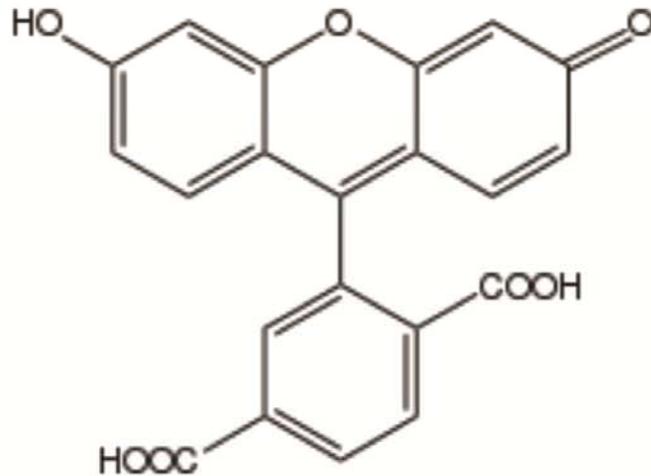
PCR en TIEMPO REAL

Con sondas

Fluoróforos

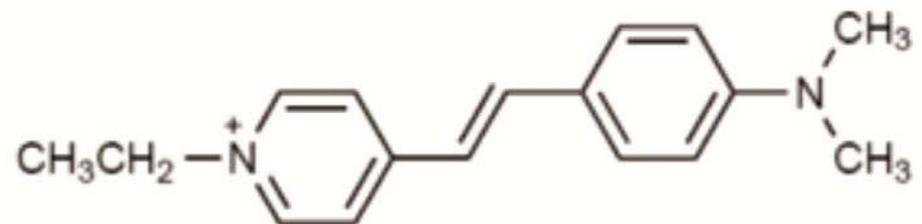
Moléculas químicas con la capacidad de absorber energía en una λ_1 y emite en otra λ_2 ($\lambda_2 > \lambda_1$)

A.



6-FAM

B.



Cy5

PCR en TIEMPO REAL

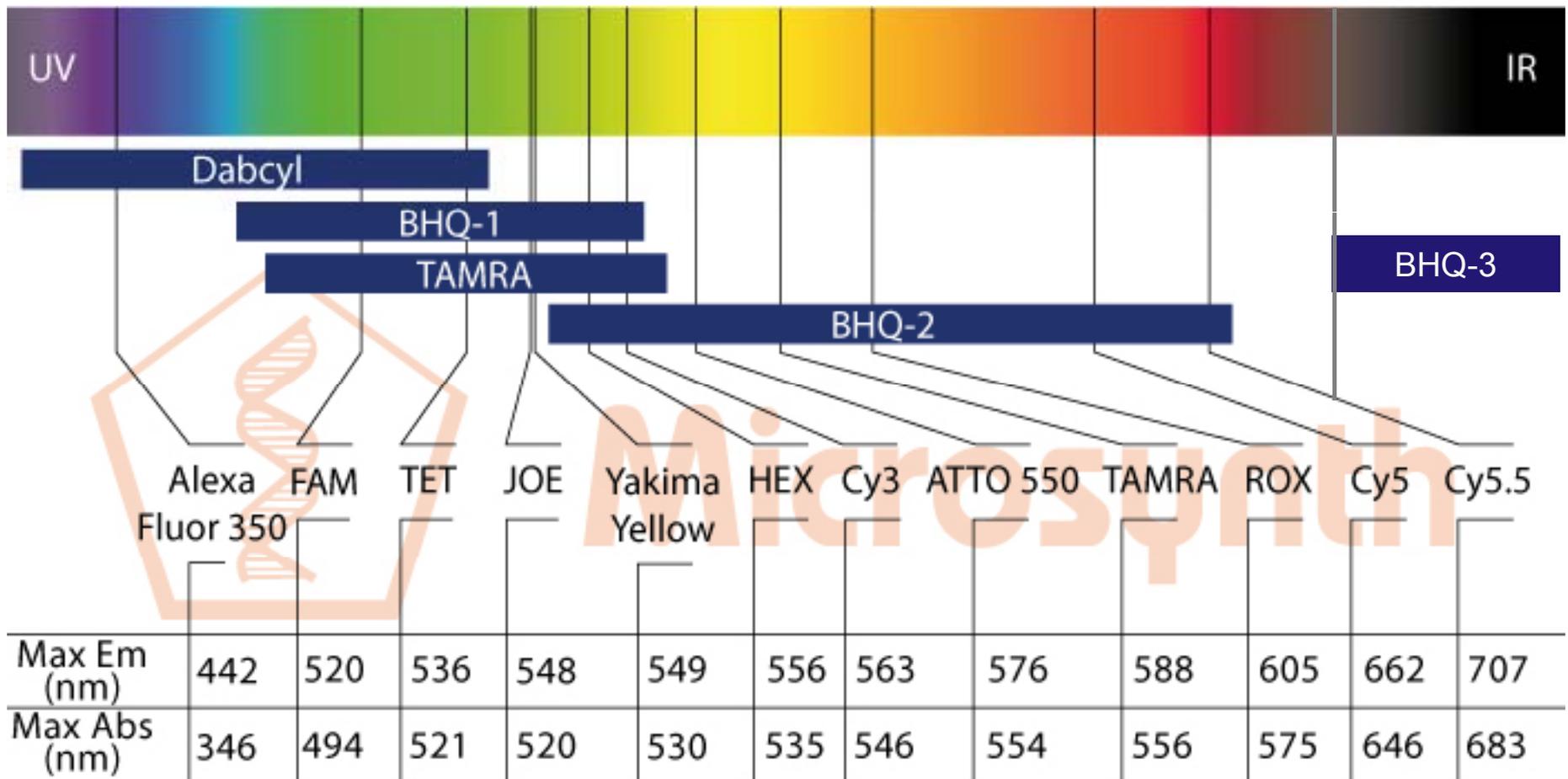
Con sondas

Nombre	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Fluoróforos		
FAM	492	515
TET	521	536
JOE	527	548
HEX	535	556
TAMRA	555	580
ROX	575	602
Cy3	552	565
Cy3.5	581	596
Cy5	651	674
Cy5.5	675	694
Cy7	743	767
R6G	518	543
Texas Red	583	603
VIC	528	546

Los *quenchers* deben cubrir este espacio del espectro para absorber la emisión

PCR en TIEMPO REAL

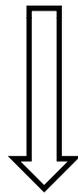
Con sondas



PCR en TIEMPO REAL

El método más utilizado es el de las sondas TaqMan

En 1991 *Cetus Corporation* reportó el diseño → Roche y *Applied Biosystems*

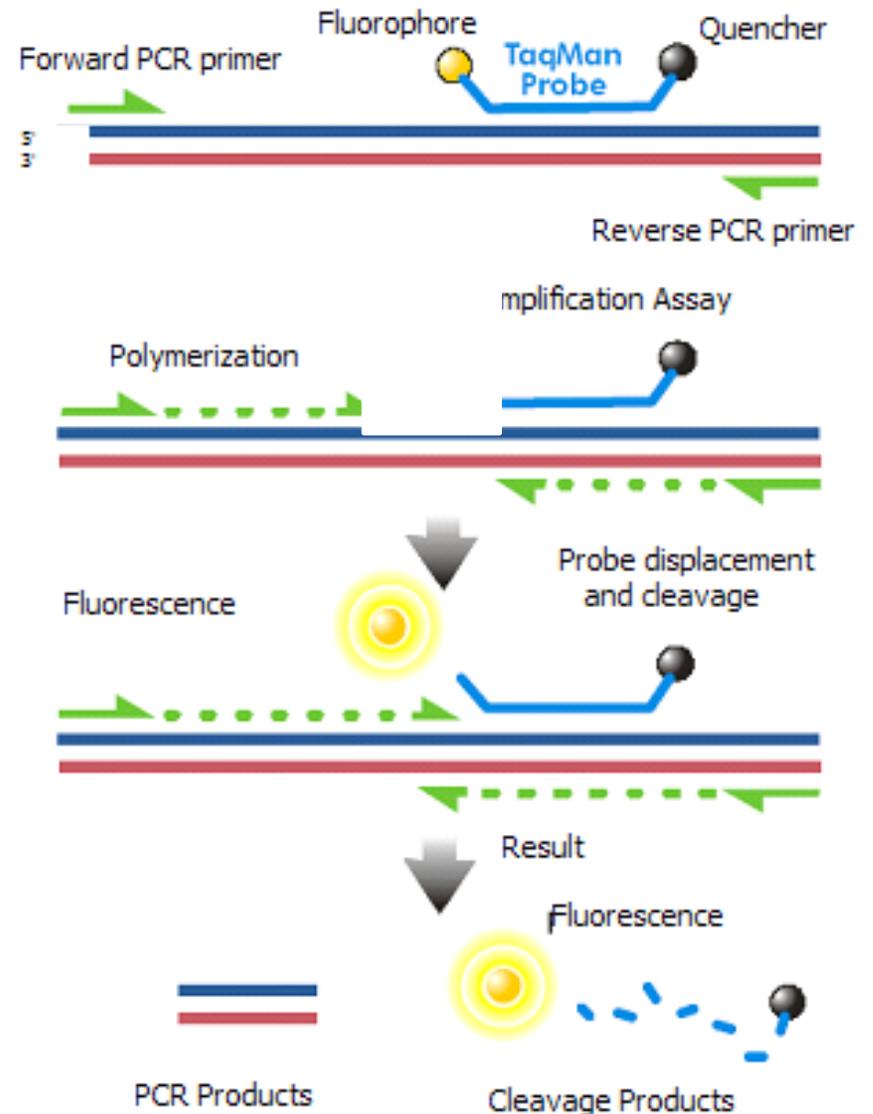


Están constituidas por un fluoróforo covalentemente unido al extremo 5' de un oligonucleótido y un *quencher* en el extremo 3' → **Quenching**

FRET

Las sondas tienen entre 13 y 18 nt

TaqMan (de Taq polimerasa + Pac Man)



PCR en TIEMPO REAL

Tipos de sondas aplicables en qPCR



- *Taqman probes (con TAMRA como quencher)*
 - *Taqman MGB*
 - *Molecular Beacons*
 - *Scorpions*
 - *Eclipse*
 - *Amplifluor*
 - *De doble hibridación.*
- Más utilizadas
- 

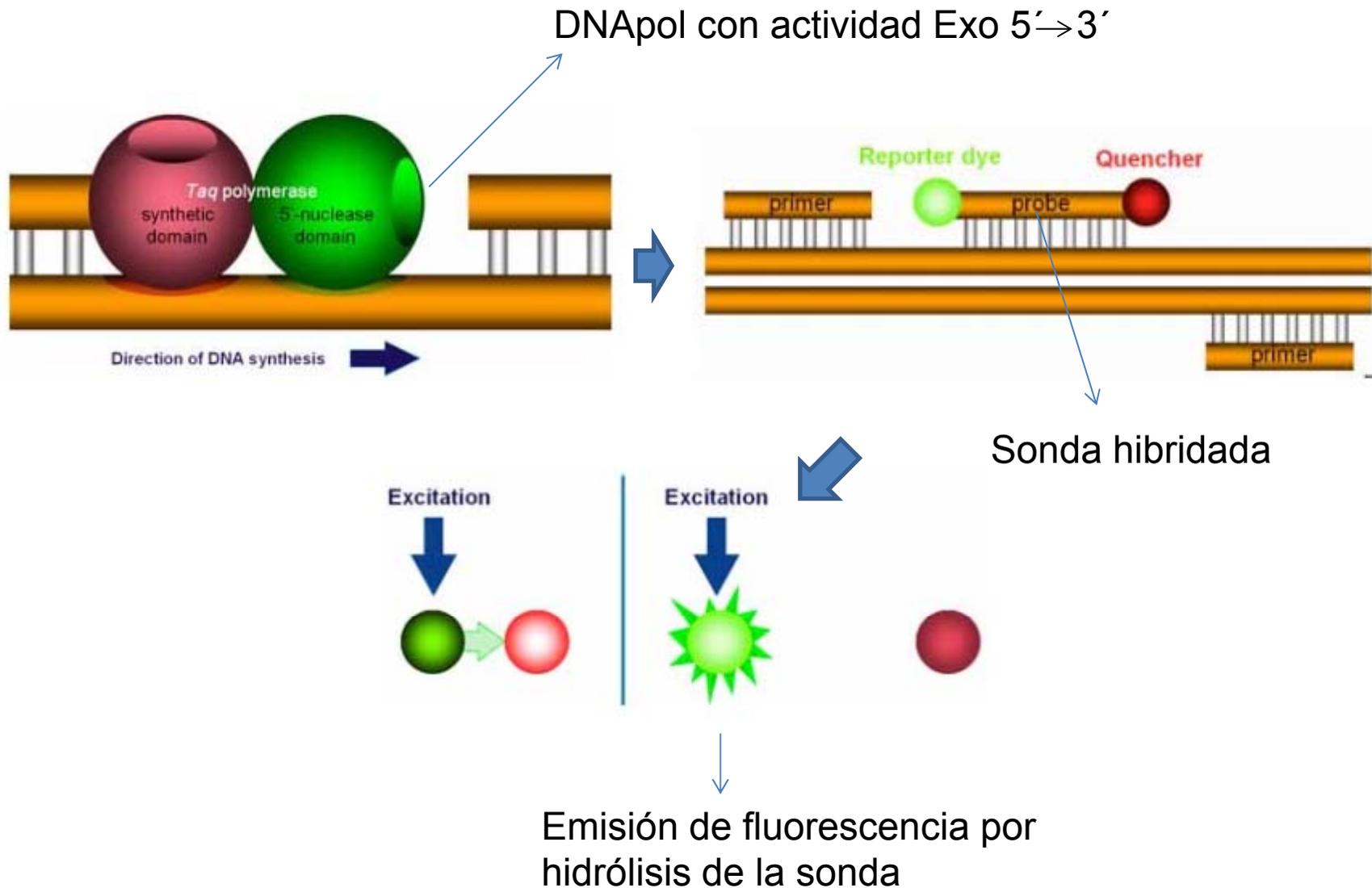
PCR en TIEMPO REAL

Tipos de sondas aplicables en qPCR



- *Taqman probes (con TAMRA como quencher)*
- *Taqman MGB*
- *Molecular Beacons*
- *Scorpions*
- *Eclipse*
- *Amplifluor*
- *De doble hibridación.*

PCR en TIEMPO REAL



PCR en TIEMPO REAL

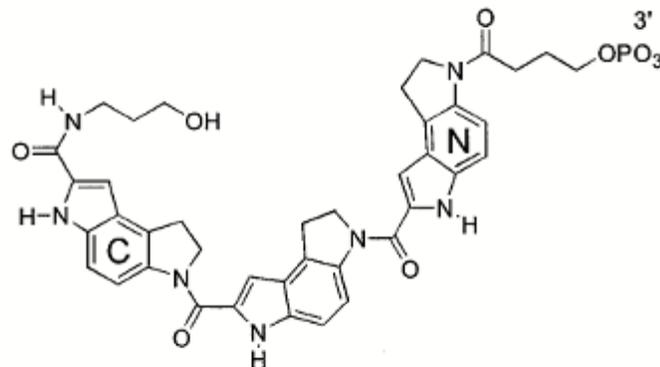
Tipos de sondas aplicables en qPCR



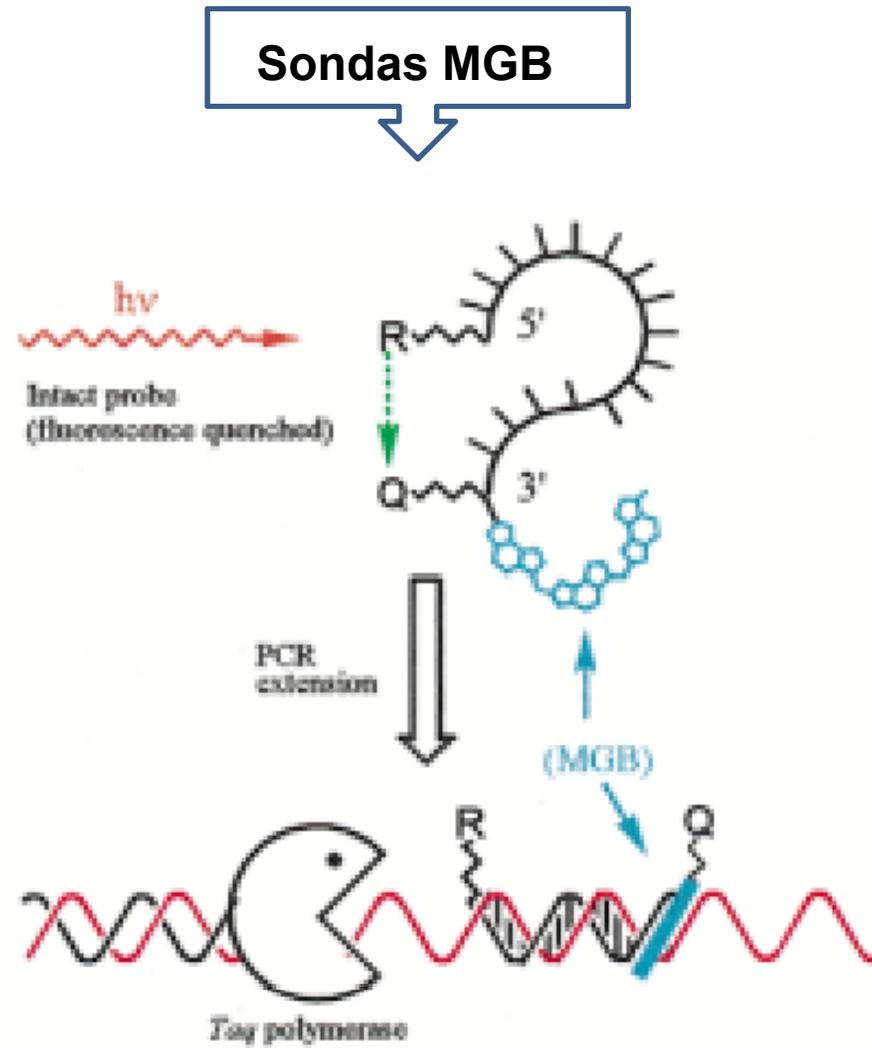
- *Taqman probes (con TAMRA como quencher)*
- ***Taqman MGB***
- *Molecular Beacons*
- *Scorpions*
- *Eclipse*
- *Amplifluor*
- *De doble hibridación.*

PCR en TIEMPO REAL

- Las sondas TaqMan MGB (*Minor Groove Binding*) forman **híper-estables dúplex** con un **ssDNA complementario** (molde).
- Esto lo logran porque **poseen un tripéptido dihidrociclopirroloindol (DPI₃)**, grupo que se asocia a la curva menor del DNA B estabilizado por fuerzas de *van der Waals*.
- Esto permite realizar sondas más pequeñas que las comunes (13 nt) y sin la necesidad de tener 8-10°C de T_m mayores a la de los *primers*..



PCR en TIEMPO REAL



PCR en TIEMPO REAL

Tipos de sondas aplicables en qPCR

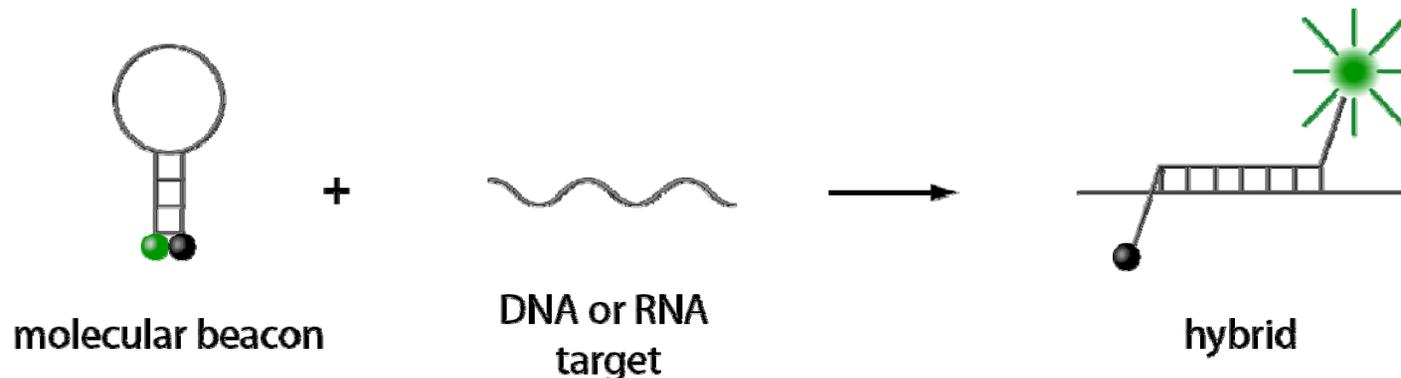


- *Taqman probes (con TAMRA como quencher)*
- *Taqman MGB*
- ***Molecular Beacons***
- *Scorpions*
- *Eclipse*
- *Amplifluor*
- *De doble hibridación.*

PCR en TIEMPO REAL

Molecular beacons

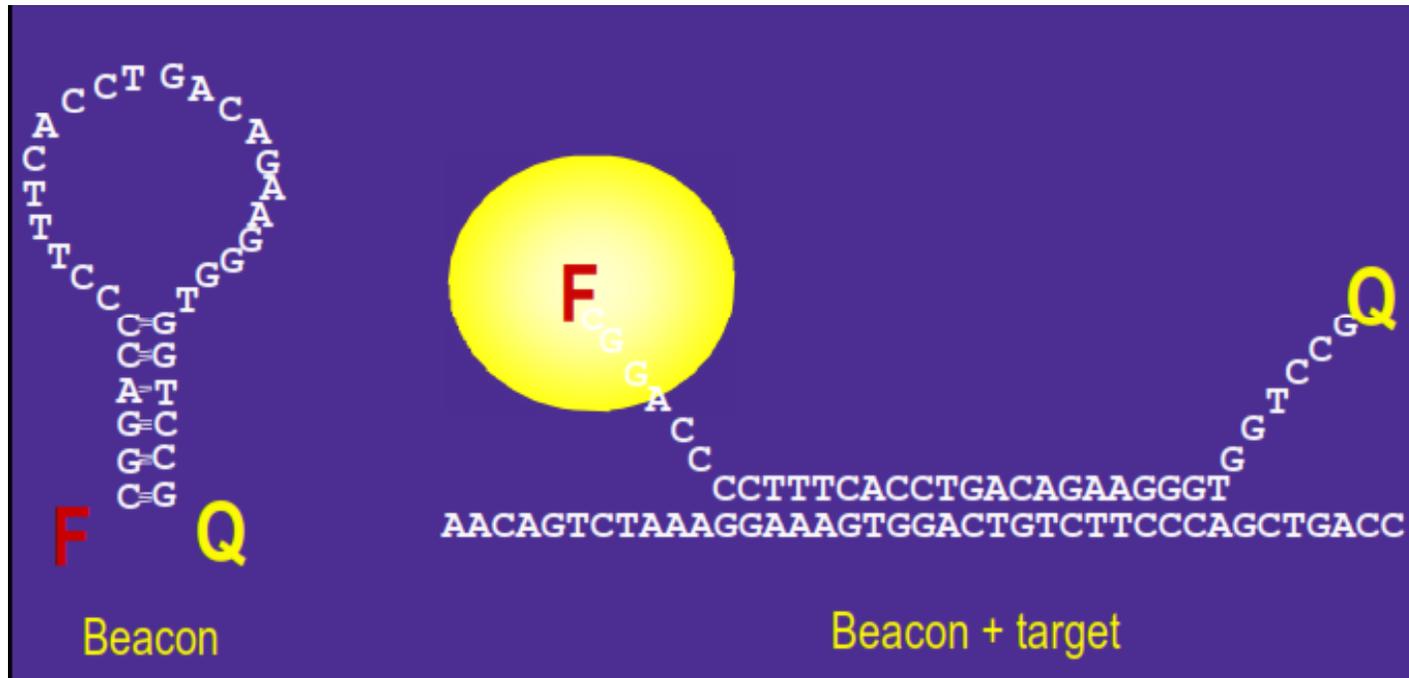
- Son sondas de **DNA** con estructura de **stem loop**.
- El **loop** contiene una **secuencia complementaria** con el molde (alrededor de 15 nt) y un **stem** de 5-6 pb.
- En los **extremos** del DNA se encuentra un **Reporter** y un **Quencher**.



Mecanismo intermolecular - *Quenching* colisional

PCR en TIEMPO REAL

Molecular beacons



PCR en TIEMPO REAL

Tipos de sondas aplicables en qPCR

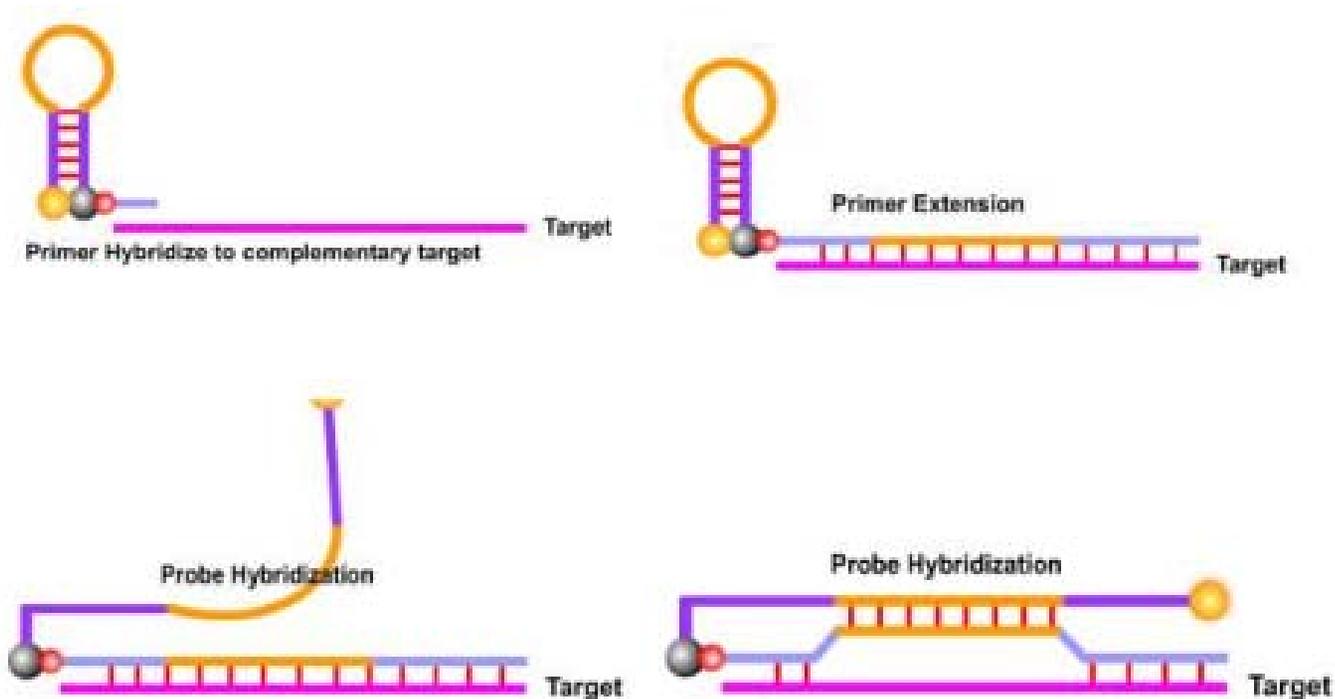


- *Taqman probes (con TAMRA como quencher)*
- *Taqman MGB*
- *Molecular Beacons*
- ***Scorpions***
- *Eclipse*
- *Amplifluor*
- *De doble hibridación.*

PCR en TIEMPO REAL

Scorpions

- *Scorpions* son sondas unidas a *primer* (elementos bifuncionales).

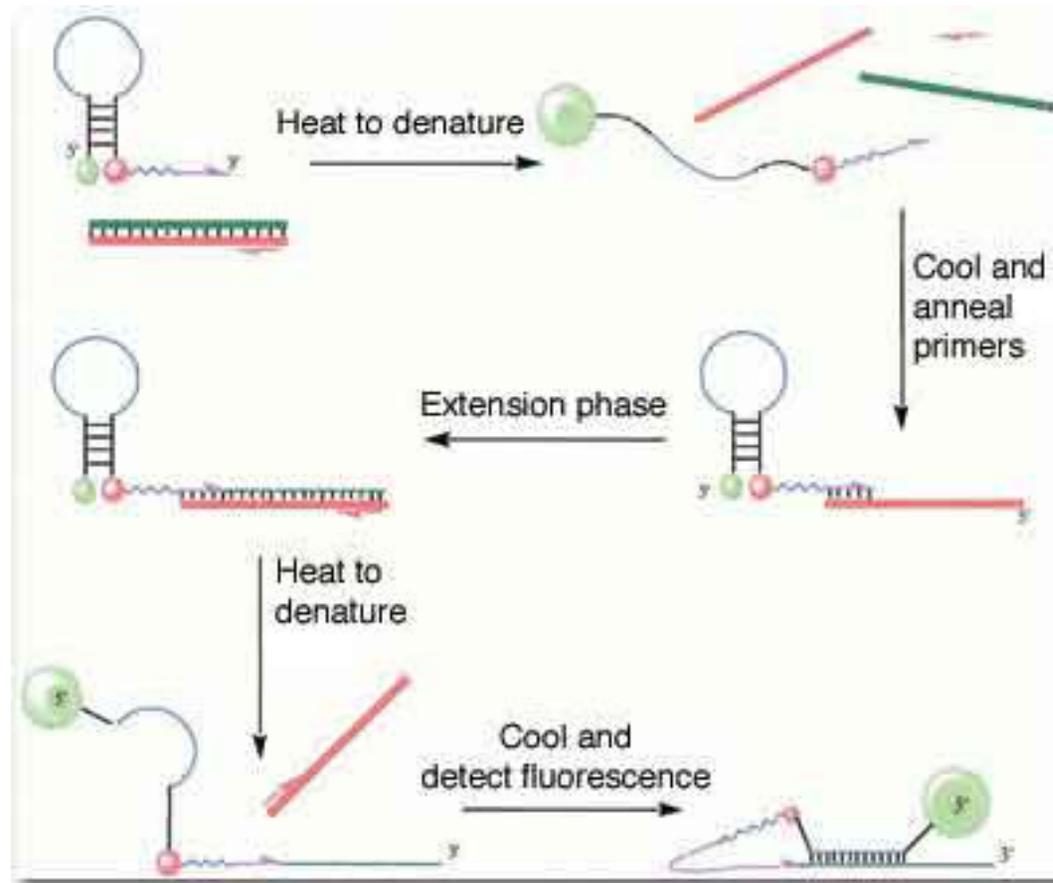


Mecanismo intermolecular - *Quenching* colisional

PCR en TIEMPO REAL

Scorpions

- *Scorpions* son sondas unidas a *primer*.

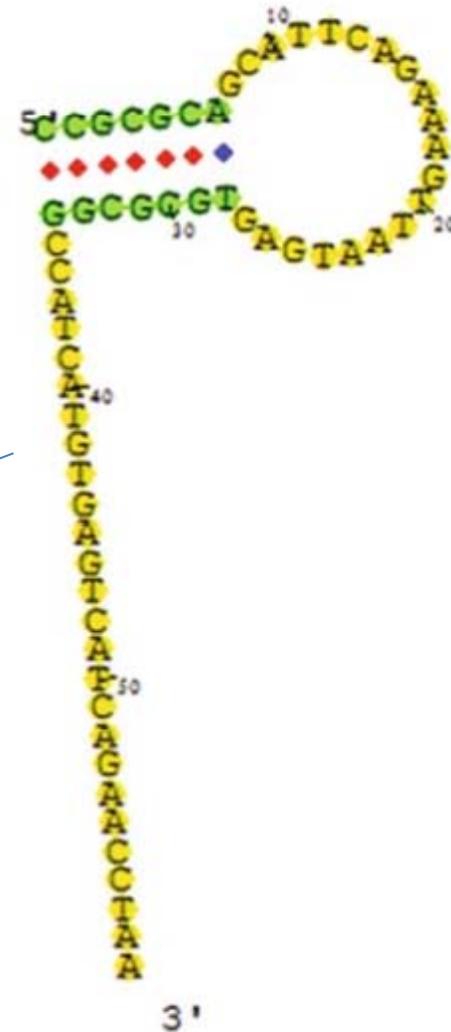


PCR en TIEMPO REAL

Scorpions

- *Scorpions* son sondas unidas a *primer*.

Ejemplo de secuencia de una sonda *Scorpions* (faltan el blocker group y los colorantes)



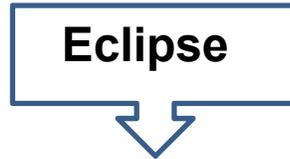
PCR en TIEMPO REAL

Tipos de sondas aplicables en qPCR



- *Taqman probes (con TAMRA como quencher)*
- *Taqman MGB*
- *Molecular Beacons*
- *Scorpions*
- ***Eclipse***
- *Amplifluor*
- *De doble hibridación.*

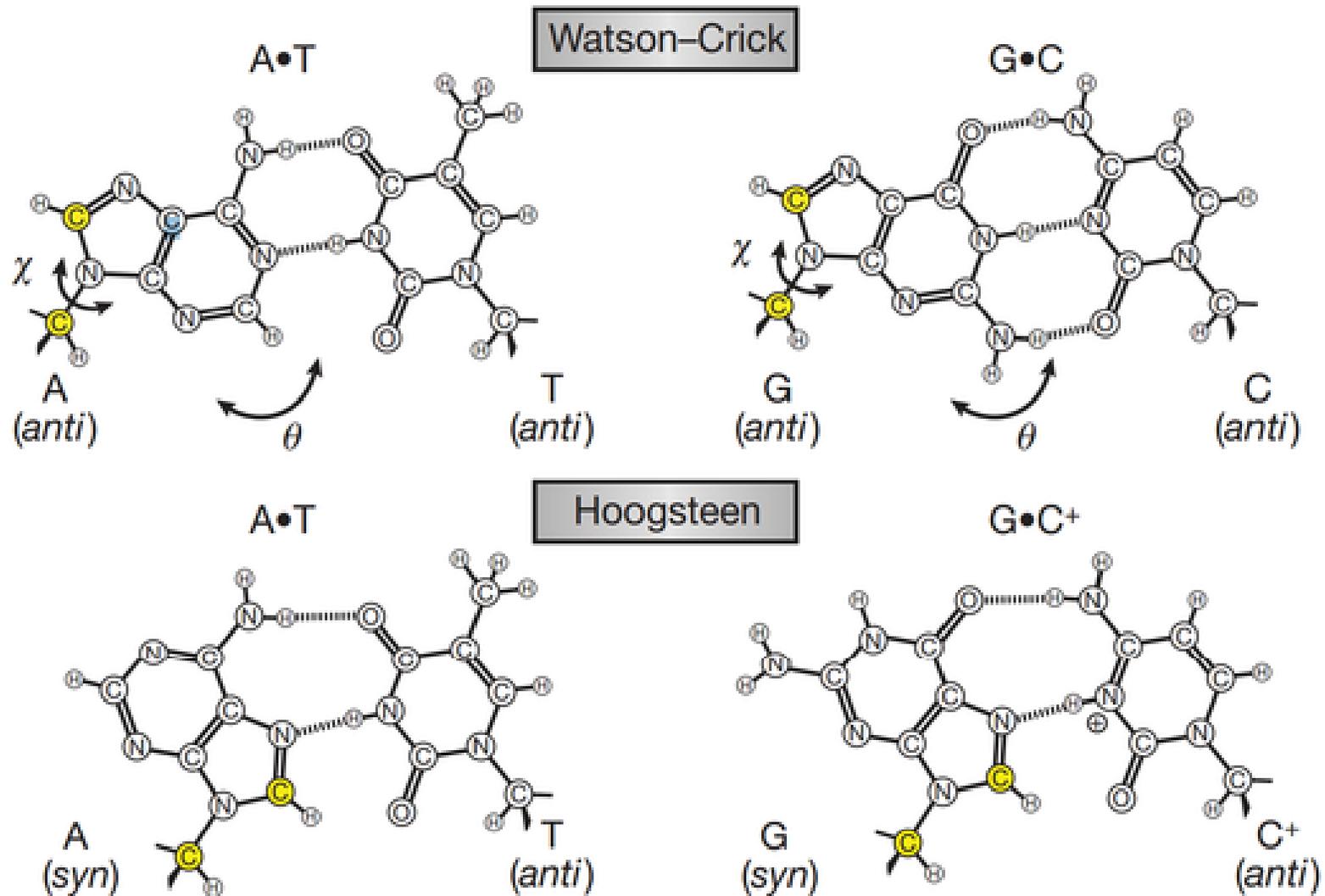
PCR en TIEMPO REAL



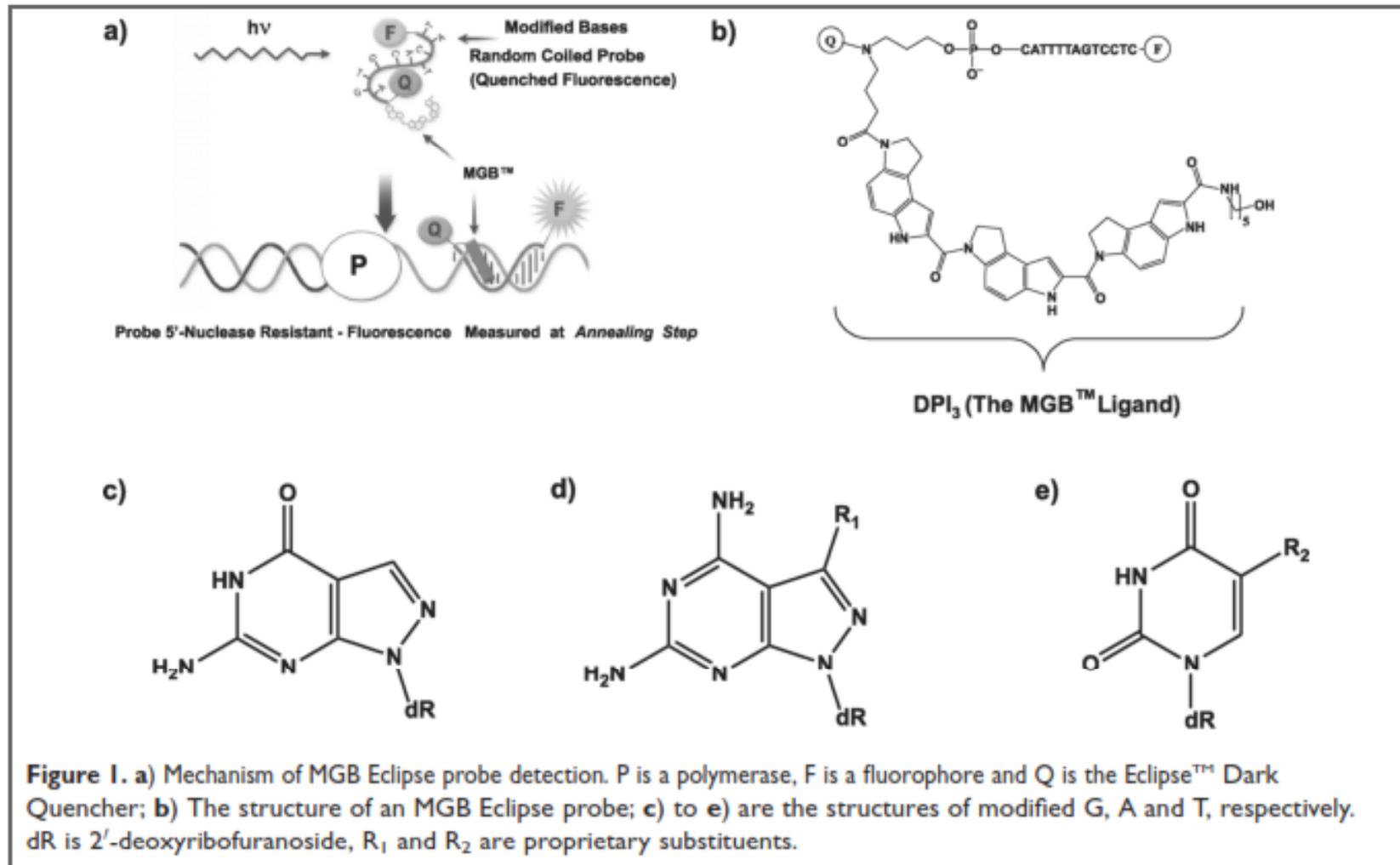
- Las sondas **Eclipse** poseen un **grupo MGB** en el **extremo 5'**.
- A su vez, **poseen** nucleótidos con **bases nitrogenadas modificadas** (Super A, Super T, Super G y Super C).
- Estos nucleótidos generan un **dúplex más estable** y unido por puentes de hidrógeno típicos de la **interacción Watson y Crick**.
- De este modo, se **evitan interacciones** del tipo **Hoogsteen**, las cuales son habituales en regiones ricas en GC.

PCR en TIEMPO REAL

a

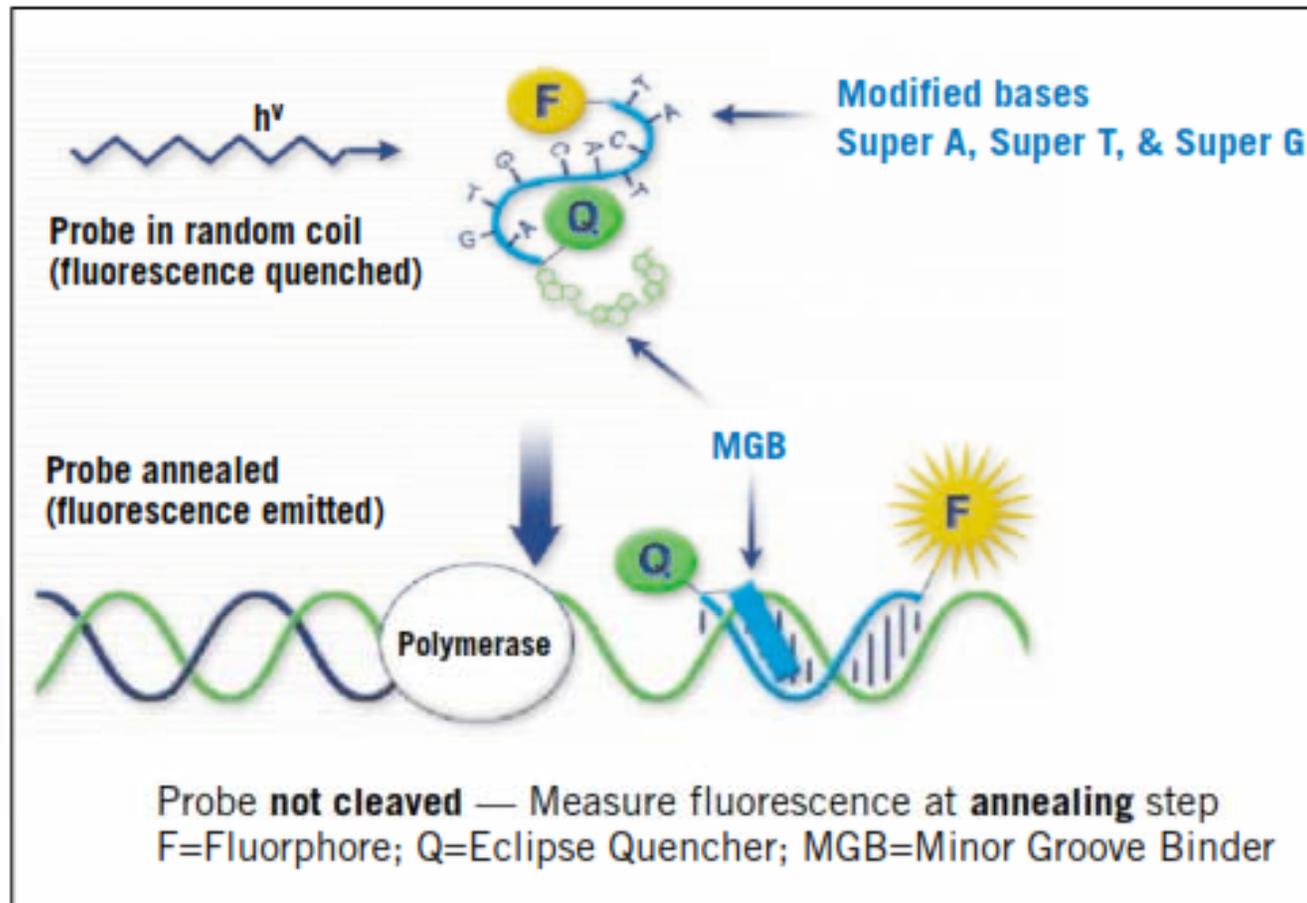


PCR en TIEMPO REAL



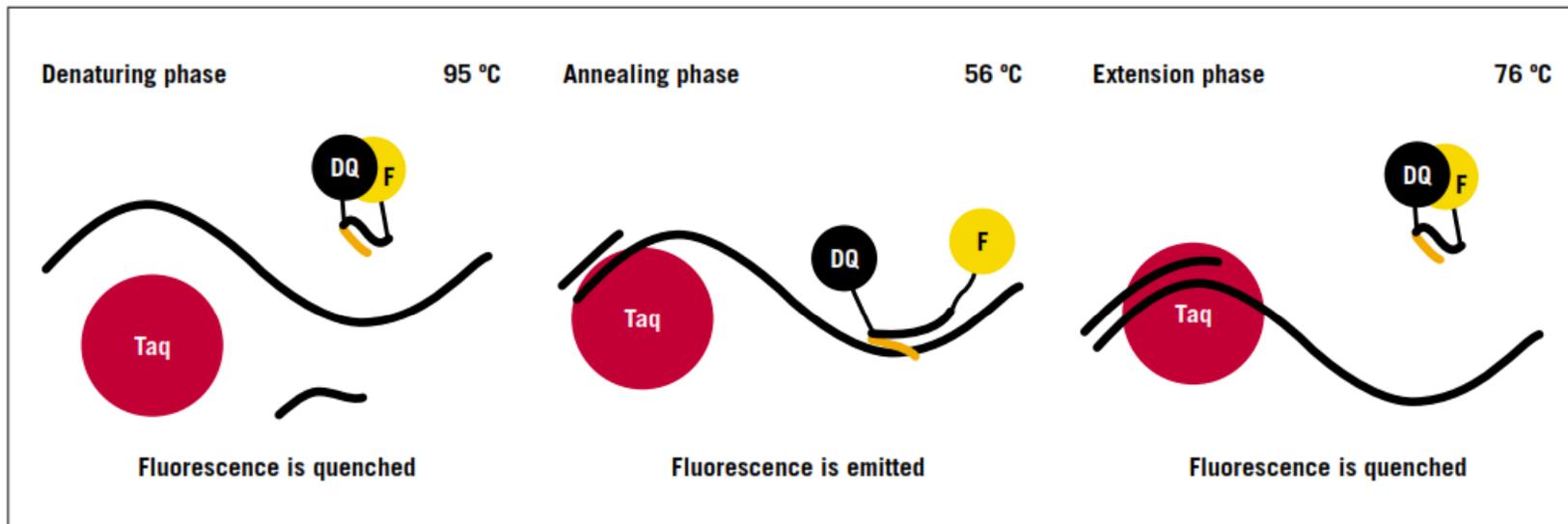
PCR en TIEMPO REAL

Eclipse



PCR en TIEMPO REAL

Eclipse



PCR en TIEMPO REAL

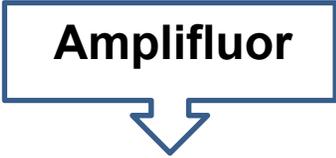
Tipos de sondas aplicables en qPCR



- *Taqman probes (con TAMRA como quencher)*
- *Taqman MGB*
- *Molecular Beacons*
- *Scorpions*
- *Eclipse*
- ***Amplifluor***
- *De doble hibridación.*

PCR en TIEMPO REAL

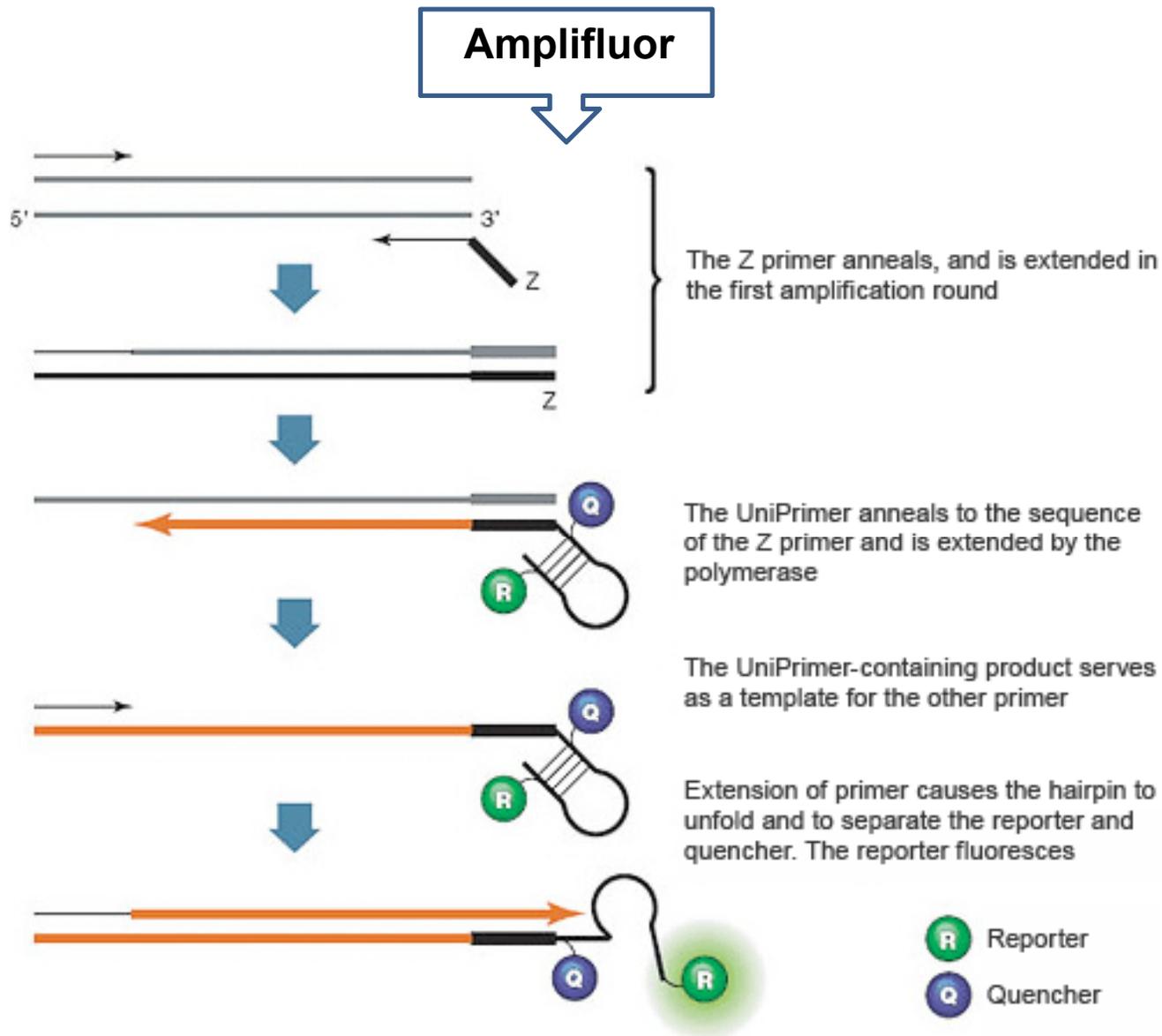
Amplifluor



- Esta estrategia se basa en la utilización de **dos primers específicos** y un **tercero** denominado **Universal DNA primer (Uniprimer)**.
- **Uno** de los dos **primers específicos (primer Z)** introduce un **DNA** no presente en el molde (extremo 5´ del primer).
- El **UniPrimer hibrida** en su extremo 3´ en la **secuencia introducida** por el Primer Z.
- El **Uniprimer** posee una estructura de **hairpin** y la **presencia** de los **colorantes**.

Mecanismo intermolecular - *Quenching* colisional

PCR en TIEMPO REAL



PCR en TIEMPO REAL

Tipos de sondas aplicables en qPCR



- *Taqman probes (con TAMRA como quencher)*
- *Taqman MGB*
- *Molecular Beacons*
- *Scorpions*
- *Eclipse*
- *Amplifluor*
- ***De doble hibridación.***

PCR en TIEMPO REAL

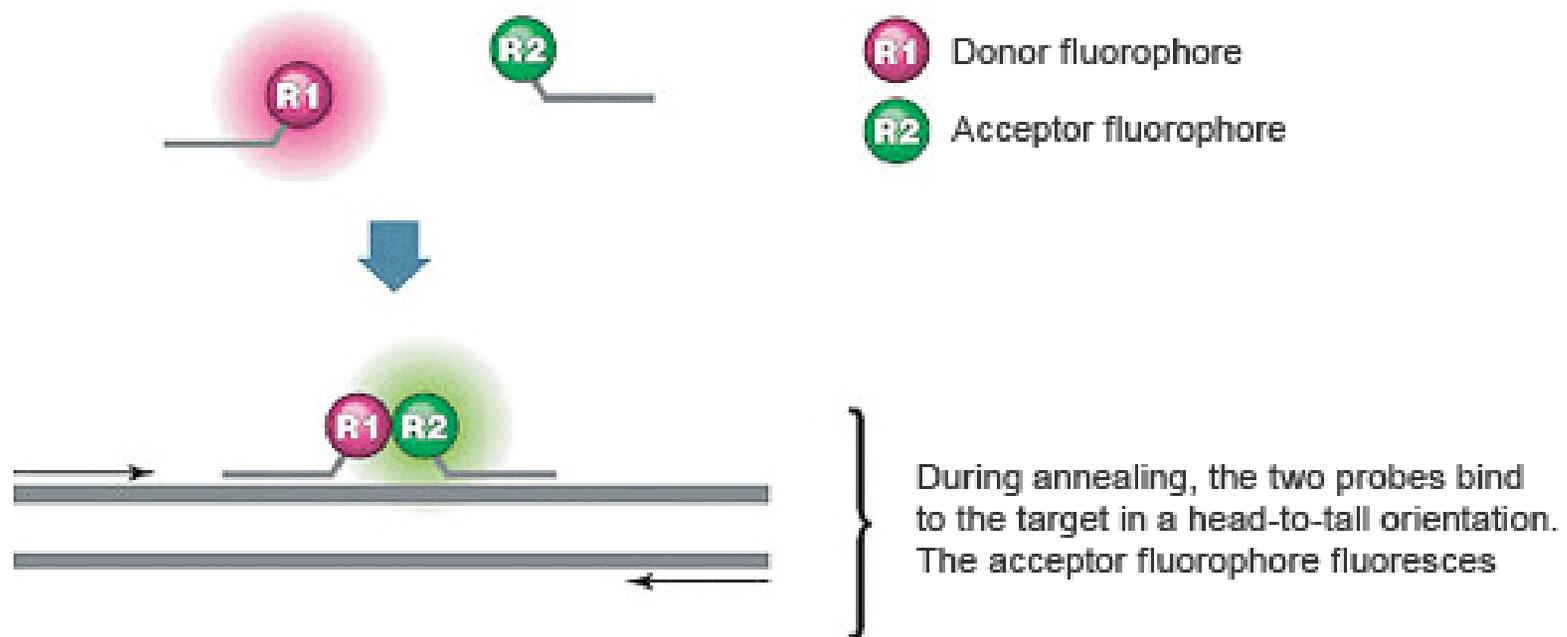
De doble hibridación



- Esta estrategia se basa en la utilización de **dos primers específicos** y otros **dos oligonucleótidos marcados** (dos sondas) que hibridan contiguos en el DNA a ser amplificado.
- Una **sonda** posee un **fluoróforo Donor** y la **otra un fluoróforo aceptor**.
- Las sondas están **diseñadas cabeza-cola** respecto a los colorantes.
- **Cuando las sondas hibridan** sobre el DNA blanco, **acercan ambos fluoroforos**.
- Ante la **excitación lumínica** y por acción de un **mecanismo FRET**, el **grupo aceptor emite fluorescencia** detectable cuando quedan contiguos.

PCR en TIEMPO REAL

De doble hibridación



PCR en TIEMPO REAL

Tipo de Sonda	Quenching	Aplicación	Diagrama
Molecular Beacons	Colisional	<ul style="list-style-type: none"> Detección de SNPs Detección de ácidos nucleicos mediante Real-Time PCR. Cuantificación mediante RTi-PCR. Discriminación alélica e identificación. Ensayos de diagnóstico clínico. 	
Scorpions	Colisional	<ul style="list-style-type: none"> Detección de SNPs. Real-Time PCR. Discriminación alélica. Ensayo de genotipificación en un tubo. 	
Amplifluor	Colisional	<ul style="list-style-type: none"> Detección de SNPs. Estudios de mutaciones. Cuantificación mediante RTi-PCR. 	
De hibridación	FRET	<ul style="list-style-type: none"> Cuantificación mediante RTi-PCR. Medidas de número de copias de ADN. Ensayos de identificación de patógenos. Detección de SNPs. Verificación de resultados de <i>microarray</i>. 	
De hidrólisis (TaqMan)	FRET	<ul style="list-style-type: none"> Cuantificación mediante RTi-PCR. Medidas de número de copias de ADN. Ensayos de identificación de patógenos. Detección de SNPs. Verificación de resultados de <i>microarray</i>. 	
Eclipse	Colisional	<ul style="list-style-type: none"> Detección de SNPs Detección de ácidos nucleicos mediante Real-Time PCR. Cuantificación mediante RTi-PCR. 	

PCR en TIEMPO REAL

Con sondas

- La **Real Time PCR** basada en **sondas** posee la **ventaja** de la **alta sensibilidad y especificidad**.
- Es posible realizar **reacciones múltiples** utilizando **sondas** con **diferentes fluoróforos**.
- La principal **desventaja** está dada en los **mayores costos** y en **mayor complejidad en el diseño**.

PCR en TIEMPO REAL

**Diseño de un experimento
de *Real Time* PCR**

PCR en TIEMPO REAL

Aplicaciones de *Real Time* PCR:

- *Perfil de expresión génica*
- *Determinación de título viral*
- *Perfil genómico (duplicaciones o deleciones)*
- *Discriminación alélica*

Lo **primero** que hay que **determinar** es la química elegida para la **qPCR** (SyBr Green o con sondas)

PCR en TIEMPO REAL

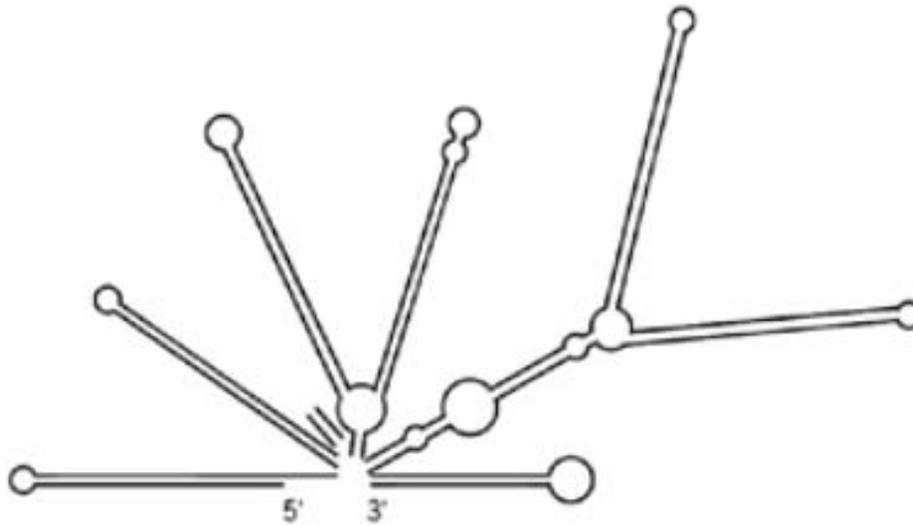
Consideraciones diseño amplicón y *primers*

Consideraciones sobre el AMPLICÓN

- *El amplicón debería tener entre **50-200 pb**. Así, es más probable de ser completamente sintetizado ciclo a ciclo que un fragmento grande (mayor eficiencia de duplicación). Nunca superar los 400 pb.*
- *Si la región a ser amplificada es pequeña tiene menos dependencia de la integridad del molde.*
- *El contenido de **GC** del molde debería ser alrededor del **50%** (sin grandes extensiones de 100% GC) y sin grandes regiones de estructura que afecten el progreso de la DNA polimerasa.*

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones diseño amplicón y *primers*



Ejemplo de un Molde muy estructurado como ssDNA, inadecuado para ser blanco de una qPCR

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones diseño amplicón y *primers*

Consideraciones sobre los *primers*

- *Deben tener entre 18-28 nt. A mayor longitud, mayor estructura. A menor longitud, mayor inespecificidad.*
- *Hay que **evitar** regiones con **extensiones de un nucleótido** (4 Gs consecutivas deben ser evitadas).*
- *Deben tener alrededor de **30-80%** de contenido en **GC**.*
- *Deben tener **temperaturas de annealing compatibles** (diferencia menor a 5°C).*
- *En el caso que el experimento sea para **detectar transcritos eucariotas**, es conveniente diseñar el par de primers en zonas de **unión de exones** para evitar contaminación con gDNA.*

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones diseño amplicón y *primers*

Consideraciones sobre los *primers*

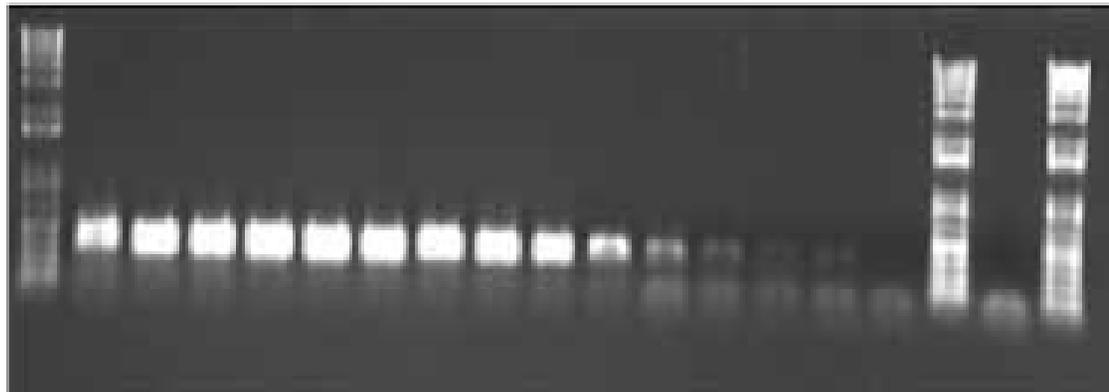
- **Evitar hibridación** entre *primers* que deriven en formación de dímeros.
- Si se eligió el uso de sondas, **primero diseñar la sonda** y luego los *primers*.
- **Evitar más de 2 Cs o Gs** en los 5 nucleótidos del extremo 3' de cada *primer*.
- Se **recomienda utilizar entre 50 nM y 900 nM** de cada *primer* y **900 nM** de *sonda*. Conviene evaluar experimentalmente para elegir la concentración más apropiada.

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones diseño amplicón y *primers*

Dímeros de *primers*

- Es necesario **determinar** su utilidad por **END POINT PCR**.
- Cuanto menor es la cantidad de DNA molde, mayor es la probabilidad de aparición de dímeros.



dímeros

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones diseño amplicón y *primers*

Consideraciones sobre las sondas TaqMan

- *Debe tener entre 18-30 nt de longitud.*
- *La temperatura de melting de los primers debería estar entre 58-60°C, mientras que la de la sonda debería ser 8-10°C mayor.*
- *La distancia entre la sonda y los primers nunca debería exceder los 100 pb.*
- *La sonda tiene que cumplir los mismos requisitos que los primers (GC entre 45-65%, no G o C en el extremo 3').*
- *La sonda debería contener más Cs que Gs.*
- *La sonda no debería tener una G en el extremo 5'.*

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones sobre el molde y curva estándar

Consideraciones sobre el molde

- *Si el molde es **DNA**, es necesario **asegurar** que esté **libre** de exceso de **proteínas** y **solventes** orgánicos.*
- *Si el molde es **RNA transcripto**, es necesario **validar** la **ausencia** de **gDNA** que compita por los primers.*
- *En cualquiera de los dos casos, es importante **estandarizar** el **método de purificación** y realizar **medidas** espectroscópicas a **230 nm, 260 nm y 280 nm**.*

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones sobre el molde y curva estándar

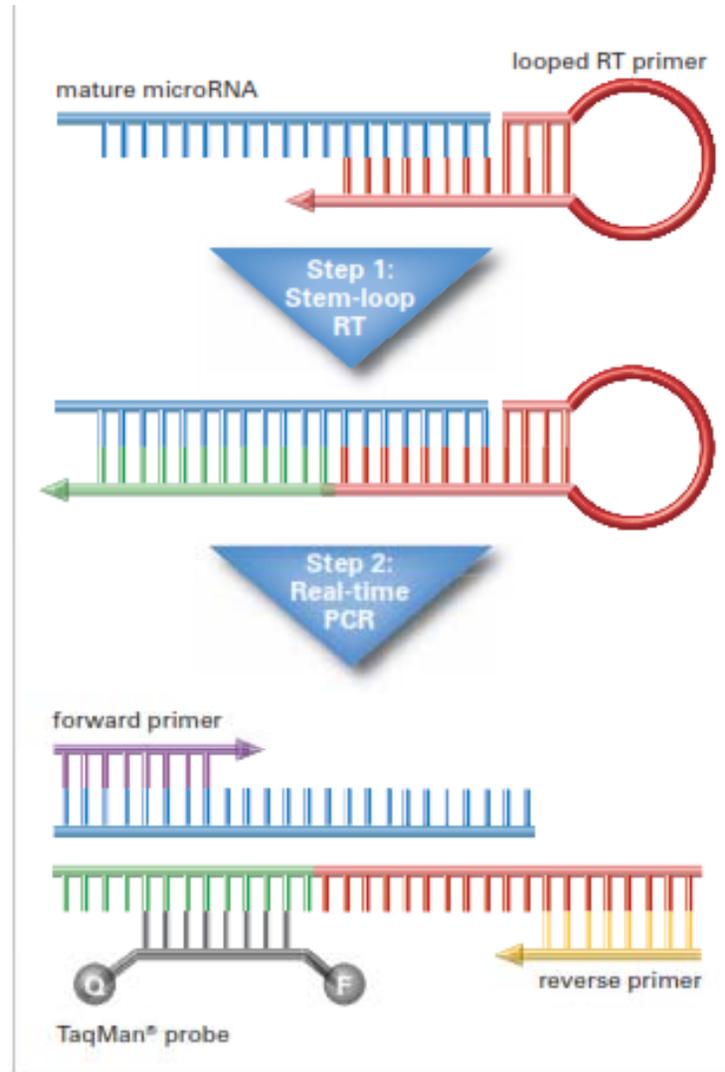
Consideraciones sobre el molde (RNA)

- *La **cuantificación de transcriptos** suele requerir la presencia de un **control interno** de carga.*
- *Este control, en **eucariotas**, suele ser **β -actina, 18 S rRNA, ciclofilina A, GAPDH, β -2-microglobulina, β -glucurodinasa, hipoxantina ribosiltransferasa, TATA box binding protein.***
- *En **bacterias**, el control interno suele ser **16 S rRNA** o alguno de los **genes** de la **glucólisis**.*
- ***Previo** a la **qPCR** es necesario realizar **cDNA** (con hexámeros, con polyT, o con looped RT primers).*

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones sobre el molde y curva estándar

Estrategia de análisis para **microRNAs** utilizando con *looped RT primers*.



PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones sobre el molde y curva estándar

Consideraciones sobre el análisis de los datos

- El experimento de **qPCR** puede ser para *cuantificación absoluta* o para *cuantificación relativa*.
- El **primero** está más relacionado con el **diagnóstico de genomas de entidades infecciosas**.
- El **segundo** es la estrategia típica para el **análisis cuantitativo de transcritos**.
- En tanto, los ensayos de **perfiles alélicos** suelen ser de carácter más **cualitativo** (presencia o ausencia).

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones sobre el molde y curva estándar

Consideraciones sobre el análisis de los datos

Cuantificación absoluta



Es necesario realizar una **curva estándar**, la cual se utiliza para referenciar las muestras problemas

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones sobre el molde y curva estándar

Consideraciones sobre el análisis de los datos

Cuantificación Relativa



Es necesario utilizar un **estándar interno** de la muestra (otro transcripto).

PCR en TIEMPO REAL

Consideraciones sobre el molde y curva estándar

Cuantificación Relativa

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference gene}}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{calibrator}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{sample}}$$

Cantidad relativa de la muestra $\rightarrow 2^{-\Delta\Delta Ct}$;

***¿Existe otro método de
PCR cuantitativo?***

PCR digital

- La **qPCR** permite **determinar con bastante exactitud un número bajo de moléculas** de ácidos nucleicos en una **muestra problema**.
- **Sin embargo**, cuando tal número es **menor que 50**, el **método se vuelve impreciso** producto de la estocástica.
- Por otro lado, si bien la tecnología de **hibridación en microarreglos** y la **qPCR** son **adecuadas** para determinar **haplotipos** (SNPs, VNPs, CNVs) en gDNAs, **no son suficientemente precisas** para inferir grados de mosaicismo o determinaciones de duplicaciones con precisión.
- Ante estas situaciones, aparece la **dPCR** (digital PCR*) como **metodología diagnóstica** de ácidos nucleicos aplicable en **condiciones de bajo número de copias** de las moléculas en estudio.

*Bert Vogelstein y Kenneth W. Kinzler. (1999). Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp. 9236-9241.

PCR digital

Situaciones donde la precisión de la medida es importante



- La **carga viral** en un paciente infectado con un virus puede ser menor a los límites de precisión de una qPCR (1 virus por cada 20 mL de sangre), provocando que en algunas determinaciones de resultado positivo y en otras negativo.
- La **diferencia en el nivel de transcripción** de un gen en dos condiciones biológicas distintas para un tipo celular es de 5 transcritos en una condición, y 16 transcritos en la otra. Y para otro, la diferencia es 310 y 450.
- Una de las principales fuentes de variabilidad intraespecífica la constituye los **CNVs**. Por ejemplo, se estima que en el genoma humano existen 38.000 CNVs mayores que 100 pb*. Muchos de ellos son duplicaciones.

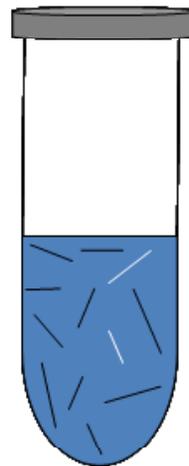
*Vissers LE y Stankiewicz P. (2012). *Microdeletion and microduplication syndromes*. Methods Mol Biol. 838, 29-75.

PCR digital

Bases de la PCR digital

Las bases de este procedimiento son las de realizar PCRs partiendo de 1 molécula de molde

a) Conventional PCR

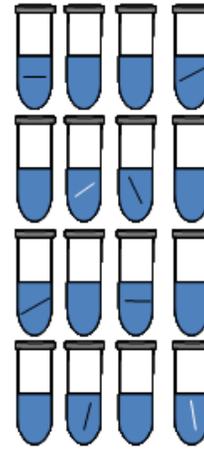


— Wild type
— mutant

Split sample
by dilution



b) Digital PCR

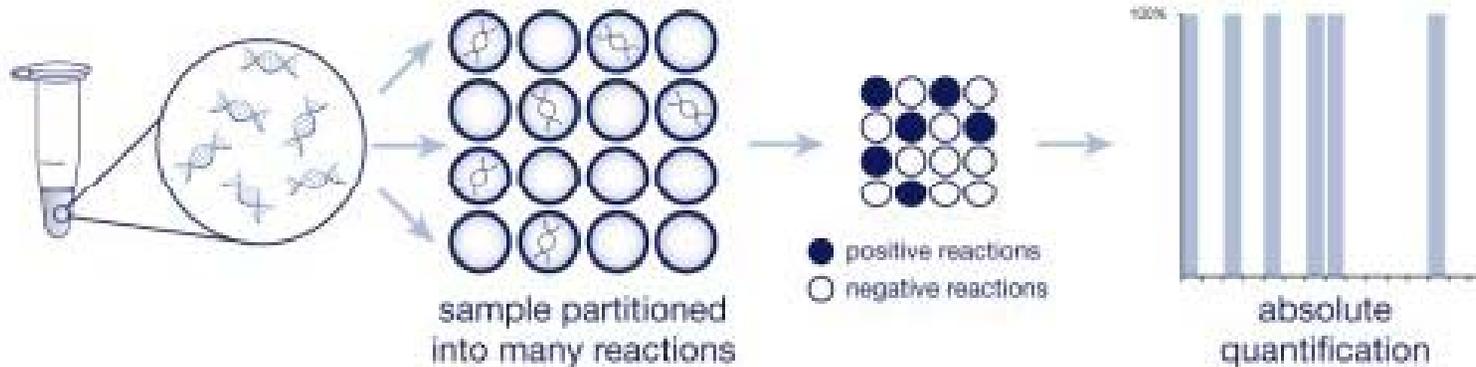


— Wild type
— mutant

PCR digital

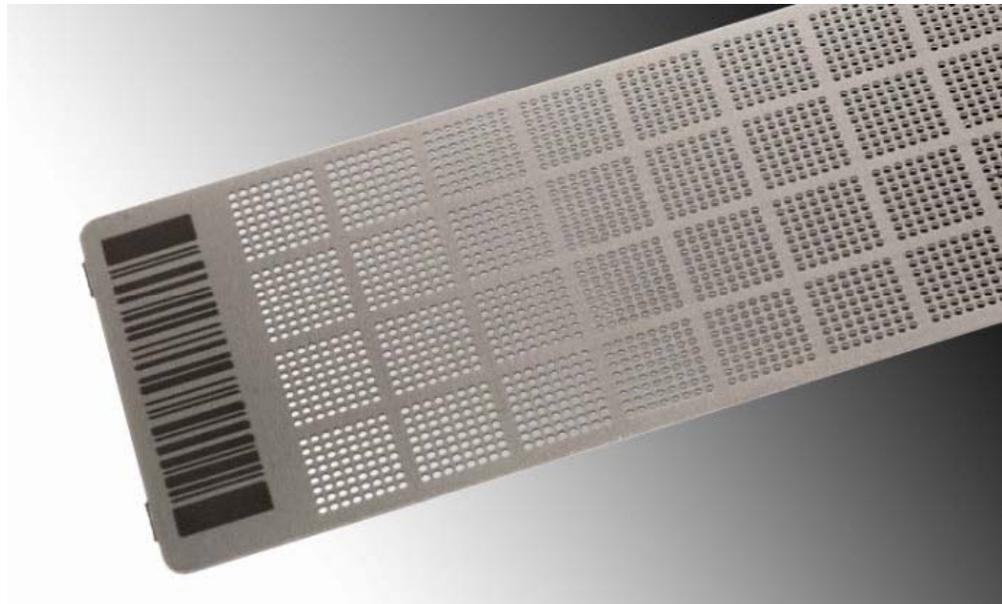
Bases de la PCR digital

Reduciendo los volúmenes de reacción y haciendo detectables los productos mediante fluorescencia, podría realizarse una cuantificación absoluta de una secuencia problema.



PCR digital

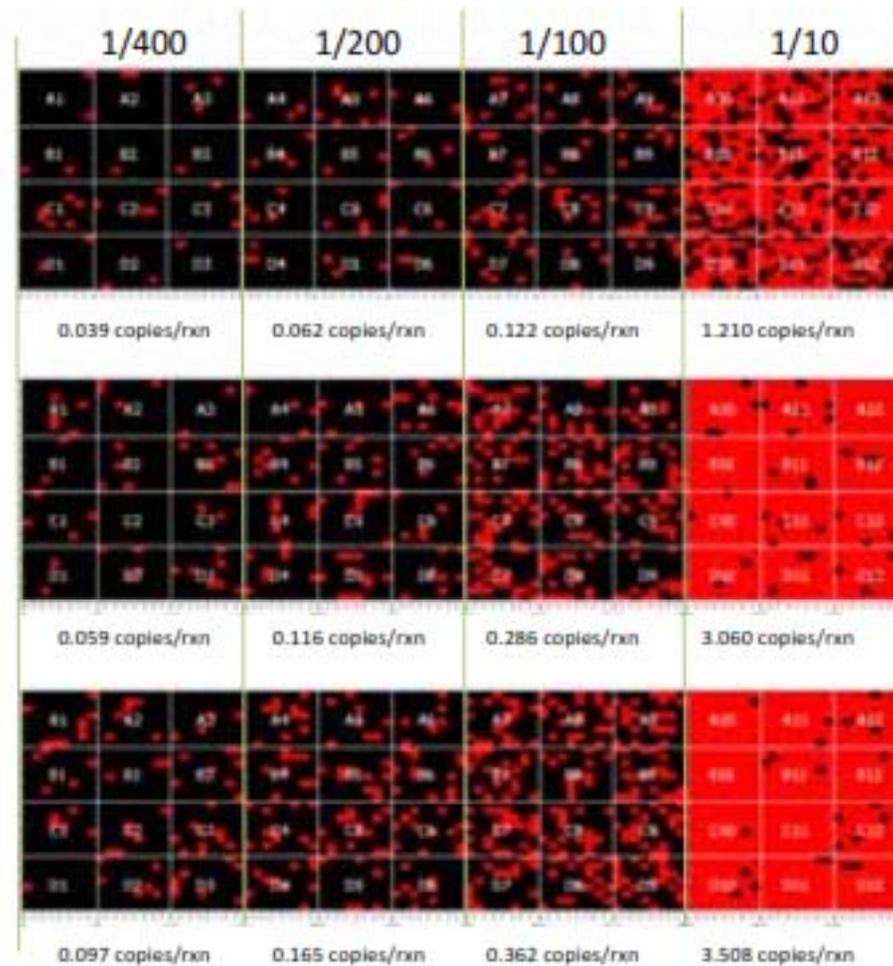
- La **química empleada** en la **dPCR** es **TaqMan**, comportándose como una RTi-PCR.
- Las **reacciones** se realizan en **microarreglos** con miles de posiciones.



TaqMan Open Array Digital PCR Plate

PCR digital

- La aplicación de la dPCR permite una cuantificación directa de las moléculas presentes.



PCR digital

- La aplicación de la dPCR permite una cuantificación directa de las moléculas presentes.

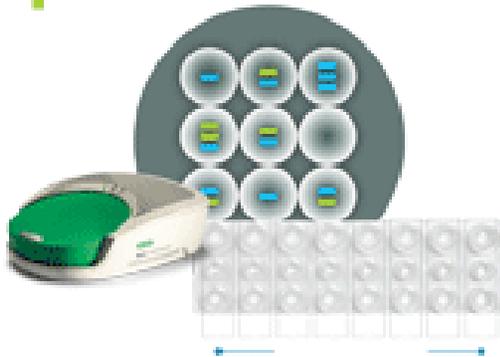


Publicidad de *Life Technologies*

PCR digital

- La máxima expresión de la **tecnología** dPCR es la **ddPCR** (*droplet digital PCR*) comercializado por *BIORAD*.
- Este sistema **requiere** de **dos equipamientos**, uno para **generar las gotitas**, y el otro para llevar a cabo la **reacción de PCR**.

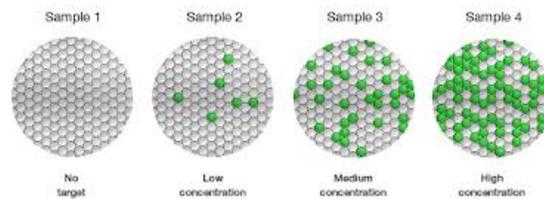
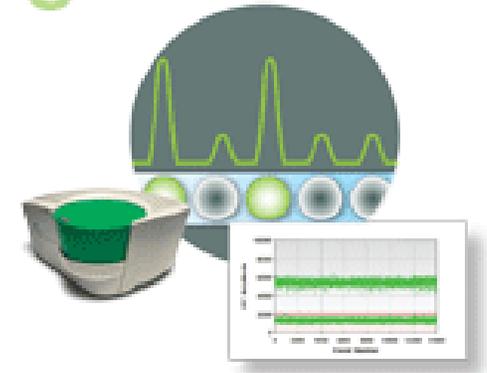
1 Generate droplets



2 Perform PCR with EvaGreen or hydrolysis probes

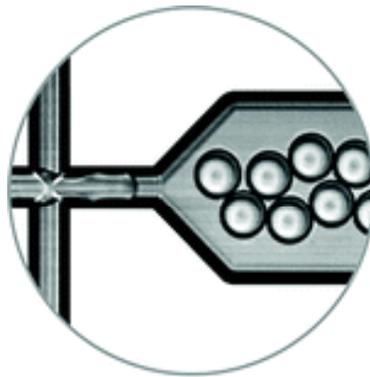


3 Read and analyze results

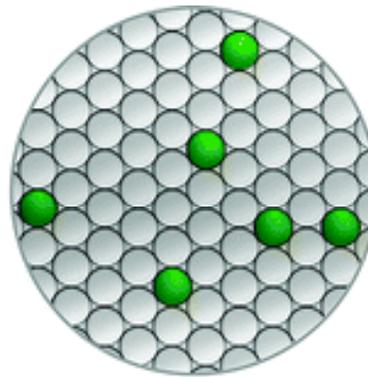


PCR digital

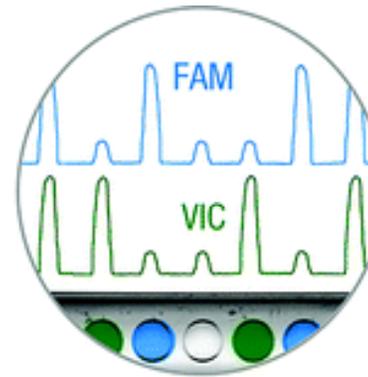
- El equipamiento *Qx droplet generator* particiona la mix de reacción en **20.000 gotitas** del rango del nanolitro.
- Luego, el *Qx droplet Reader* es el **termociclador** que permite que la PCR sea llevada a cabo.



1. MAKE



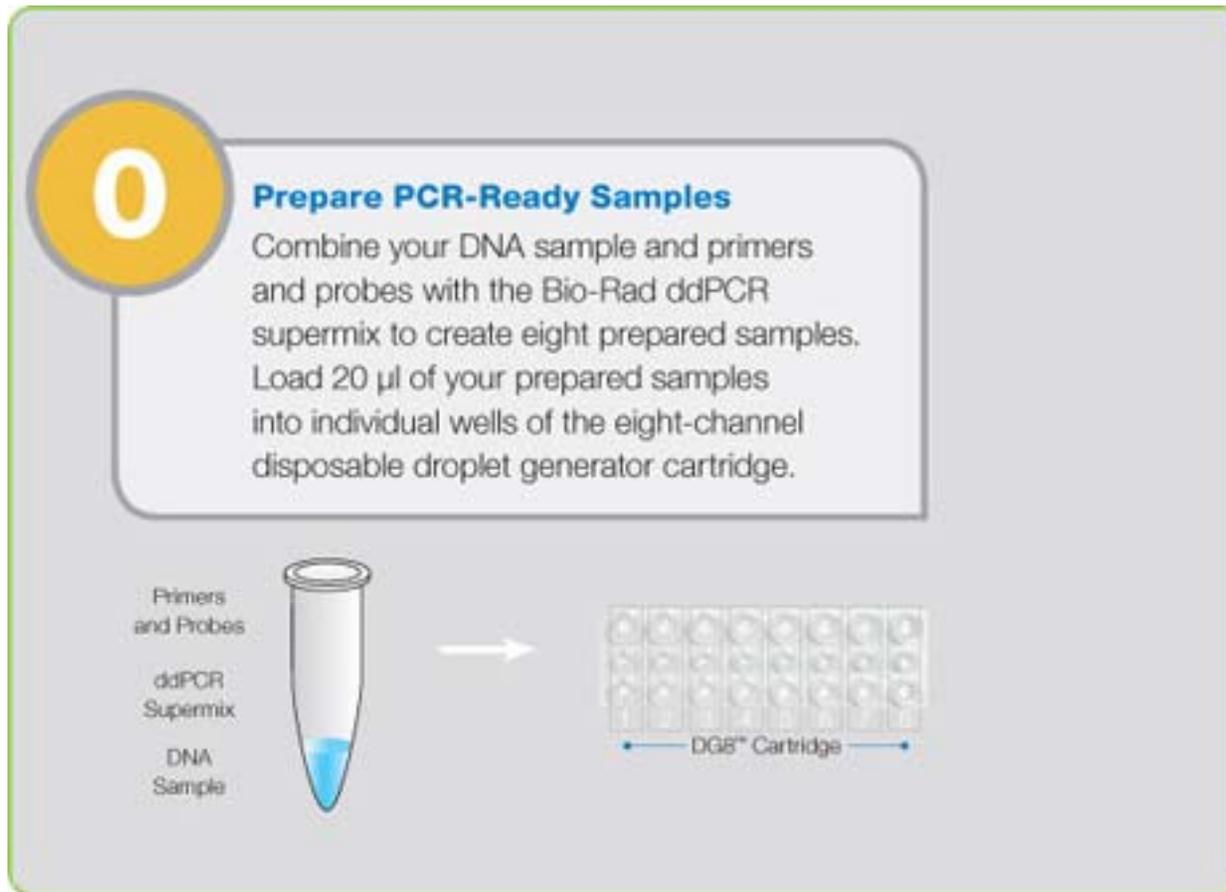
2. CYCLE



3. READ

PCR digital

Flujo de trabajo



PCR digital

Flujo de trabajo



PCR digital

Flujo de trabajo

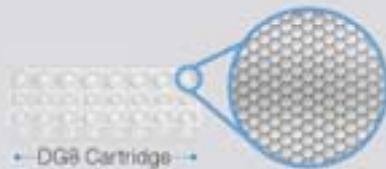
2

Perform PCR

Pipet emulsified samples from the cartridge to a 96-well PCR plate. Seal the plate with the PX1™ PCR plate sealer. Perform PCR to end point (40 cycles) using a thermal cycler.



C1000 Touch™ Thermal Cycler



DGB Cartridge



PX1™ PCR Plate Sealer

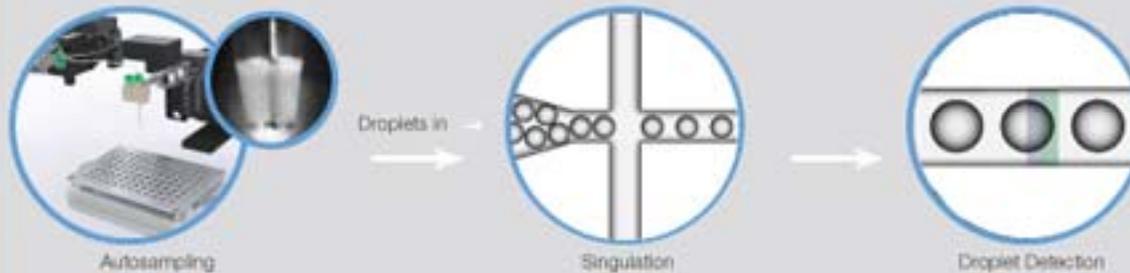
PCR digital

Flujo de trabajo

3

Read Droplets

Load the plate into the QX100 droplet reader and start your run. Each well is read serially. Droplets are sipped and the singulator unpacks the emulsified droplets and streams them in single file past a two-color optical detection system to determine which droplets contain a target (+) and which do not (-).



PCR digital

Flujo de trabajo

4

Analyze Results

ddPCR software reads the positive and negative droplets in each sample and plots the fluorescence droplet by droplet: ~1.4 million droplets are read per 96-well plate. The fraction of positive droplets determines the concentration of the target in the sample.

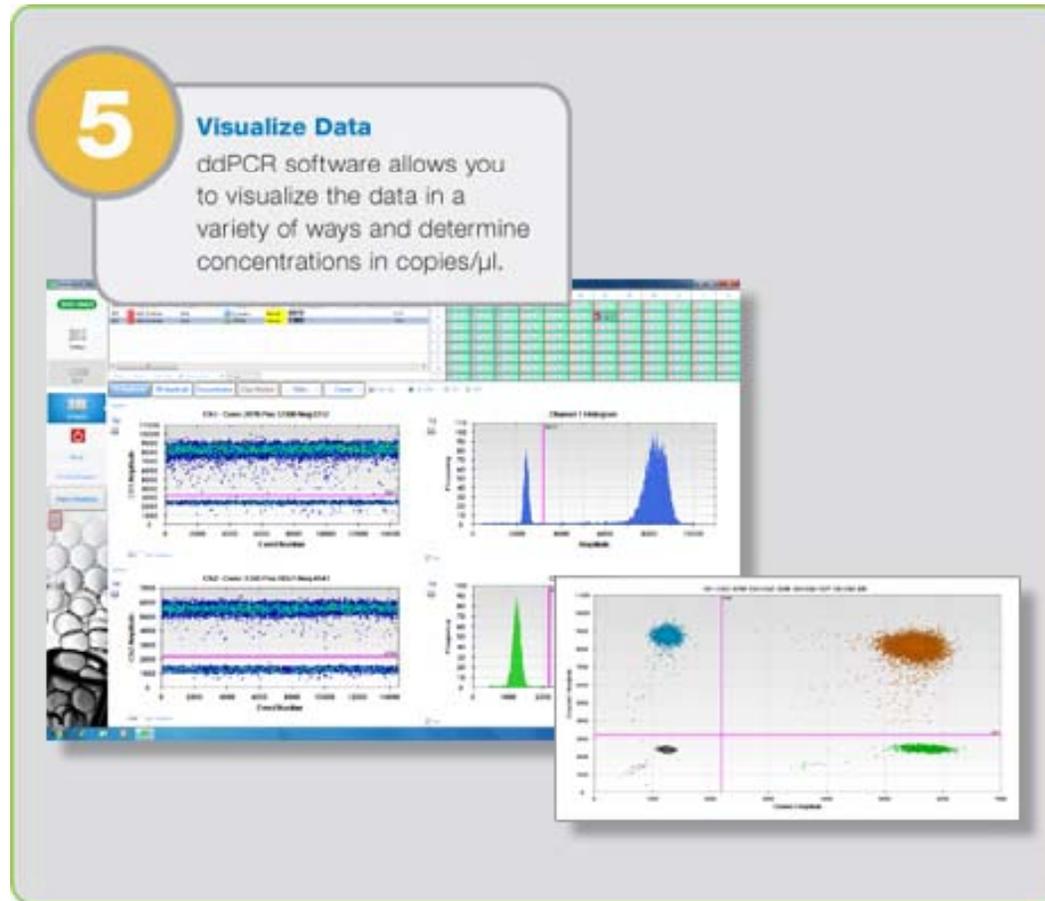


QX100 Droplet Reader

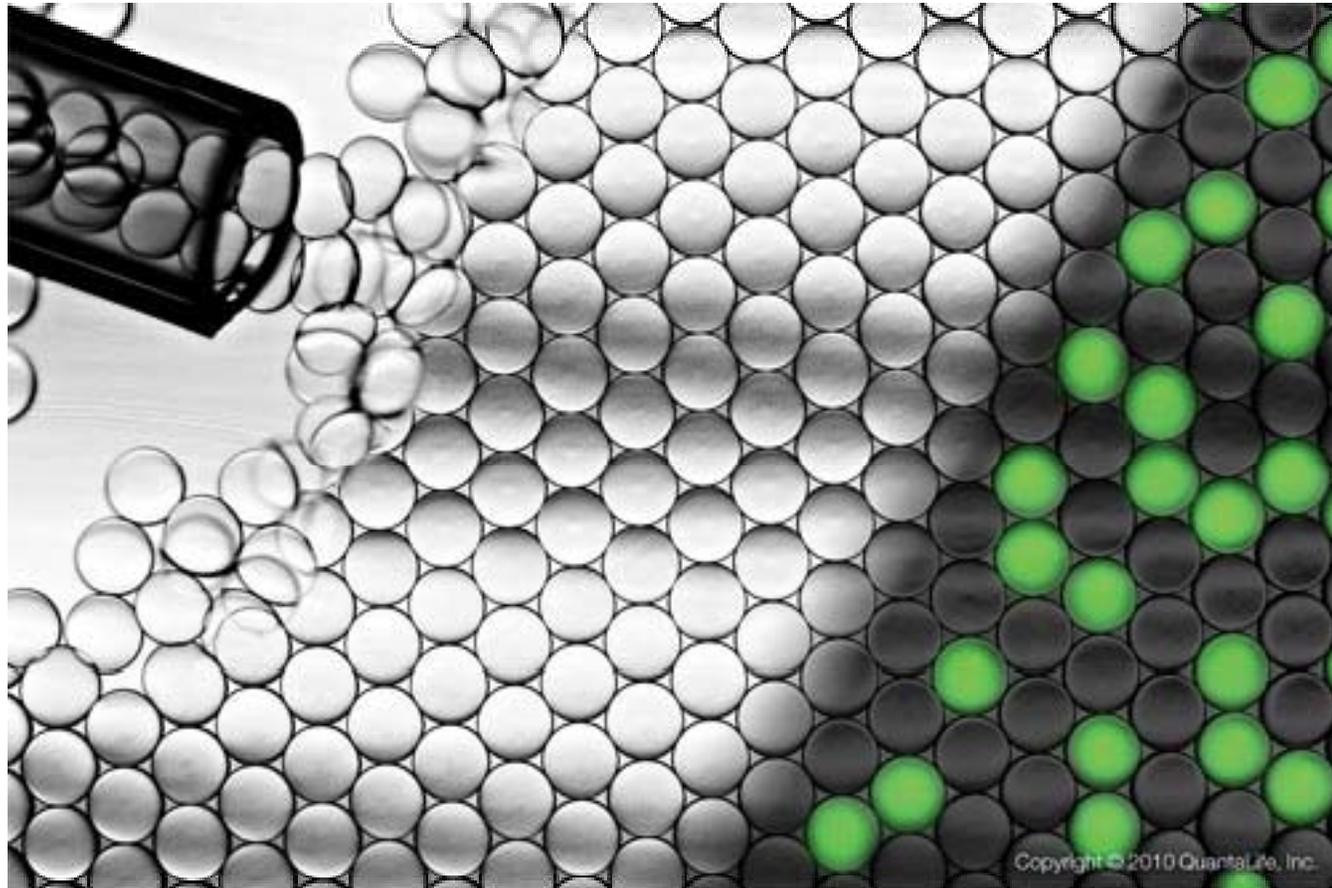


PCR digital

Flujo de trabajo



PCR digital



Conclusiones

- La detección de ácidos nucleicos en muestras problema es un tópico relevante en biología molecular, con fines básicos y aplicados.
- Luego de los procedimientos de hibridación sin amplificación, apareció la PCR como técnica clave para estos propósitos.
- Hoy en día podemos hablar de 3 generaciones de PCR:

- PRIMERA GENERACIÓN: PCR END POINT (PCR)

- SEGUNDA GENERACIÓN: PCR Real Time (Rti-PCR o qPCR)

- TERCERA GENERACIÓN: PCR Digital (dPCR y ddPCR)