



# PCR EN TIEMPO REAL: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN INVESTIGACIÓN

# CRONOGRAMA

## Teóricos:

Modalidad virtual

6 al 9 de setiembre

Unirse a la reunión Zoom

<https://salavirtual-udelar.zoom.us/j/84594455127>

ID de reunión: 845 9445 5127

## Prácticos:

Modalidad presencial

12 al 16 de setiembre

Salón 303, 3er piso ala sur - Facultad de Ciencias

Material en EVA

<https://eva.eduper.udelar.edu.uy/course/view.php?id=82>

# APROBACIÓN

Examen individual a distancia a través de EVA o similar

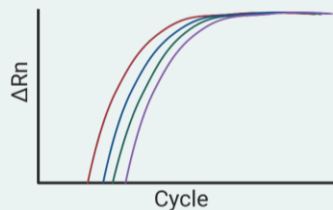
# TEÓRICOS

- Principios del PCR en tiempo real. Curvas de amplificación. Sondas Taqman, SYBR Green, Molecular beacons.
- Diseño de cebadores. Eficiencia y correcciones de eficiencia. . Características de genes de referencia, selección y validación.
- Cuantificación absoluta: curvas estándar, limitaciones .  
Cuantificación relativa: modelos de cuantificación
- Diseño experimental: Réplicas, controles, preparación de las muestras (integridad del ARN, contaminación con ADN genómico, síntesis de ADNc).

# Práctico: Aplicaciones de PCR en Tiempo Real

## MÓDULO I:

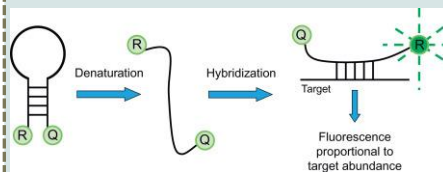
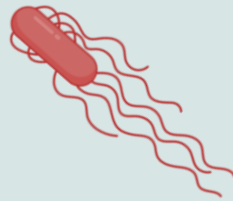
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE DIFERENTES MIEMBROS DE UNA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE A LO LARGO DEL CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO *Trypanosoma cruzi*



Docente: Florencia Mosquillo, Laboratorio de Interacciones Moleculares-FCIEN

## MÓDULO II:

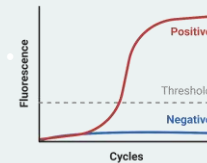
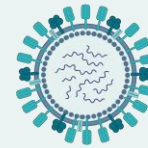
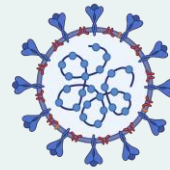
DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella* spp. EN RESIDUOS SÓLIDOS por Q-PCR



Docente: Analia Sanabria, Laboratorio Ambiental - DINACEA - Ministerio de Ambiente

## MÓDULO III:

Diagnóstico multiplex de SARS-COV-2, Influenza A e Influenza B.



Docente: Virginia Bengochea - Laboratorio ATGen.

## MÓDULO IV:

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OGM EN SEMILLAS

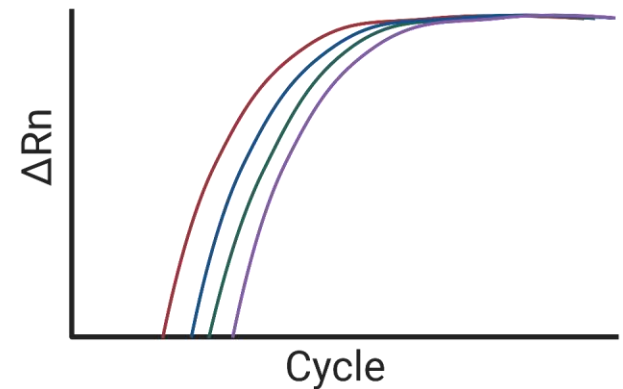


Docente: Mariana Menoni - Sector Molecular-Sanitario, INASE.

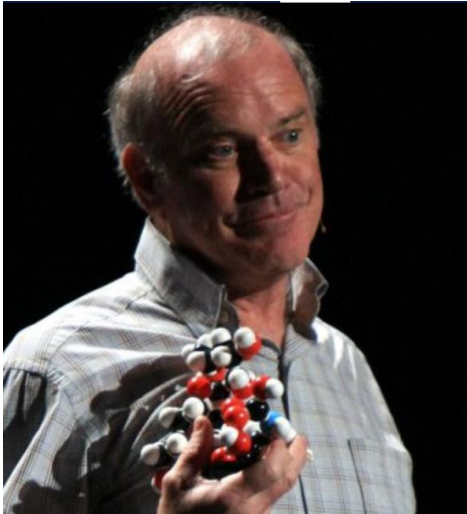
# ESTA CLASE CUBRIRÁ LOS SIGUIENTES TEMAS:

1. ¿Qué es y para qué se utiliza la PCR en Tiempo real?
2. ¿Cómo funciona la PCR en Tiempo Real?
3. ¿Cómo se mide y qué instrumentos se utilizan?
4. ¿Cómo son los datos de la PCR en Tiempo Real?

# 1. ¿QUÉ ES LA REAL TIME PCR Y PARA QUE SE USA?



# ¿QUÉ ES LA PCR EN TIEMPO REAL?



La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un proceso para la amplificación de fragmentos específicos de ADN.

La PCR en tiempo real, es una técnica especializada que permite visualizar una reacción de PCR “en tiempo real” a medida que avanza la reacción.

Como veremos, la PCR en tiempo real nos permite medir cantidades mínimas de secuencias de ADN en una muestra.



# ¿PARA QUÉ SE UTILIZA LA PCR EN TIEMPO REAL?

**La PCR en tiempo real se ha convertido en la piedra angular de la biología molecular:**

Análisis de expresión génica  
Investigación sobre el cáncer  
investigación de drogas

Diagnóstico y manejo de enfermedades  
Cuantificación viral

Pruebas de alimentos  
Porcentaje de alimentos transgénicos

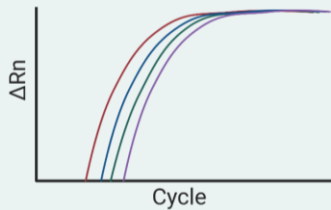
Mejoramiento genético de animales y plantas  
Número de copia del gen  
Genotipado SNPs

Monitoreo ambiental  
Patógenos en muestras alimentarias  
Residuos

# Práctico: Aplicaciones de PCR en Tiempo Real

## MÓDULO I:

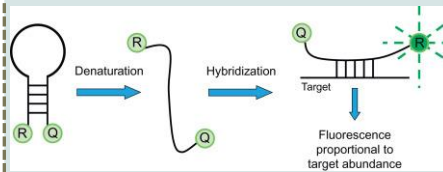
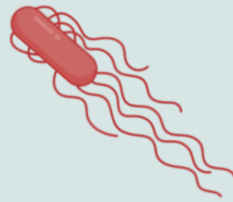
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE DIFERENTES MIEMBROS DE UNA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE A LO LARGO DEL CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO *Trypanosoma cruzi*



Docente: Florencia Mosquillo, Laboratorio de Interacciones Moleculares-FCIEN

## MÓDULO II:

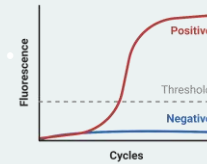
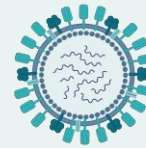
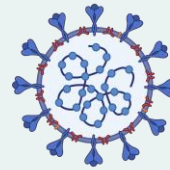
DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella* spp. EN RESIDUOS SÓLIDOS por Q-PCR



Docente: Analia Sanabria, Laboratorio Ambiental - DINACEA - Ministerio de Ambiente

## MÓDULO III:

Diagnóstico multiplex de SARS-COV-2, Influenza A e Influenza B.



Docente: Virginia Bengochea - Laboratorio ATGen.

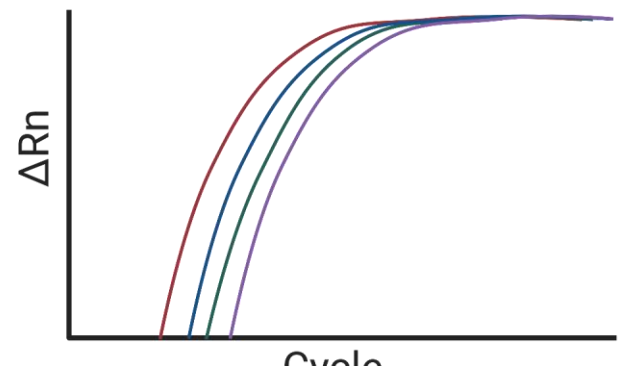
## MÓDULO IV:

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OGM EN SEMILLAS



Docente: Mariana Menoni - Sector Molecular-Sanitario, INASE.

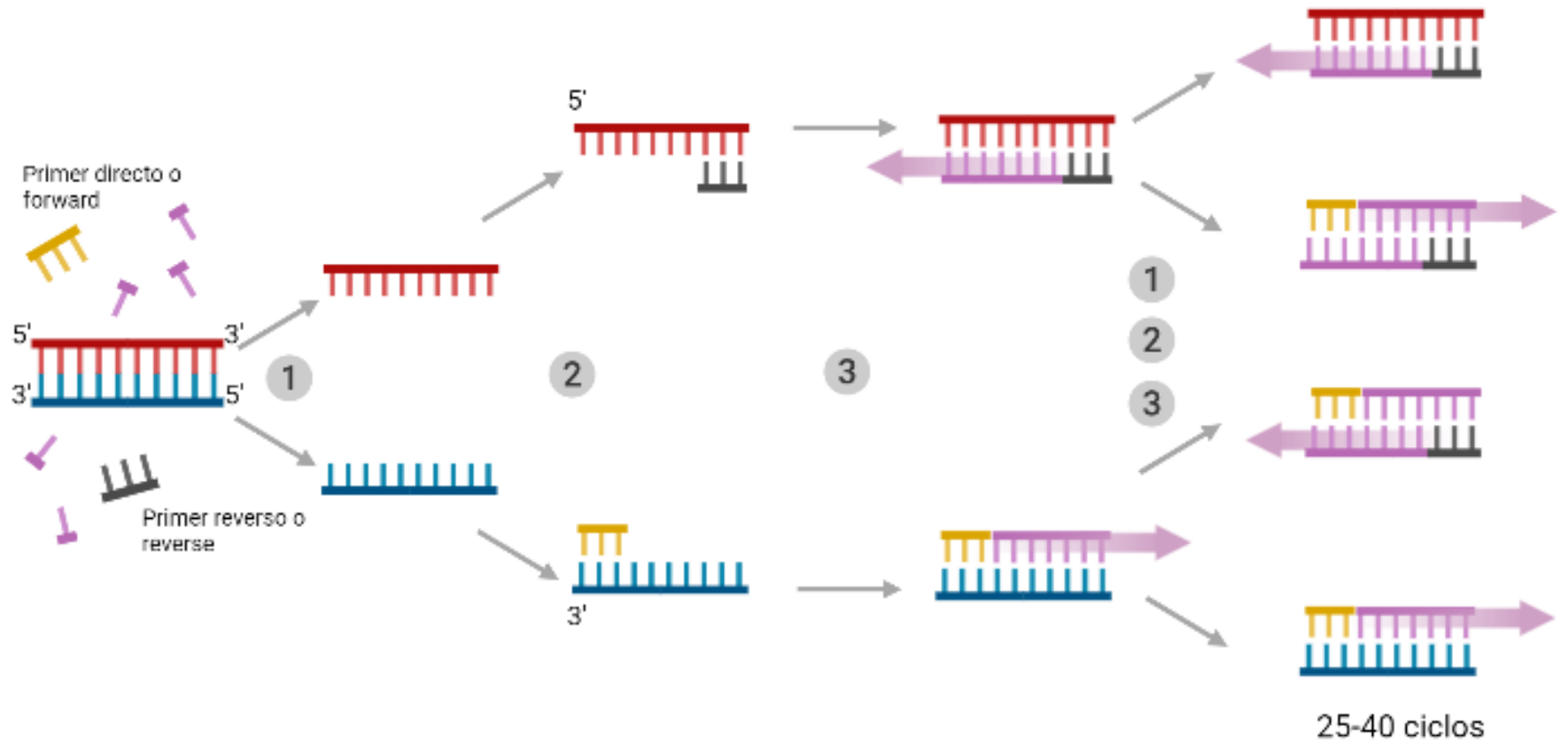
## 2. ¿CÓMO FUNCIONA LA PCR EN TIEMPO REAL?



# ¿CÓMO FUNCIONA LA PCR EN TIEMPO REAL?

Para comprender mejor qué es la PCR en Tiempo Real, revisemos cómo funciona la PCR convencional o a tiempo final....

# ¿ CÓMO FUNCIONA LA PCR?

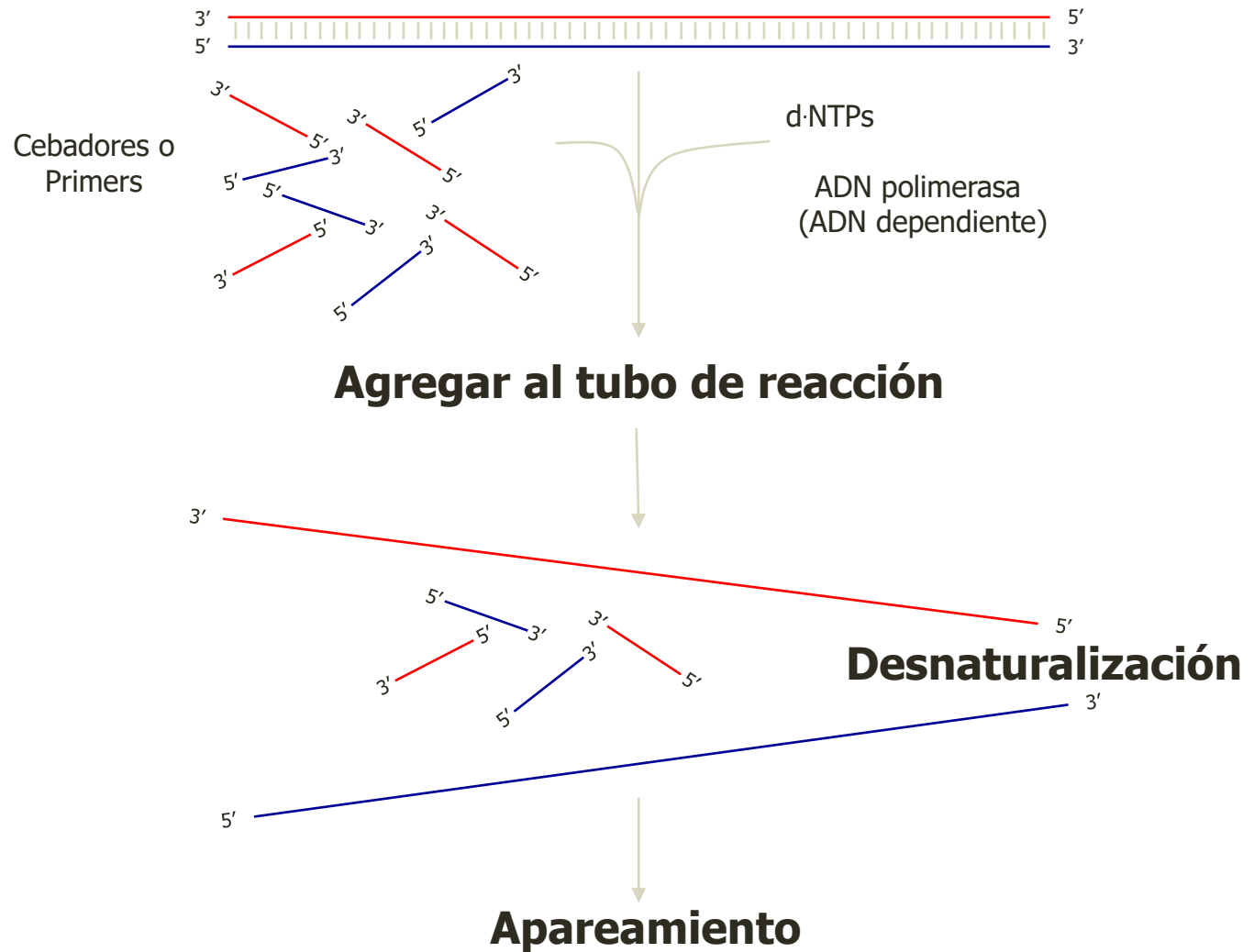


**1** Desnaturalización a 95-96°C

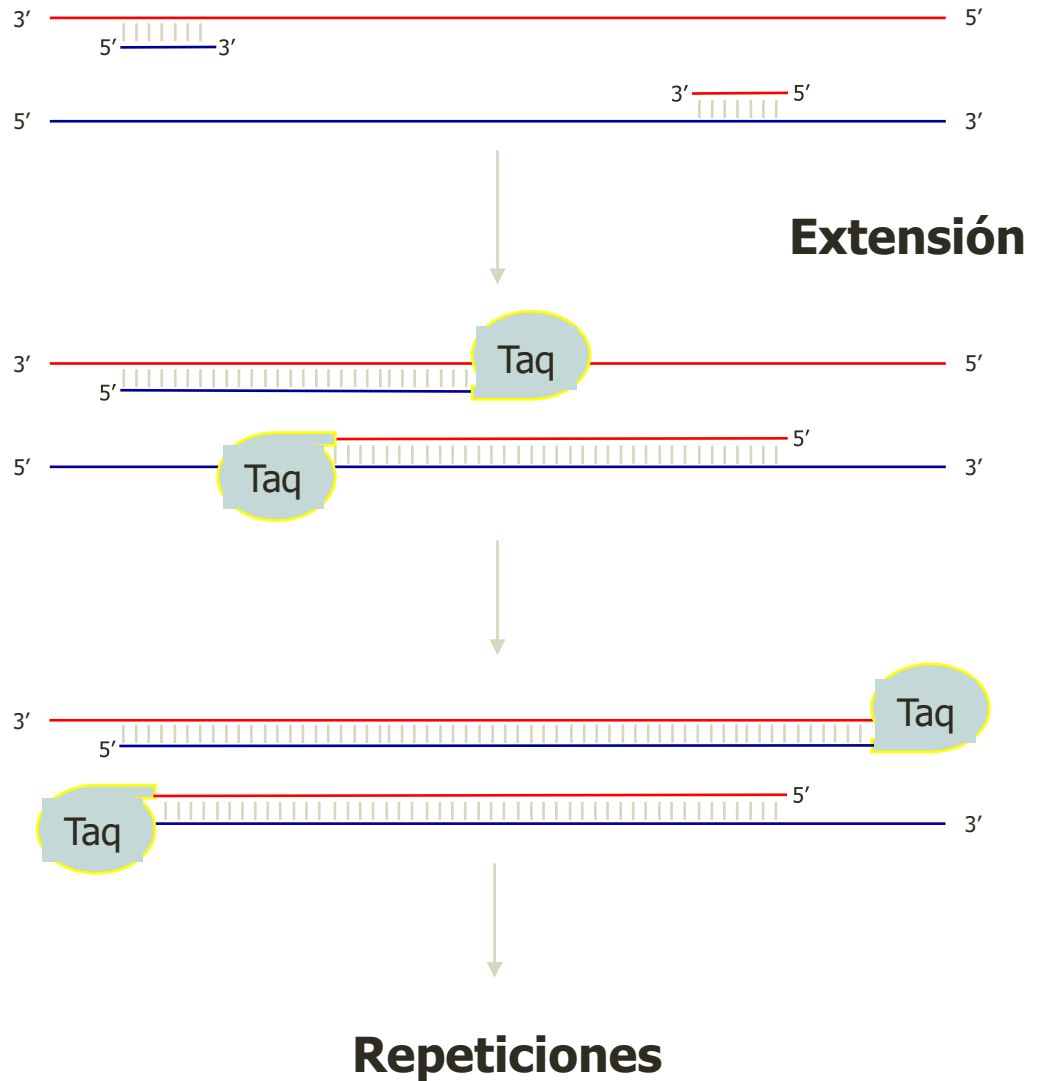
**2** Apareamiento de los cebadores (50-60°C)

**3** Elongación a 72°C

# ¿ CÓMO FUNCIONA LA PCR?



# ¿ CÓMO FUNCIONA LA PCR?

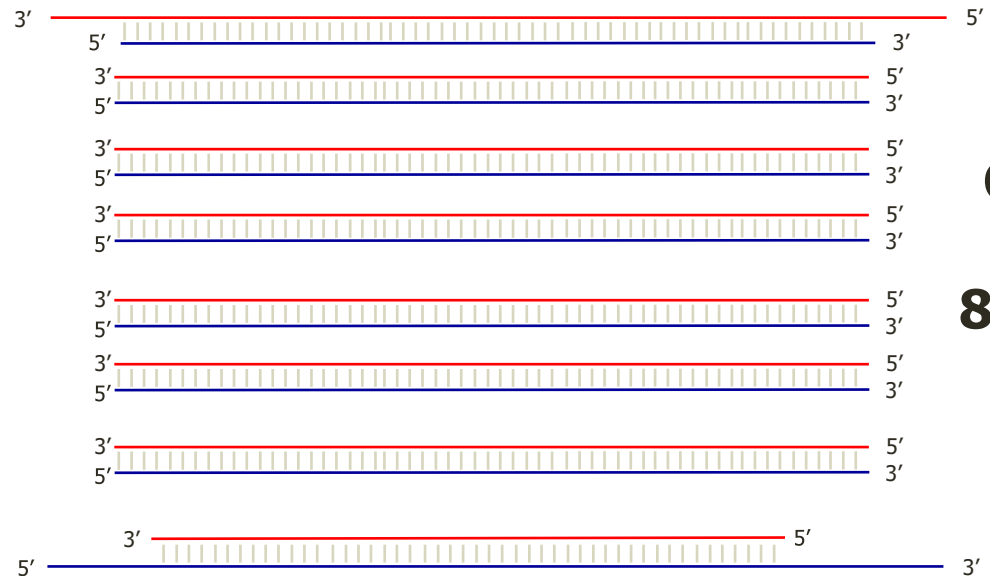


# ¿ CÓMO FUNCIONA LA PCR?



**Ciclo 2**

**4 Copias**



**Ciclo 3**

**8 Copias**



# CÓMO FUNCIONA LA PCR?

...Así es como se suele presentar la PCR tradicional.

Para comprender la PCR en tiempo real, hagamos un "experimento mental" y guardemos todos los cálculos y fórmulas para más tarde...

Lo más importante es que comenzaremos imaginando la PCR en sí y solo entonces dibujaremos gráficos para ilustrar lo que va sucediendo.

# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

Para entender la PCR en tiempo real, imaginemos que estamos en un tubo de reacción de PCR en el ciclo número 25...



# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...



¿Qué hay en nuestro tubo, en el ciclo número 25?

Una sopa de nucleótidos, primers, ADN molde, amplicones, enzima, etc.

1,000,000 de copias del amplicón ahora mismo.

# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...



**¿Cómo fue en el ciclo anterior?**

En el ciclo 24 era casi igual, excepto que solo había 500.000 copias del amplicón.

**¿Y el ciclo anterior a ese, el 23?**

Casi lo mismo, pero solo 250.000 copias del amplicón.

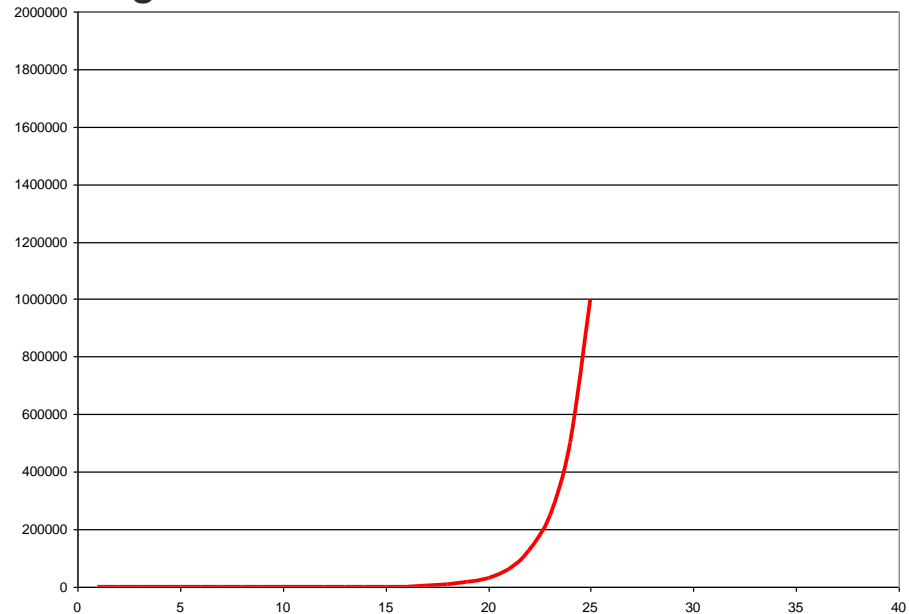
**¿Y el ciclo 22?**

No era muy diferente. Solo había 125.000 copias del amplicón.

# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...



Si tuviéramos que graficar la cantidad de ADN en nuestro tubo, desde el principio hasta ahora, en el ciclo 25, el gráfico se vería así:

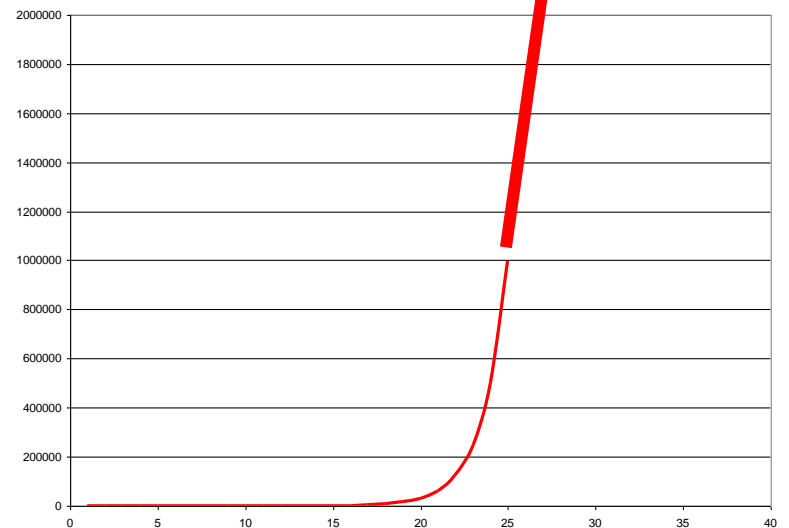


# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...



Entonces, en este momento estamos en el ciclo 25 en una sopa con 1,000,000 de copias del objetivo.

¿Cómo será después del próximo ciclo, en el ciclo 26?



# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...



**¿Cómo será en el ciclo 26?**

Probablemente habrá 2.000.000 de amplicones.

**¿Y el ciclo 27?**

Quizás 4.000.000 de amplicones.

**¿Y en el ciclo 200?**

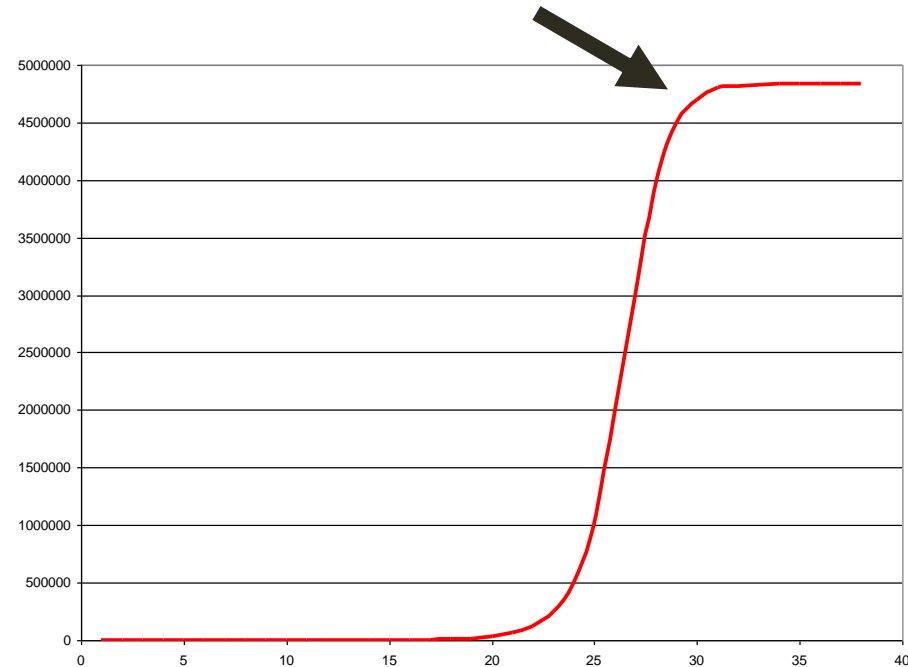
Siendo realistas, a medida que avanza la reacción en cadena, se vuelve exponencialmente más difícil encontrar primers y nucleótidos.

**¡Así que el crecimiento exponencial no continúa para siempre!**

# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...



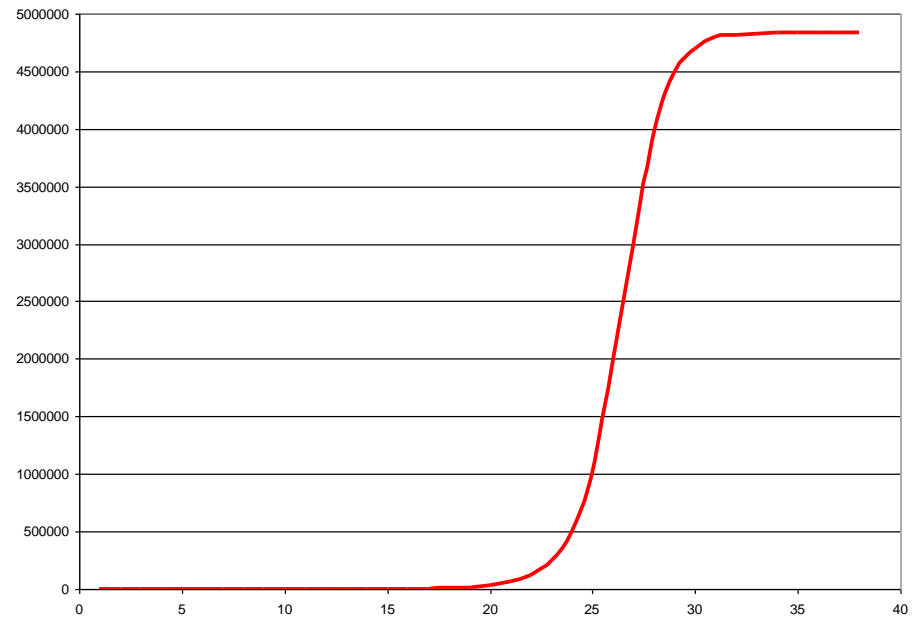
Si graficamos la cantidad de ADN en nuestro tubo a partir del ciclo 25, vemos que en realidad se ve así:





# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

¿Cómo se puede usar todo esto para medir cantidades de ADN?



# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

Imaginemos que:

**A** empieza con cuatro veces menos ADN que **B**... imagina que **A** tiene 100000 de copias en el ciclo 25. Retrocede unos cuantos ciclos y completa la siguiente tabla.



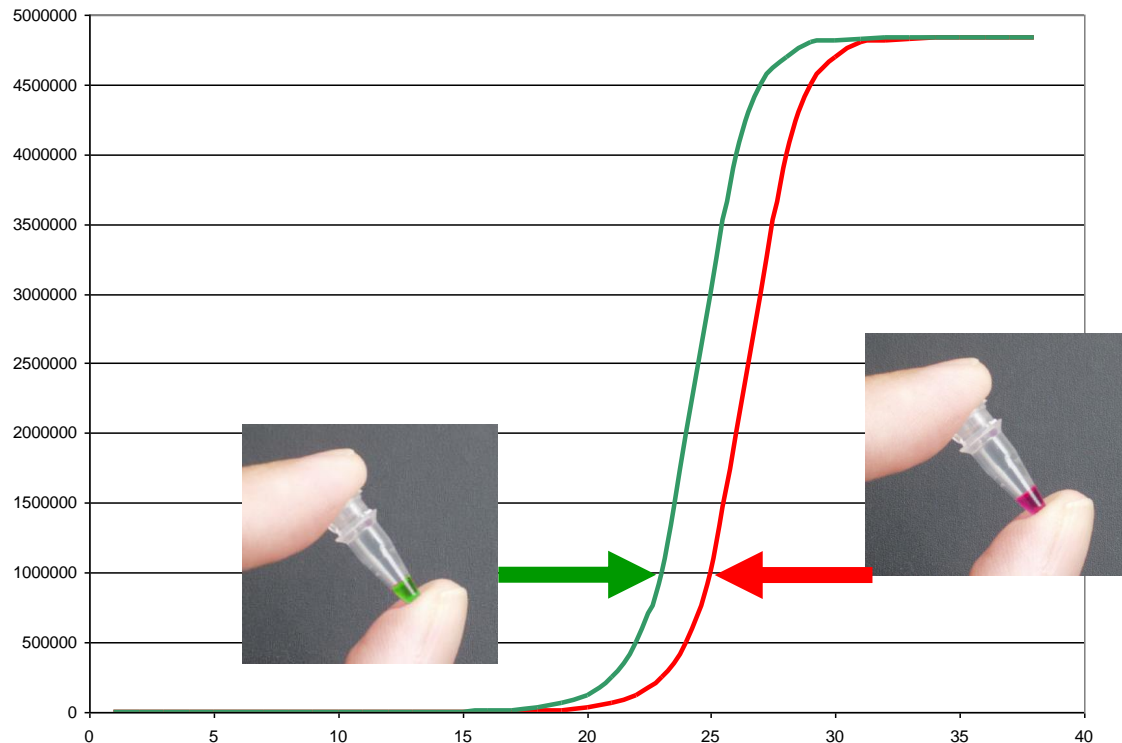
Ciclo	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>23</b>		
<b>24</b>		
<b>25</b>	<b>1,000,000</b>	

# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

Entonces, si **B** comenzó con CUATRO veces más molde de ADN que **A**

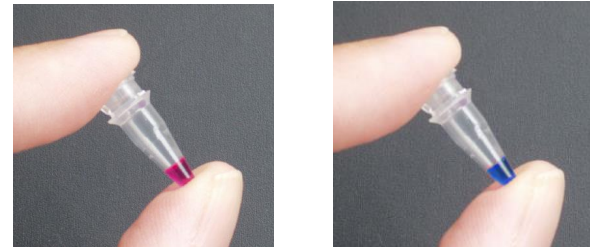
...¡Entonces **B** alcanzaría 1,000,000 de copias exactamente **DOS ciclos** antes que **A** !

Cycle	<b>A</b>	<b>B</b>
23	<b>250,000</b>	<b>1000000</b>
24	<b>500,000</b>	<b>2000000</b>
25	<b>1,000,000</b>	<b>4000000</b>



# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

¿Qué pasaría si tu comenzaras tu PCR con OCHO veces MENOS molde de ADN que A?



<b>Cycle</b>	<b>A</b>	<b>Tu</b>
<b>25</b>	<b>1,000,000</b>	<b>125,000</b>
<b>26</b>	<b>2,000,000</b>	
<b>27</b>	<b>4,000,000</b>	
<b>28</b>	<b>8,000,000</b>	

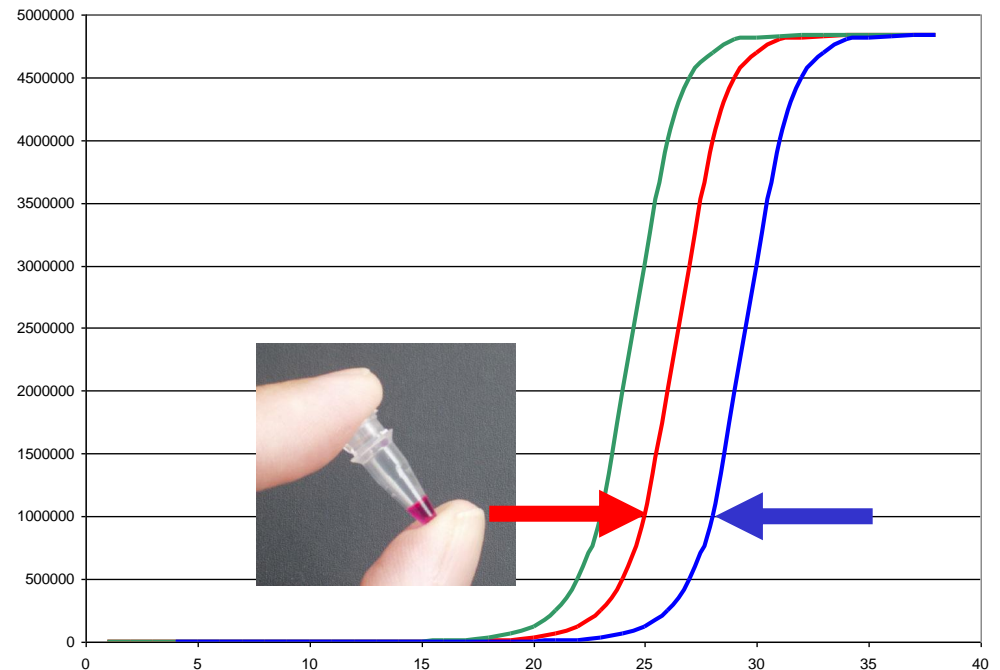
# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

Solo tendrías 125.000 copias el ciclo 25...

¡Y llegarías a 1,000,000 de copias exactamente  
**TRES ciclos** más tarde que **A**

!

Cycle	<b>A</b>	<b>Tu</b>
<b>25</b>	<b>1,000,000</b>	<b>125,000</b>
<b>26</b>	<b>2,000,000</b>	<b>250,000</b>
<b>27</b>	<b>4,000,000</b>	<b>500,000</b>
<b>28</b>	<b>8,000,000</b>	<b>1,000,000</b>



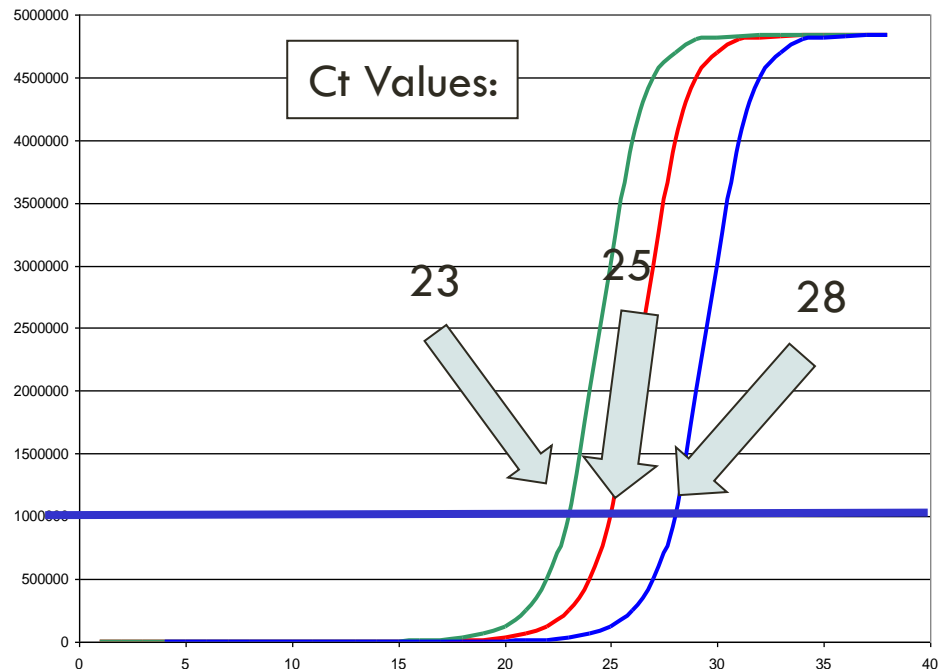
# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

Describimos la posición de las líneas con un valor que representa el número de ciclo donde la curva cruza un umbral arbitrario. Esto se llama el “**Valor Ct**”.

Los valores de Ct están directamente relacionados con la cantidad inicial de ADN, mediante la fórmula:

$$\text{Cantidad} = 2^{\text{Ct}}$$

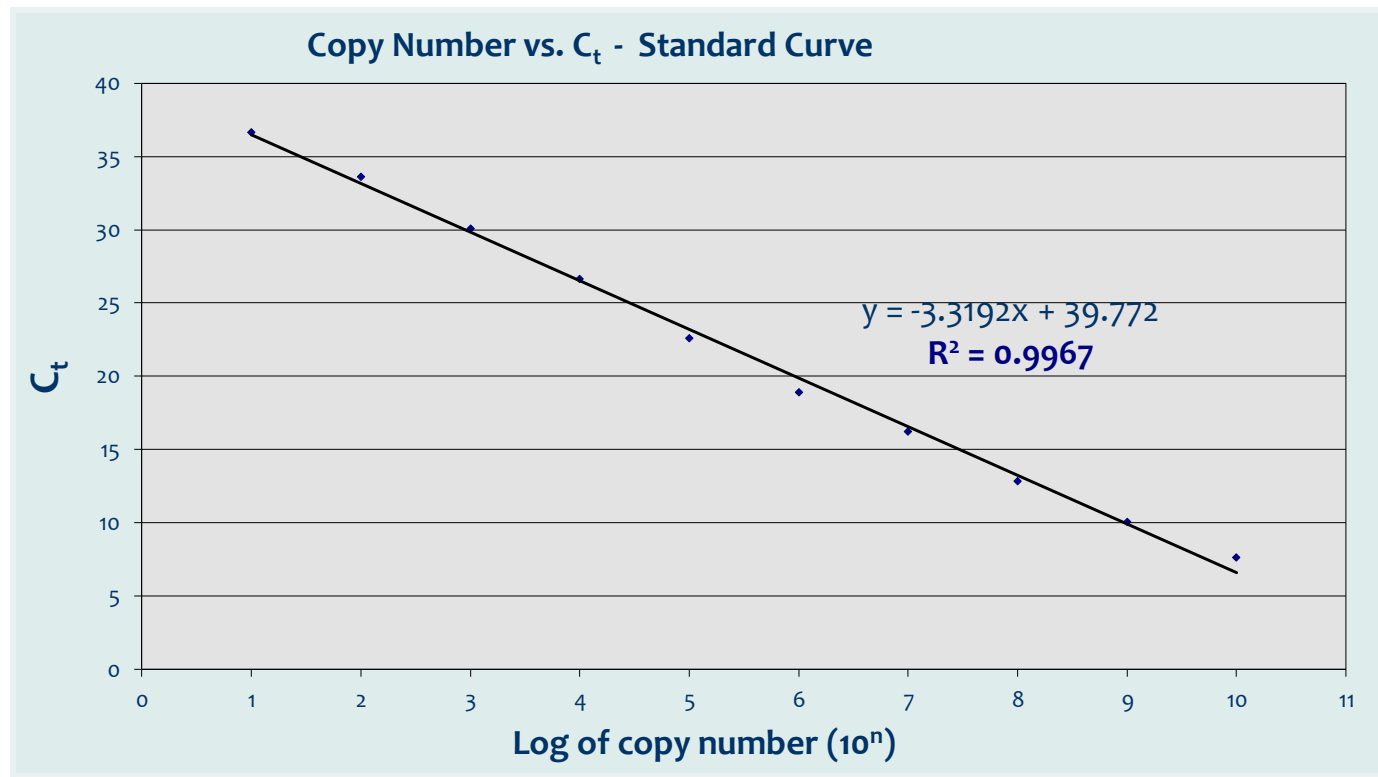
Ciclo	A	B	Tu
23	250,000	1000000	
24	500,000	2000000	
25	1,000,000	4000000	125,000
26	2000000	8000000	250,000
27	4000000	16000000	500,000
26	80000000	32000000	1,000,000



# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

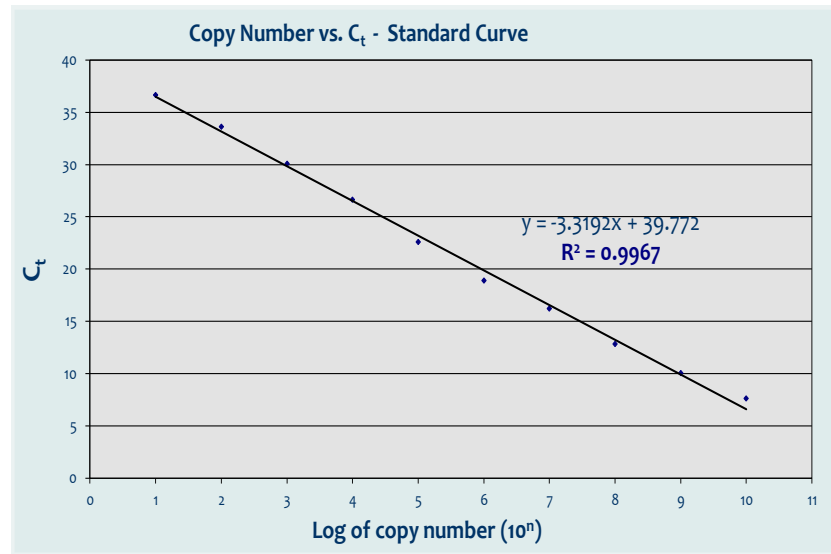
Existe una relación DIRECTA entre la cantidad inicial de ADN y el número de ciclo en el que alcanzará un número arbitrario de copias de ADN (valor Ct).

**Cantidad de ADN  $\approx 2^{\text{Número de ciclos}}$**



# Y EN LA PCR EN TIEMPO REAL...

Que tan sensible es la PCR en Tiempo Real?



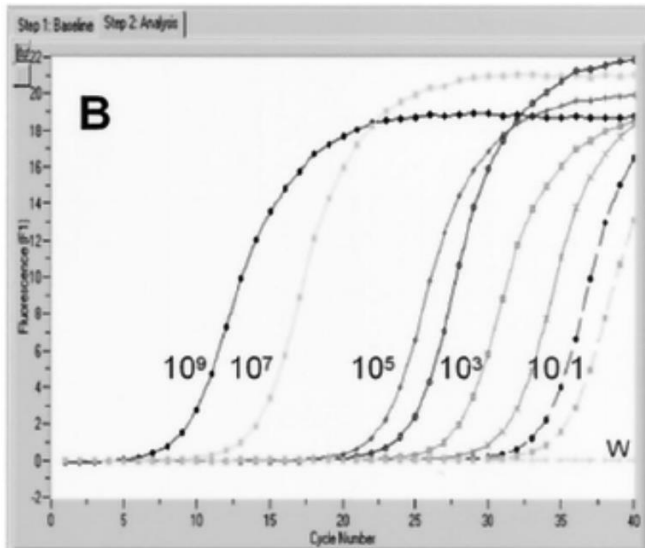
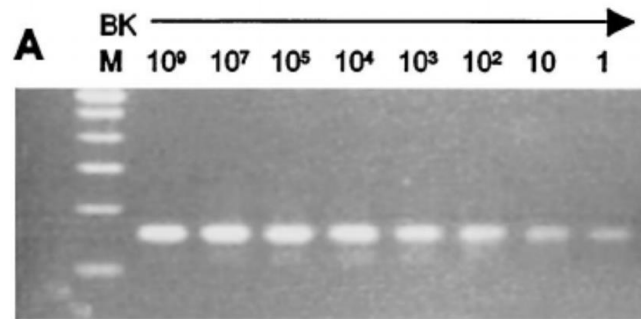
En última instancia, ¡incluso se puede medir una sola copia!

En realidad, normalmente unas 100 copias es la cantidad mínima.

Por ejemplo, cien copias de un gen de aprox 200 pb equivalen a solo veinte atogramos ( $20 \times 10^{-18}$  g) de ADN!



# PCR EN TIEMPO REAL VS PCR A TIEMPO FINAL

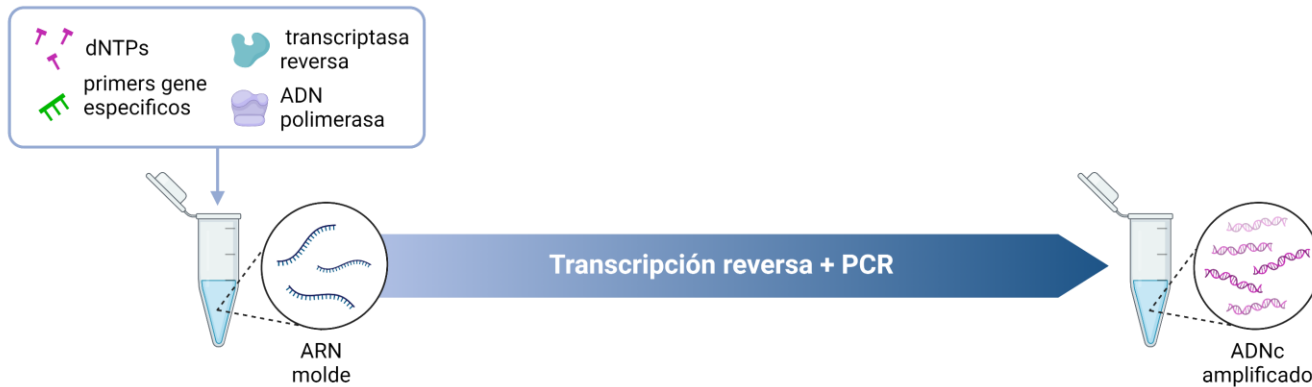


	<b>Real-Time PCR</b>	<b>PCR</b>
Sensitivity	High	Low
Specificity	High -use specific probes	Low -only size discrimination
Quantitative results	Yes -Specific fluorescence	No -EtBr staining
Detection method	Probe-specific Fluorescence	Agarose gel Electrophoresis
Detection range	Wide range	Short range (<2 log)
Reaction time	1 hr	3-5 hr
Post-PCR steps	No	Agarose gel electrophoresis
Cross-contamination	No -Closed system - Single step	Yes -Open system - Multiple steps

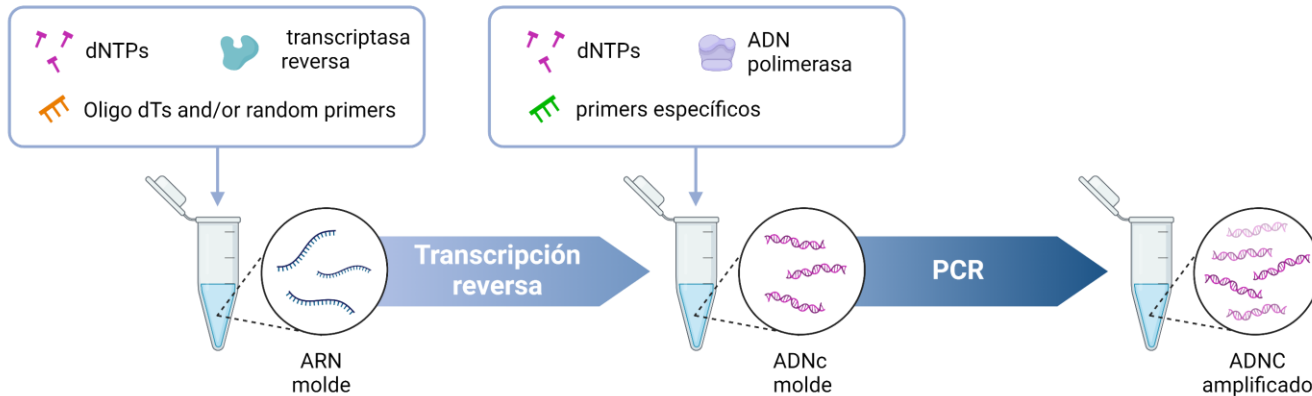
En la PCR convencional (a tiempo final) la detección del producto de amplificación se realiza en la fase de meseta de la reacción, donde la misma ya se detuvo; por lo tanto, las medidas realizadas en esta fase, no ofrecen resultados fiables en cuanto a la cantidad inicial de ADN molde de la muestra

# QUE PASA SI PARTO DE ARN

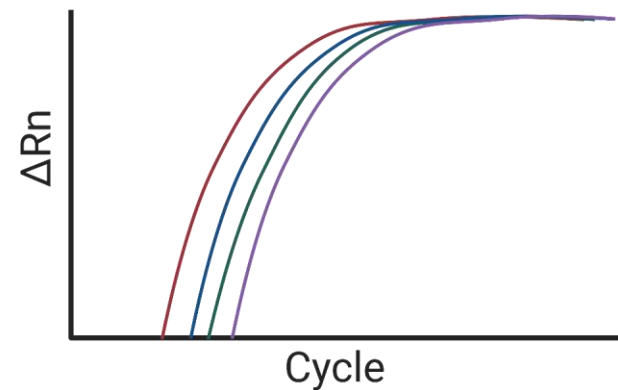
## One-step RT-PCR



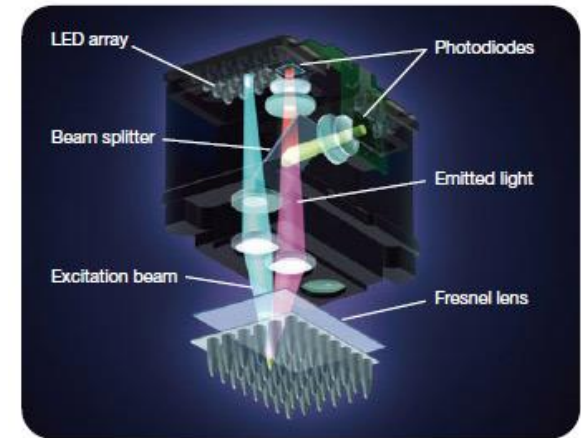
## Two-step RT-PCR



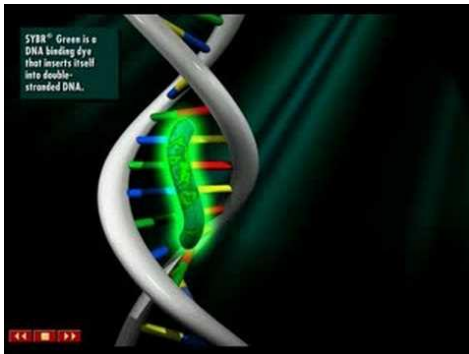
### 3. ¿CÓMO SE MIDE Y QUÉ INSTRUMENTOS SE UTILIZAN?



# ¿CÓMO MEDIMOS EL ADN EN UNA REACCIÓN DE PCR?



## Agentes que se unen al ADN



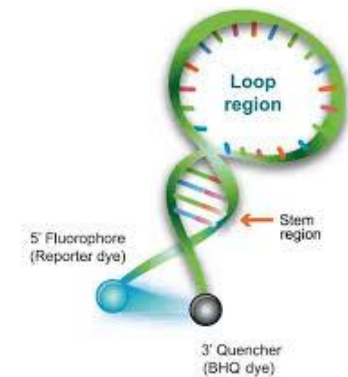
Sybr Green I

## Sondas de hidrólisis



Sondas Taqman

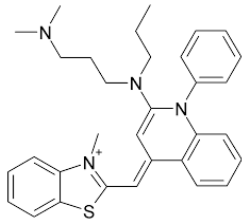
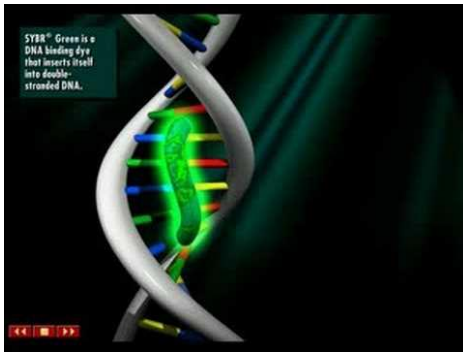
## Sondas de hibridación



Molecular beacons  
y sondas scorpions

# UTILIZACIÓN DE FLUOROCOMOS Y SISTEMAS REPORTEROS

## Sybr Green, EvaGreen



Agente intercalante que fluoresce únicamente al unirse al ADN doble cadena pero no al ADN simple cadena

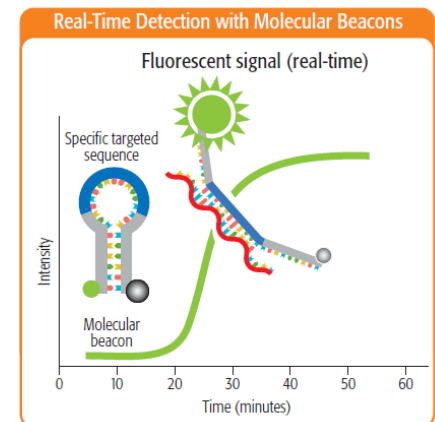
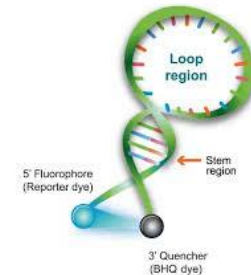
## Sonda TaqMan



Q = quencher (TAMRA)  
R = Reporter o reportero (FAM, VIC, TET y JOE)

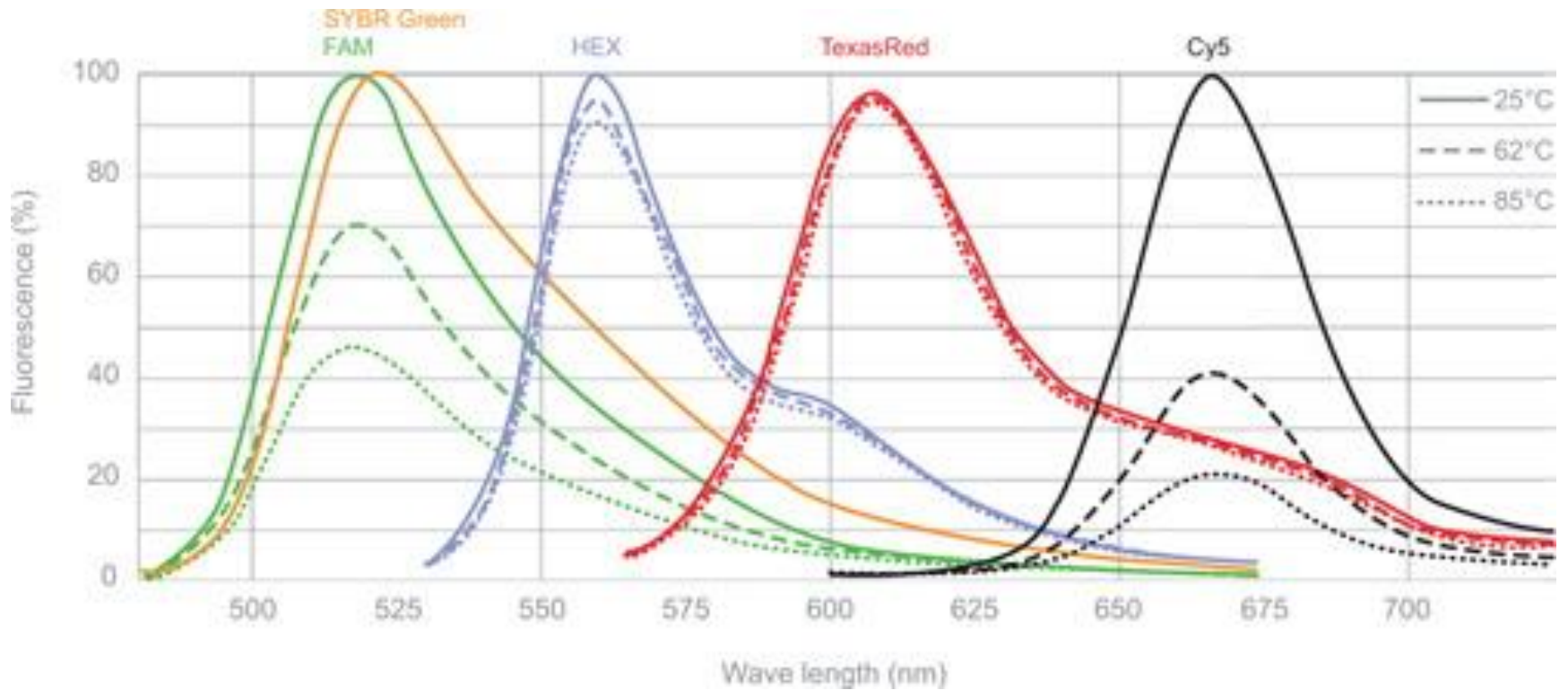
La sonda no fluoresce cuando está intacta  
Durante la amplificación la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa cliva la sonda

## Molecular beacons



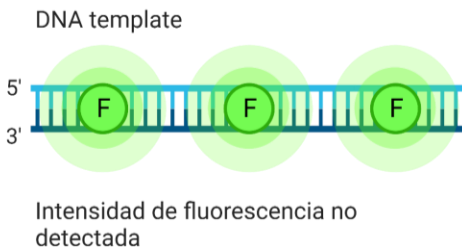
La sonda fluoresce solo cuando hibrida

# FLUORÓFOROS

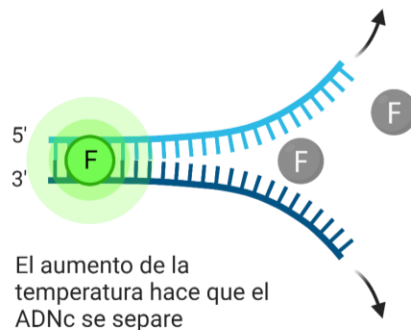


# PCR EN TIEMPO REAL BASADA EN COLORANTES FLUORESCENTES

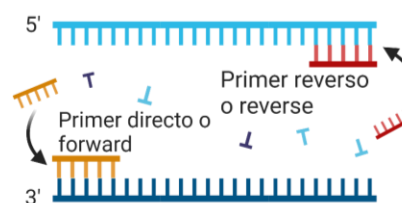
## 1 Iniciación



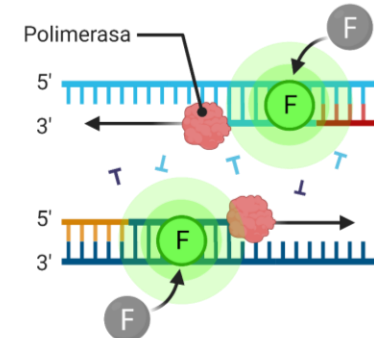
## 2 Desnaturalización (95°C)



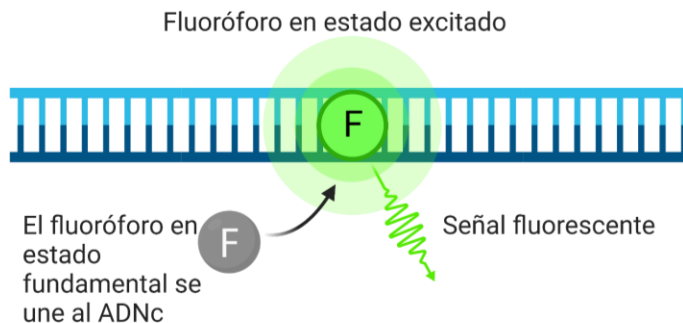
## 3 Apareamiento de los cebadores o primers (60°C)



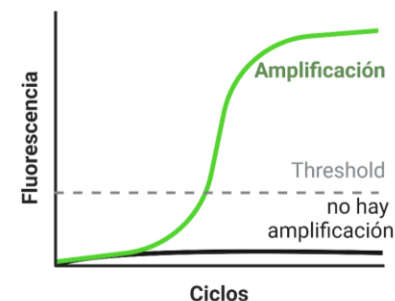
## 4 Extensión (72°C)



Cuanto mayor sea la concentración del ADNc, mayor será la señal de intensidad de fluorescencia.



## Resultados



# PCR EN TIEMPO REAL BASADA EN SONDAS FLUORESCENTES

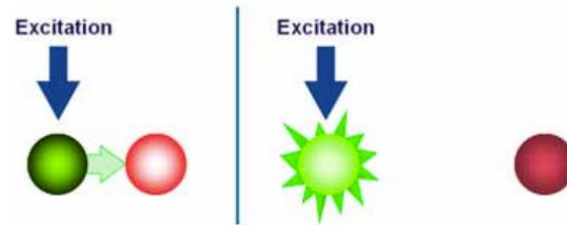
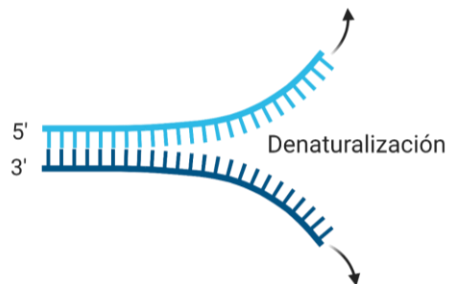


Figure 9. The FRET phenomenon. (A) FRET occurs when a green light emitting fluorescent dye is in close proximity to a red light emitting fluorescent dye. (B) FRET does not occur when the two fluorescent dyes are not in close proximity.

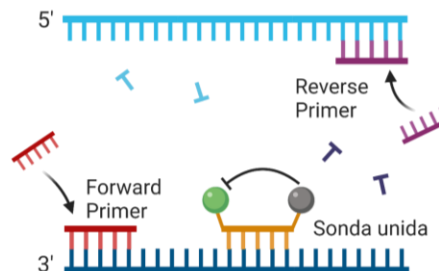
## 1 Iniciación



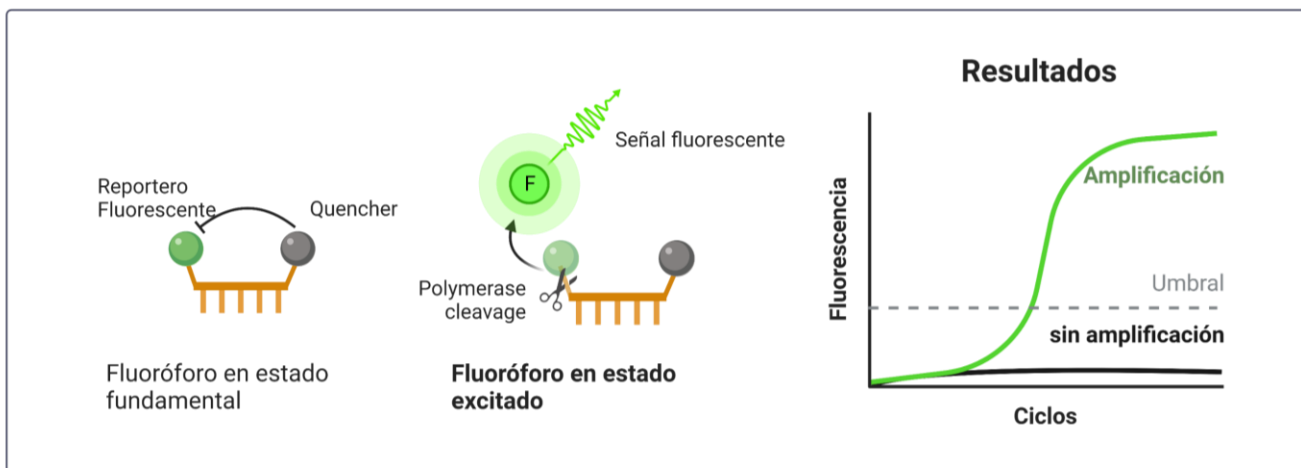
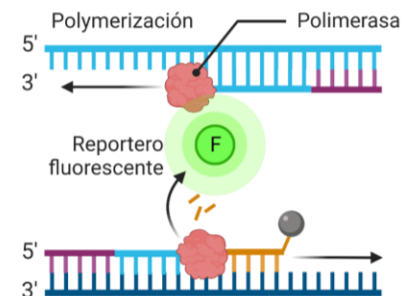
## 2 Denaturalización (95°C)



## 3 Apareamiento de los primers (60°C)



## 4 Extensión (72°C)





# SYBR GREEN Y SONDAS: VENTAJAS Y DESVENTAJAS

## Sybr Green

Unión inespecífica al ADN  
Se puede utilizar para cualquier gen  
Se debe verificar el producto  
Un único fluoróforo por tubo.  
Una única reacción por tubo  
Curvas de disociación - Permite detectar formación de dímeros

### Aplicaciones:

Expresión génica  
Cuantificación de ADN (detección de patógenos)  
CHiP

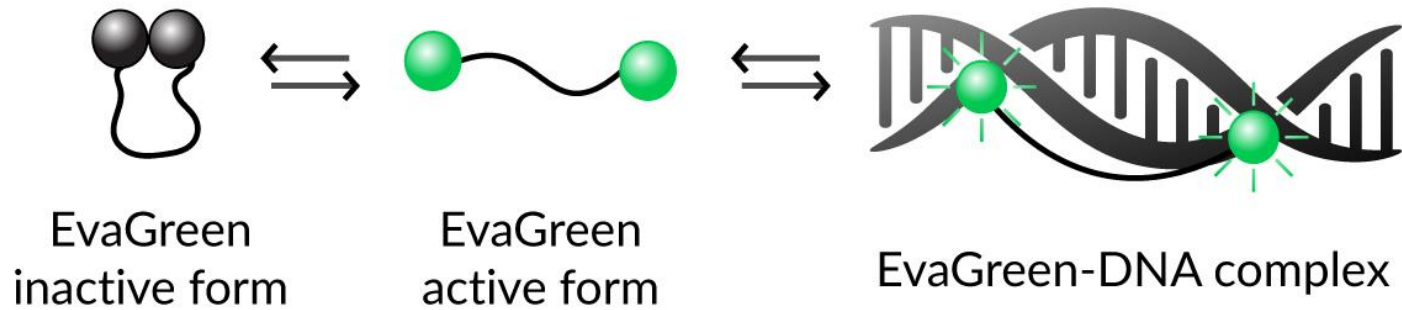
## Sondas

Unión específica al ADN  
Para cada gen a estudiar se debe utilizar una sonda diferente  
Sonda verifica producto, mayor especificidad  
Se pueden emplear varios fluoróforos en simultaneo. Multiplex  
No se puede realizar curva de disociación  
No se pueden detectar los dímeros

### Aplicaciones:

Expresión génica,  
cuantificación de ADN  
CHiP, SNP  
Número de copias  
Carga viral  
multiplex

# COLORANTES DE NUEVA GENERACIÓN



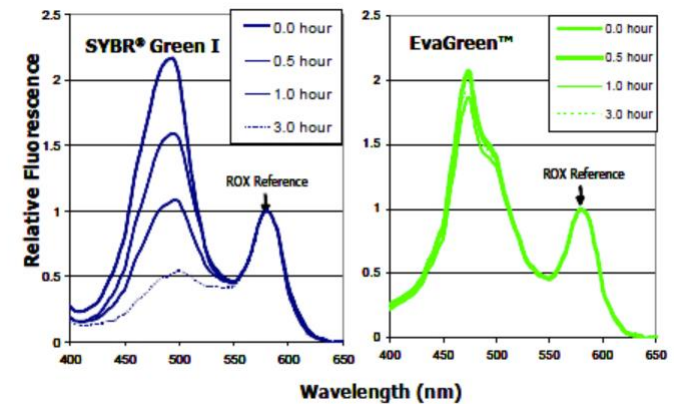
EvaGreen tiene menos *background* que SYBR® Green I.

EvaGreen es menos inhibidor en la reacción de PCR que SYBR Green, lo que permite el uso de una concentración de colorante saturada para una señal máxima y un mejor análisis de melting de alta resolución (HRM).

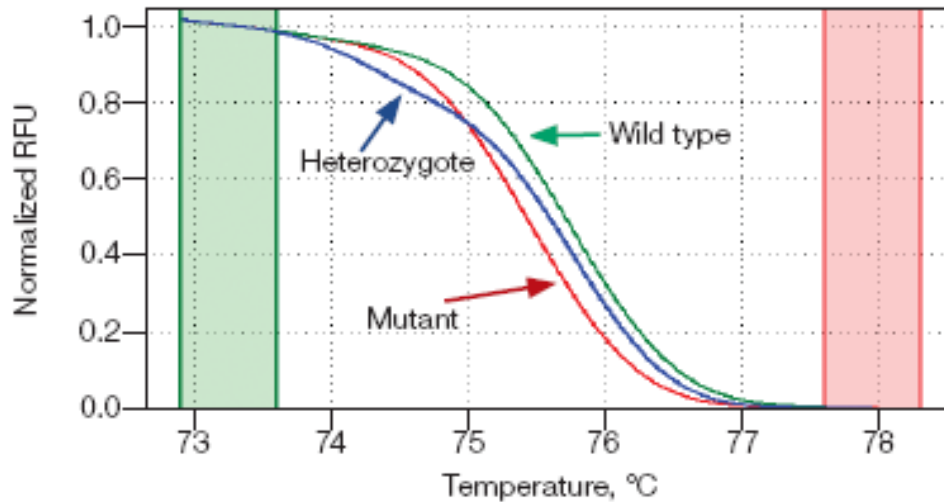
Más seguro con el medio ambiente.

EvaGreen es muy estable tanto durante el almacenamiento como en condiciones de PCR.

SYBR Green I, por otro lado, se sabe que se degrada después de múltiples ciclos de congelación y descongelación y en condiciones de PCR.

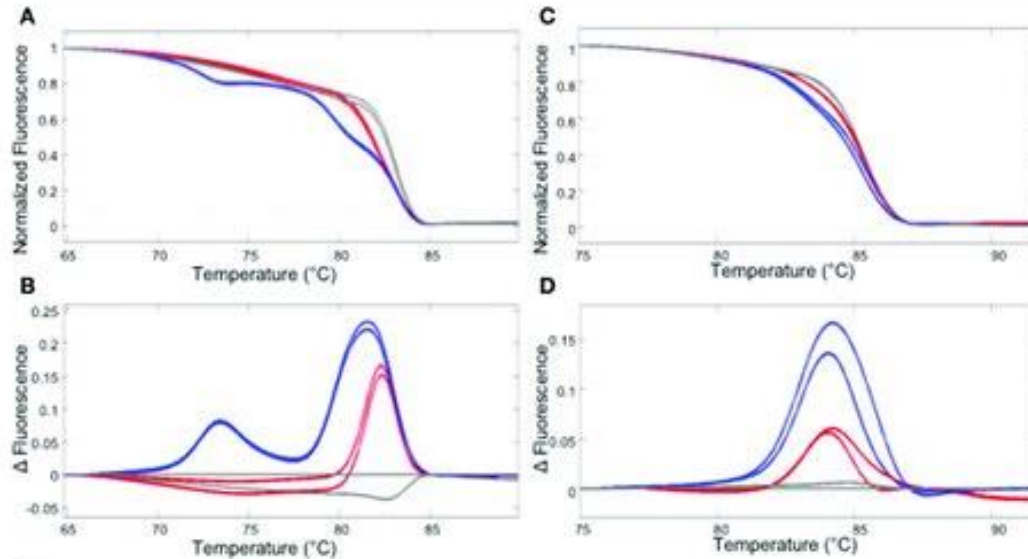


# COLORANTES DE NUEVA GENERACIÓN



**SNP genotyping by Precision Melt Analysis software using data generated by the CFX96 real-time PCR detection system.** Discrimination of human factor V coagulation SNP genotypes (C to T substitution) using SsoFast EvaGreen supermix. Data from homozygous wild type (green), mutant (red), and heterozygote (blue) samples are shown on a normalized melt curve plot. RFU, relative fluorescence units.

# ANÁLISIS HRM (*HIGH RESOLUTION MELTING*)



**E**

## At1g68170-1

```

WT      . . . agctagcaatggaagatggatggaacccaagtgtactcgtggcctatcgtctctgtttgctacacttttcattgattcct.
#2/7   . . . agctagcaatggaagatggatggaacccaagtgtactcgtggcctatcgtctctgtttgctacacttttcattgattcct.
#3/7   . . . agctagcaatggaagatggatggaacccaagtgtactcgtggcctatcgtctctgtttgctacacttttcattgattcct.
    
```

## At1g25270-2

```

WT      . . . taatcaggaagaagcggccagaaattacatggaggctgctcttactagcatttg-tttcggggttgctcgggtactcagaact.
#2/7   . . . taatcaggaagaagcggccagaaattacatggaggctgctcttactagcatttg-tttcggggttgctcgggtactcagaact.
#3/7   . . . taatcaggaagaagcggccagaaattacatggaggctgctcttactagcattt--tttcggggttgctcgggtactcagaact.
    
```

FIGURE 2 | Detecting CRISPR/CAS9 mediated editing in T1 plants using HRM. (A–D) HRM analyses using the genomic DNA from T1 plants carrying sgRNAs against two Arabidopsis genes, At1g68170 and At1g25270. All experiments were performed in two technical replicates. (A,B) The melt curve (A) and the smoothed first derivatives of the melt curves, normalized to one of the WT samples (B) for the At1g68170-1 locus. Gray lines represent WT, whereas red and blue lines represent two independent transformed lines. (C,D) The melt curve (C) and the smoothed first derivatives of the melt curves, normalized to one of the WT samples (D) for the At1g25270-2 locus. (E) Homozygous mutations found in the progenies of plants shown in (A–D). The target sequence is marked with a red square; PAM sequences are shown in red letters. Dotted squares indicate the positions of primers used for the analysis in (A–D).

# EXISTEN DIVERSOS EQUIPOS DE PCR EN TIEMPO REAL

**Los instrumentos de PCR en tiempo real constan de TRES componentes principales:**

Termociclador (máquina PCR)

Módulo óptico (para detectar fluorescencia en los tubos durante la ejecución)

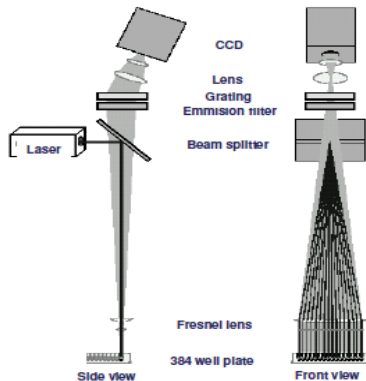
Computadora (para traducir los datos de fluorescencia en resultados significativos)

# EXISTEN DIVERSOS EQUIPOS DE PCR EN TIEMPO REAL

Applied biosystems



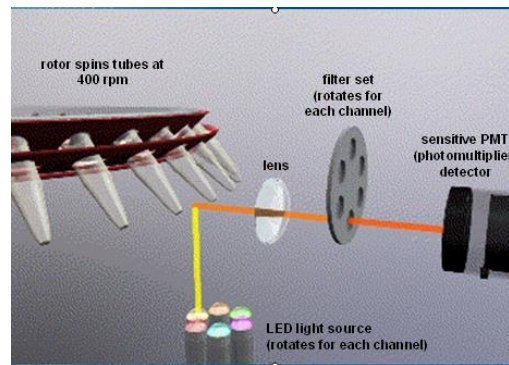
Placa: hasta 384 reacciones en paralelo



Rotor Gene (Qiagen)



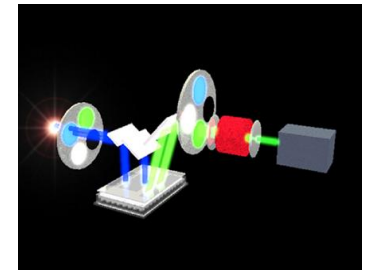
Rotor: hasta 72 muestras en paralelo



Modelo CE-IVD 4 canales (Bioron)



Placa: hasta 96 reacciones en paralelo



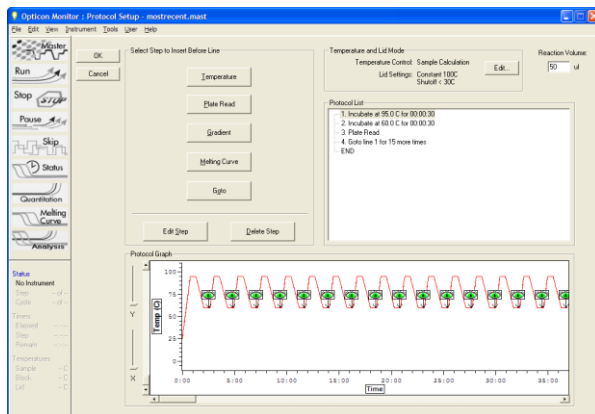
# QUÉ TIPO DE SOFTWARE SE UTILIZA CON REAL-TIME?

El software en tiempo real convierte las señales fluorescentes de cada pocillo en datos significativos.

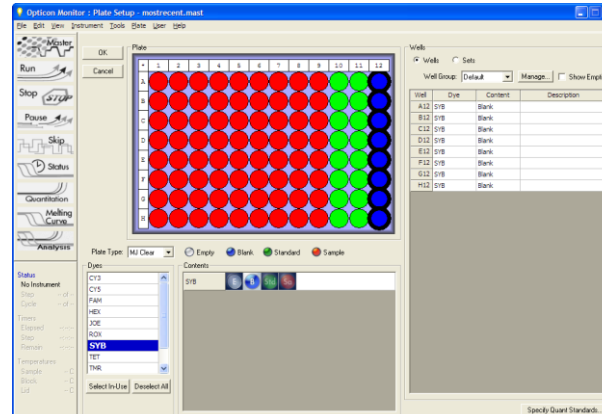
1. Configurar programa de PCR
2. Configurar el diseño de la placa
3. Recolectar datos.
4. Analizar datos.



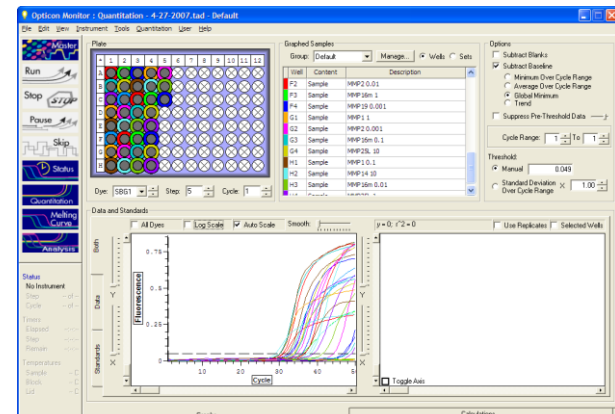
1



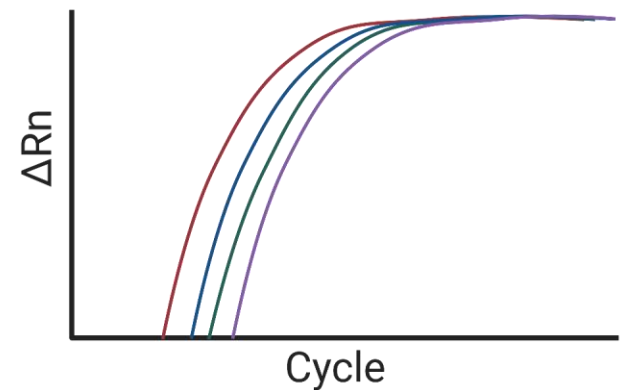
2



3,4



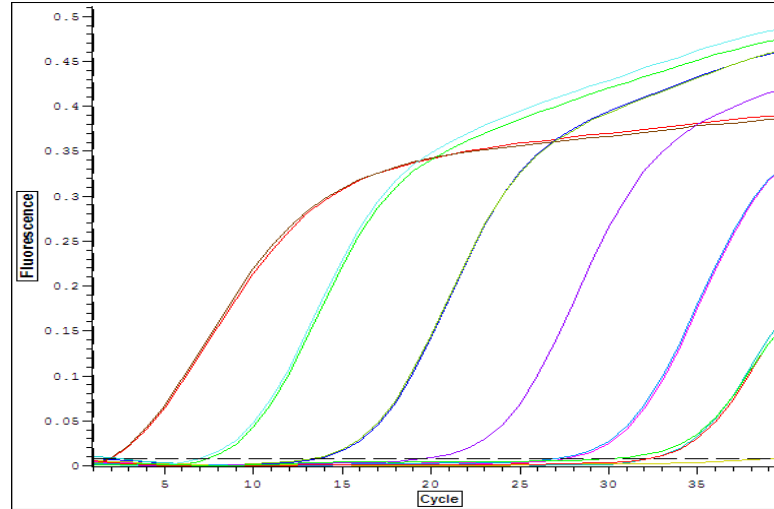
## 4. ¿CÓMO SON LOS DATOS DE LA PCR EN TIEMPO REAL?



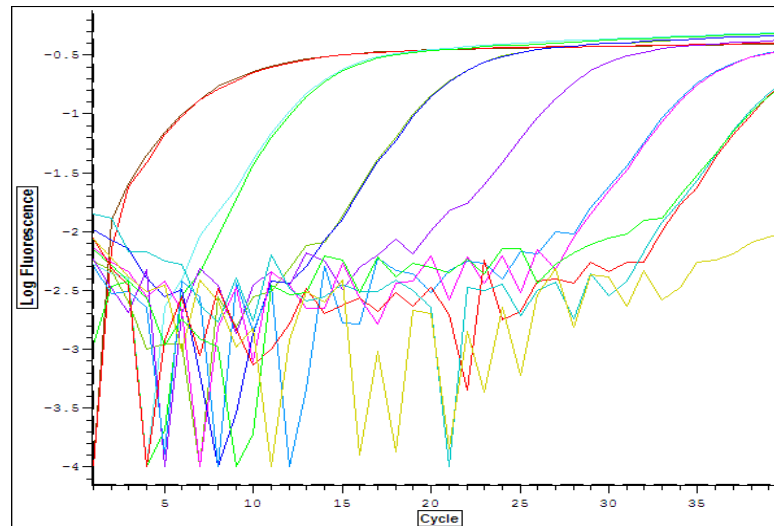


# RESULTADOS

- Resultados obtenidos a partir de diluciones de DNA

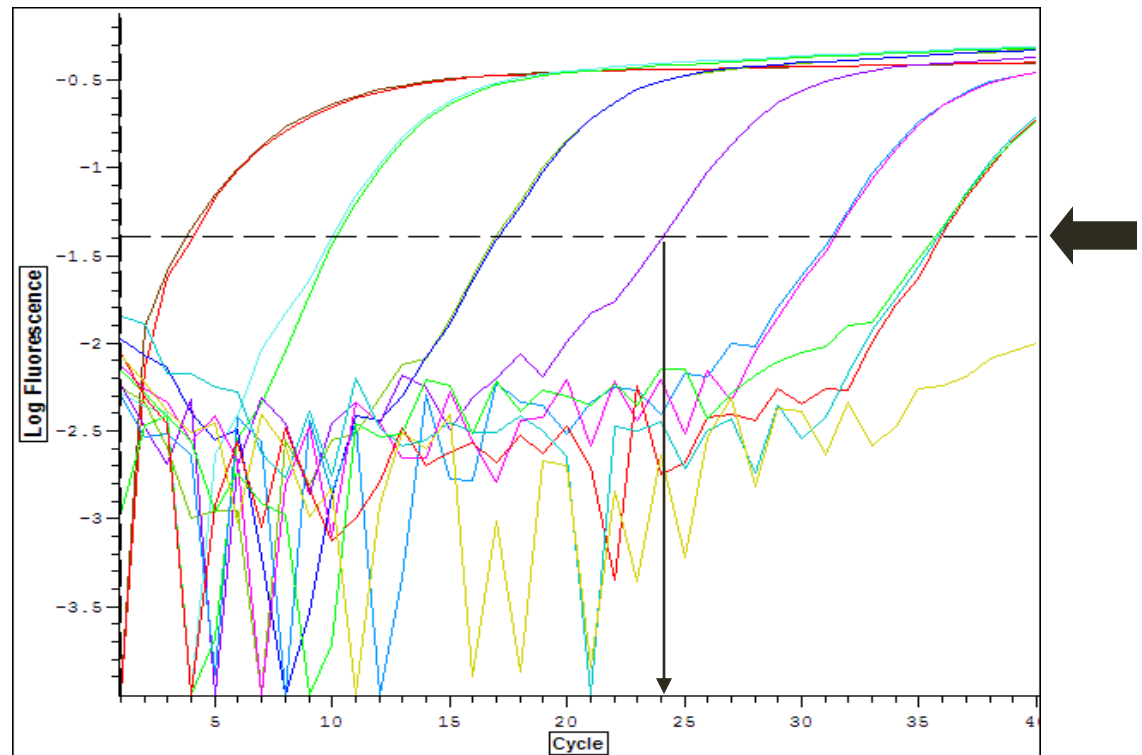


- Los mismos datos expresados en log vs ct



# RESULTADOS

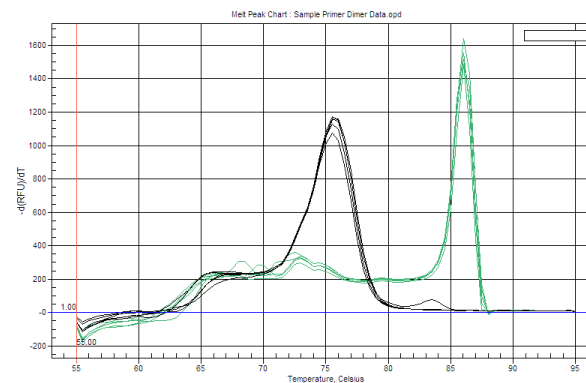
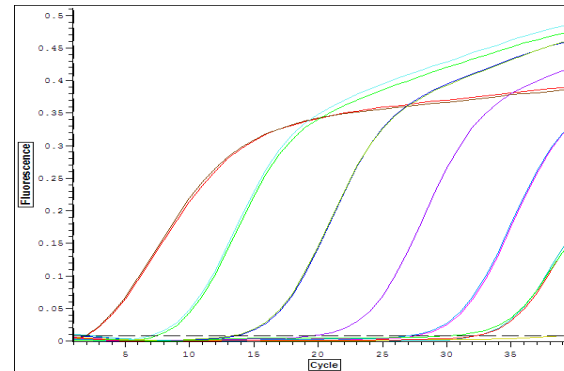
Una vez que se establece el umbral, el software puede calcular automáticamente los valores de Ct.  
automatically by software.



A continuación, los valores de Ct se pueden utilizar para calcular las cantidades de ADN molde.

# ANÁLISIS DE DATOS

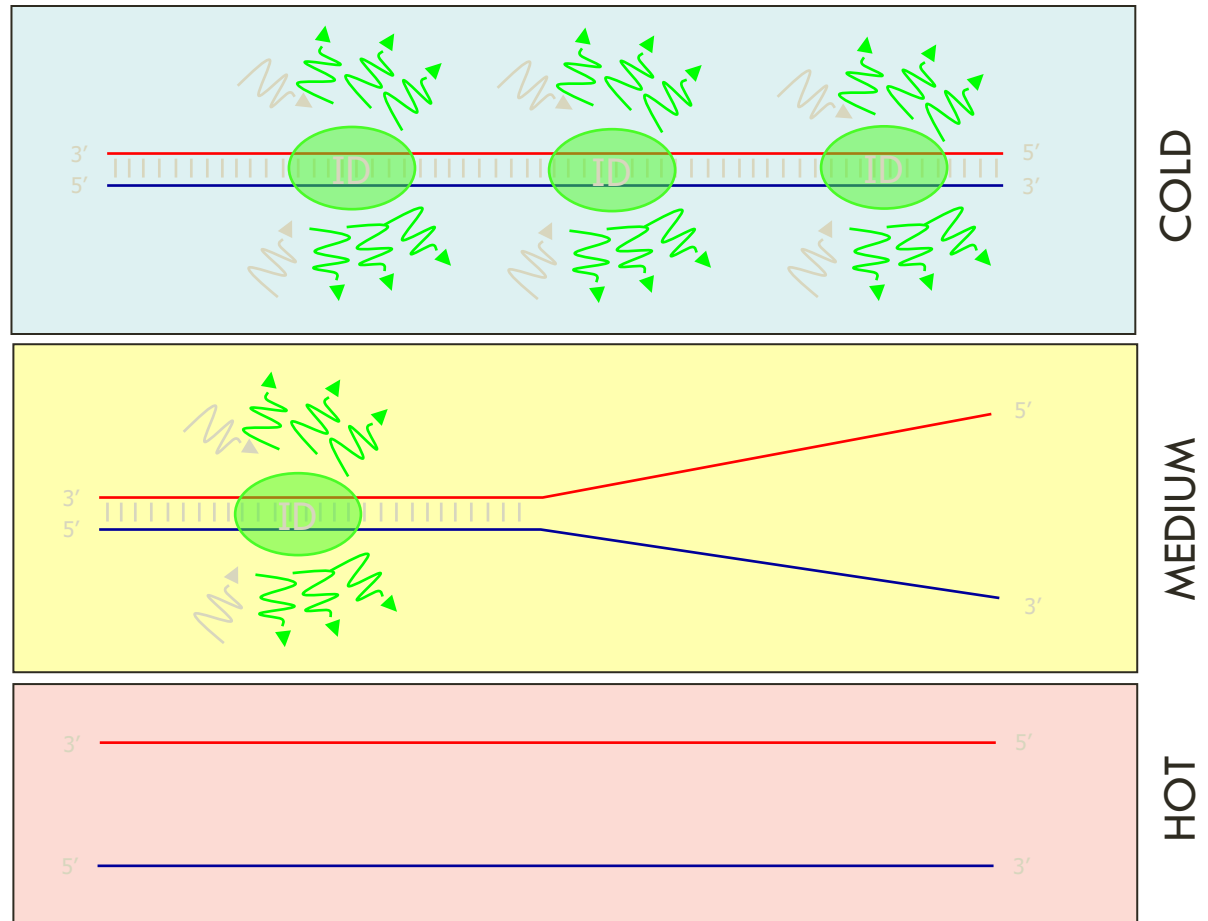
Los datos de fluorescencia recopilados durante la PCR nos dicen "cuánto"... ¡pero hay otro tipo de análisis que podemos hacer que nos dice "qué"!



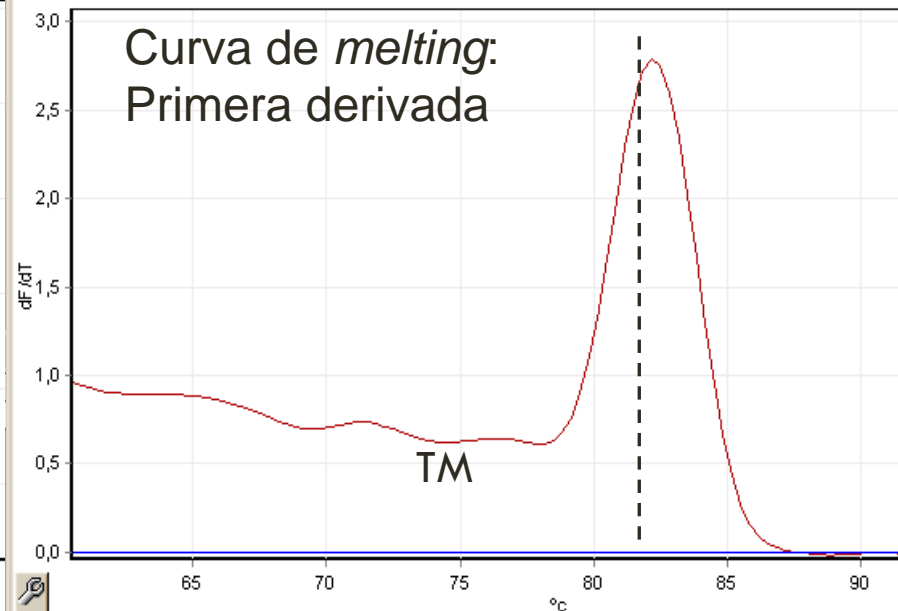
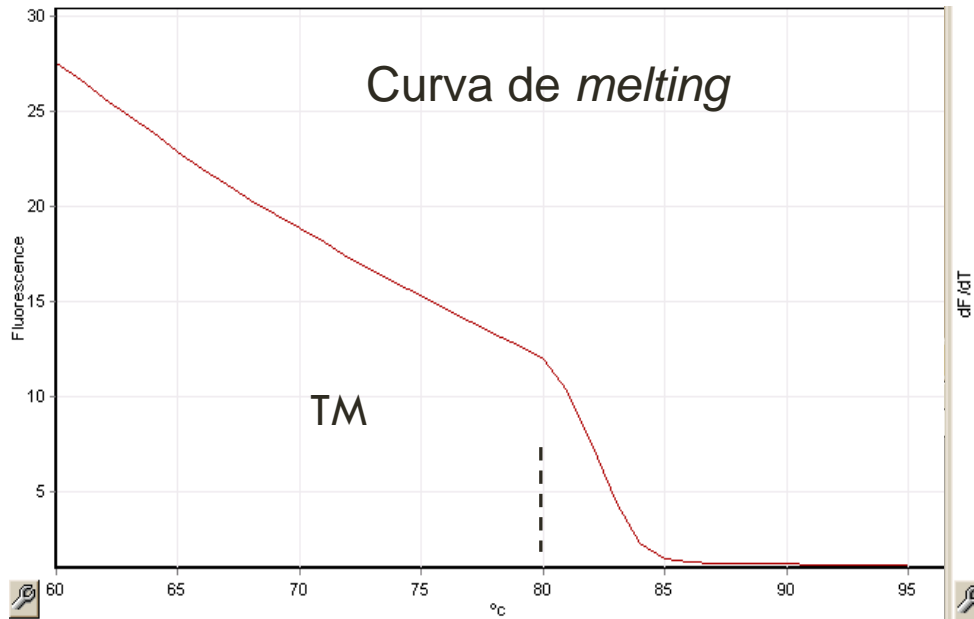
# CURVAS DE *MELTING*

Las curvas de *melting* pueden decirnos qué productos hay en una reacción.

Basado en el principio de que a medida que aumenta la temperatura el ADN se vuelve monocatenario, los fluoróforos ya no se unirán ni emitirán fluorescencia.

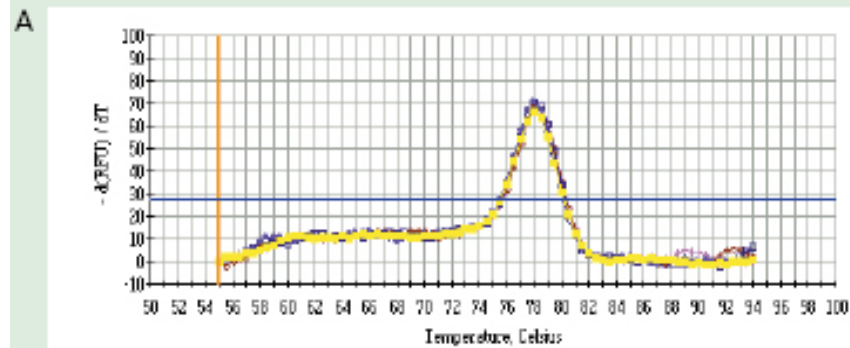


# CURVAS DE *MELTING*

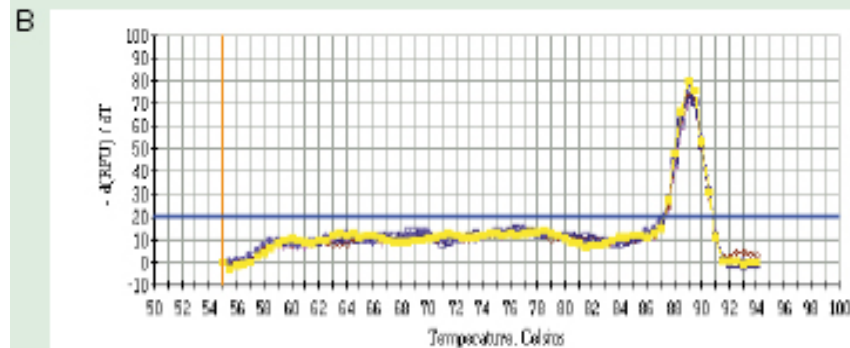


Curvas de *melting*: Aumento progresivo de la temperatura lleva a la desnaturalización del amplicón, liberación del SYBR Green y disminución de la fluorescencia. Esto permite determinar la T<sub>m</sub> del amplicón y verificar la formación de productos únicos.

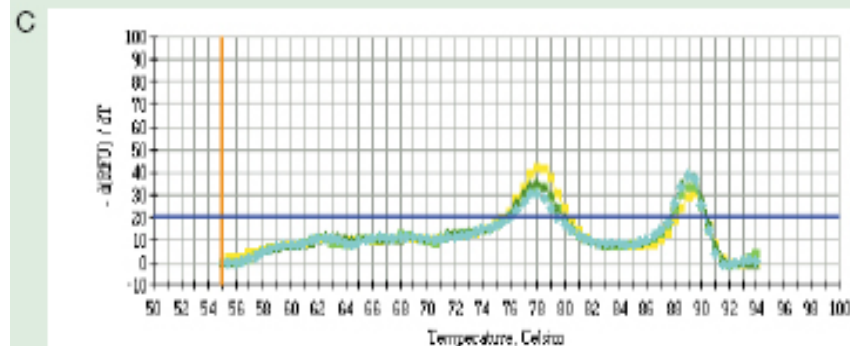
# CURVAS DE *MELTING*



curva de  $T_m$  de una qPCR sin molde, sólo con los primers



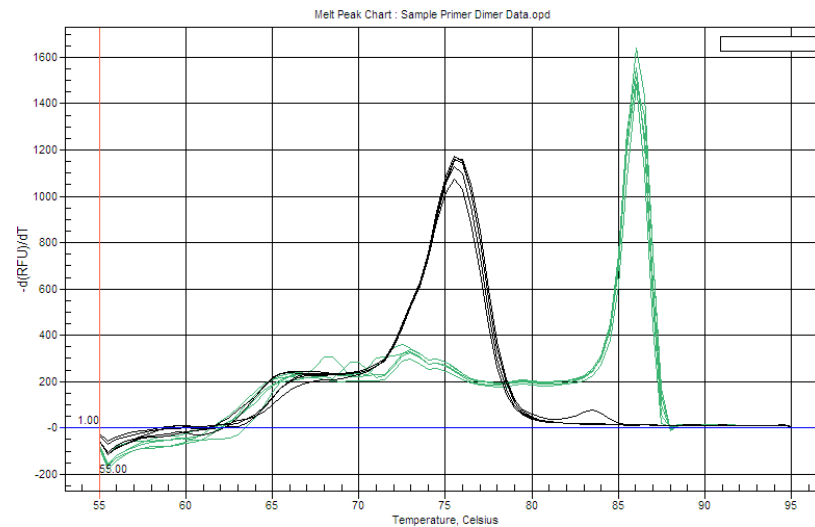
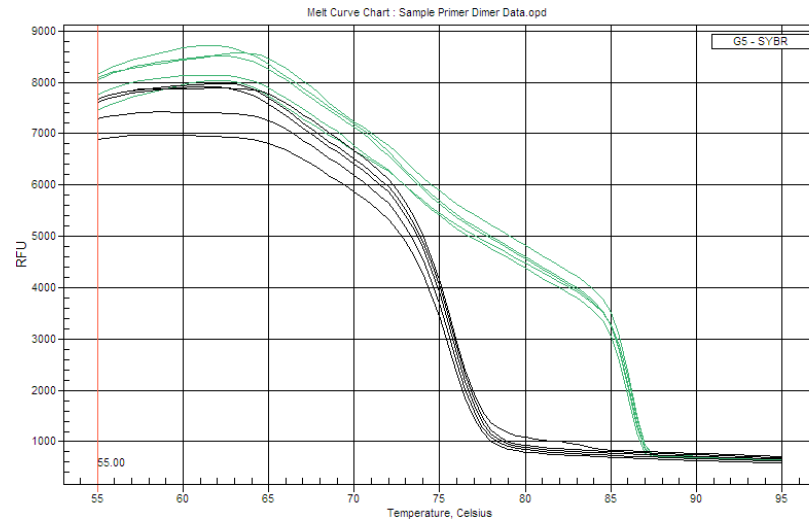
curva de  $T_m$  de una qPCR con con los primers correctamente diseñados



curva de  $T_m$  de una qPCR con con los primers incorrectamente diseñados.  
Formación de dímeros de primers

# CURVAS DE *MELTING*

Las curvas de *melting* pueden decirnos qué productos hay en una reacción.

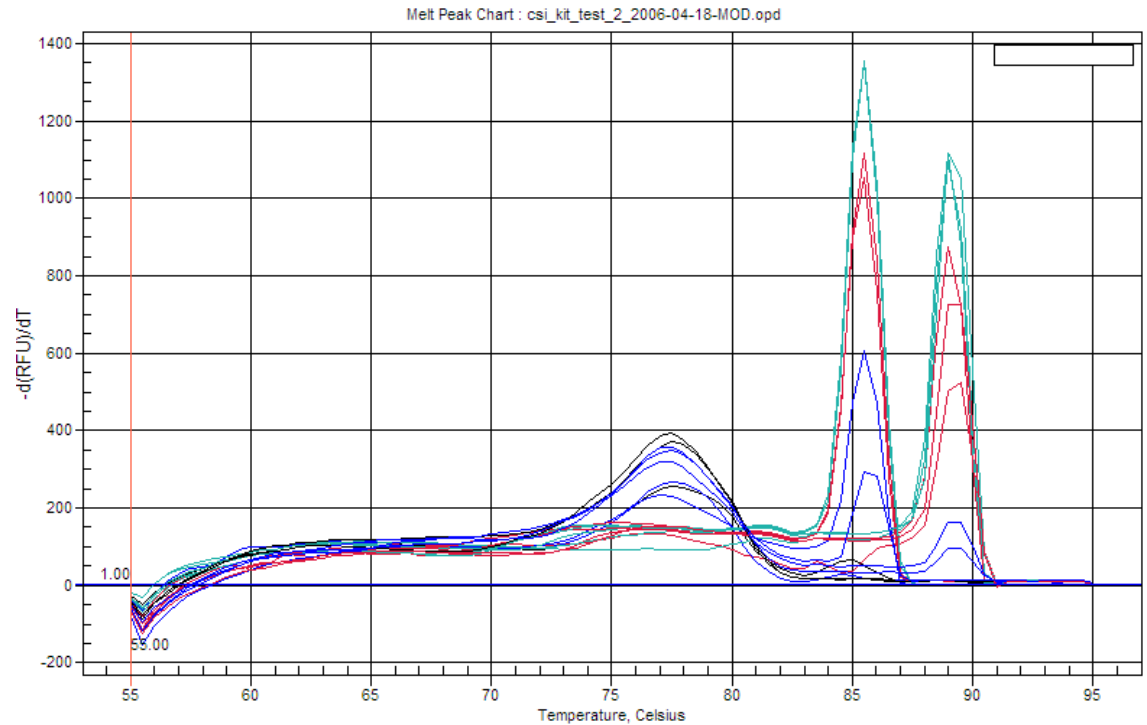


$-dRFU/dT$

## CURVAS DE *MELTING*

Diferentes amplicones tendrán diferentes picos de melting.

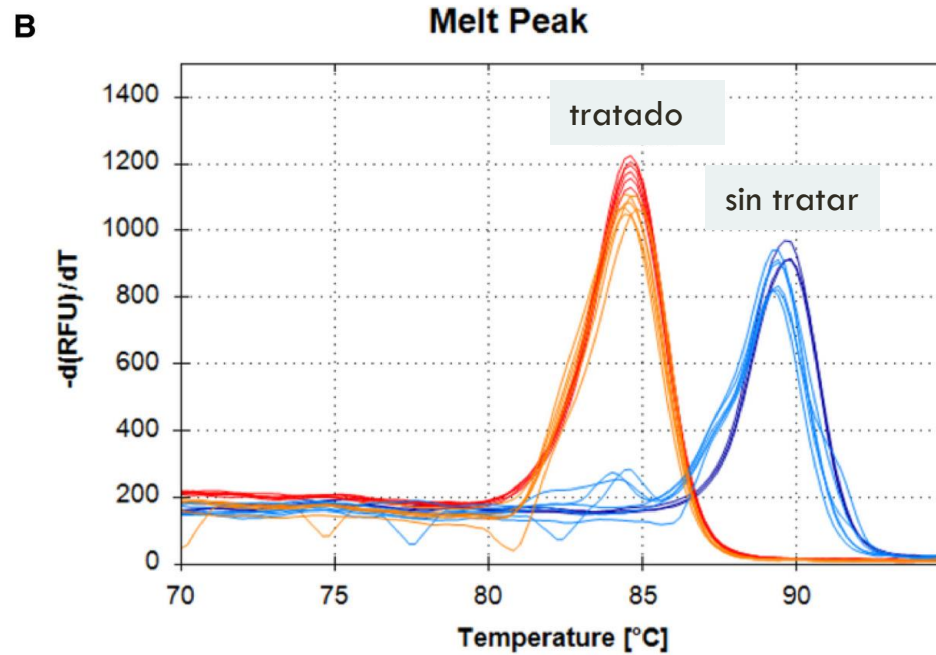
Dímeros de primers generarán un pico de *melting* muy diferente.



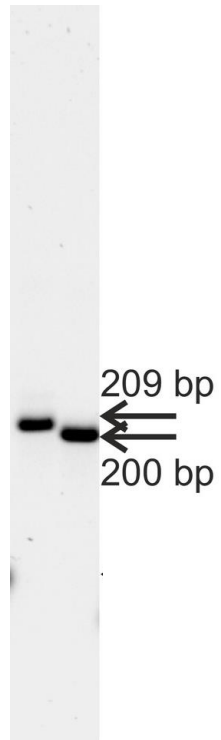
Color key: Green=100X, Red=10000X, Blue=1000000X, Black=NTC.



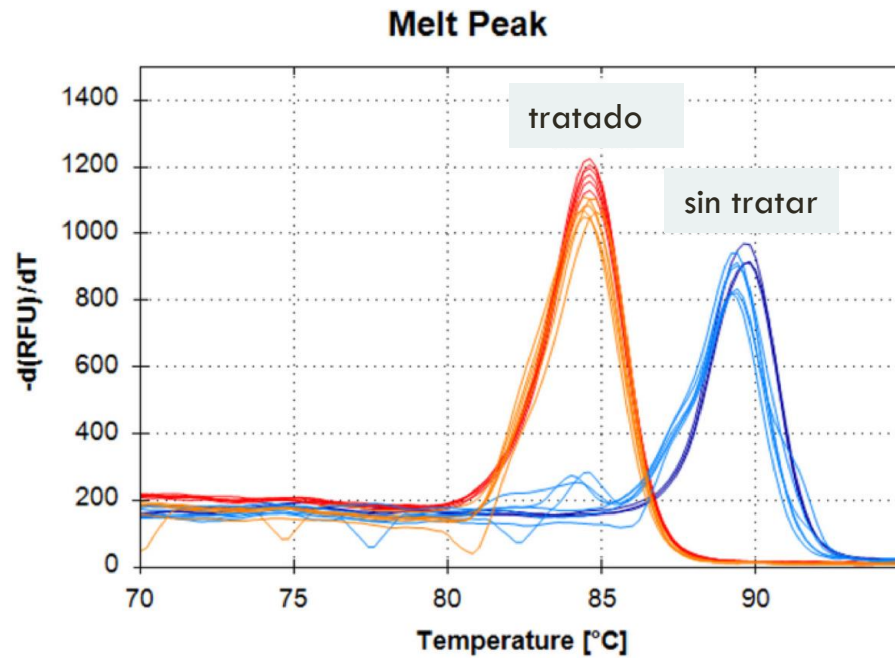
# EL DISEÑO DE PRIMERS ES FUNDAMENTAL



# EL DISEÑO DE PRIMERS ES FUNDAMENTAL



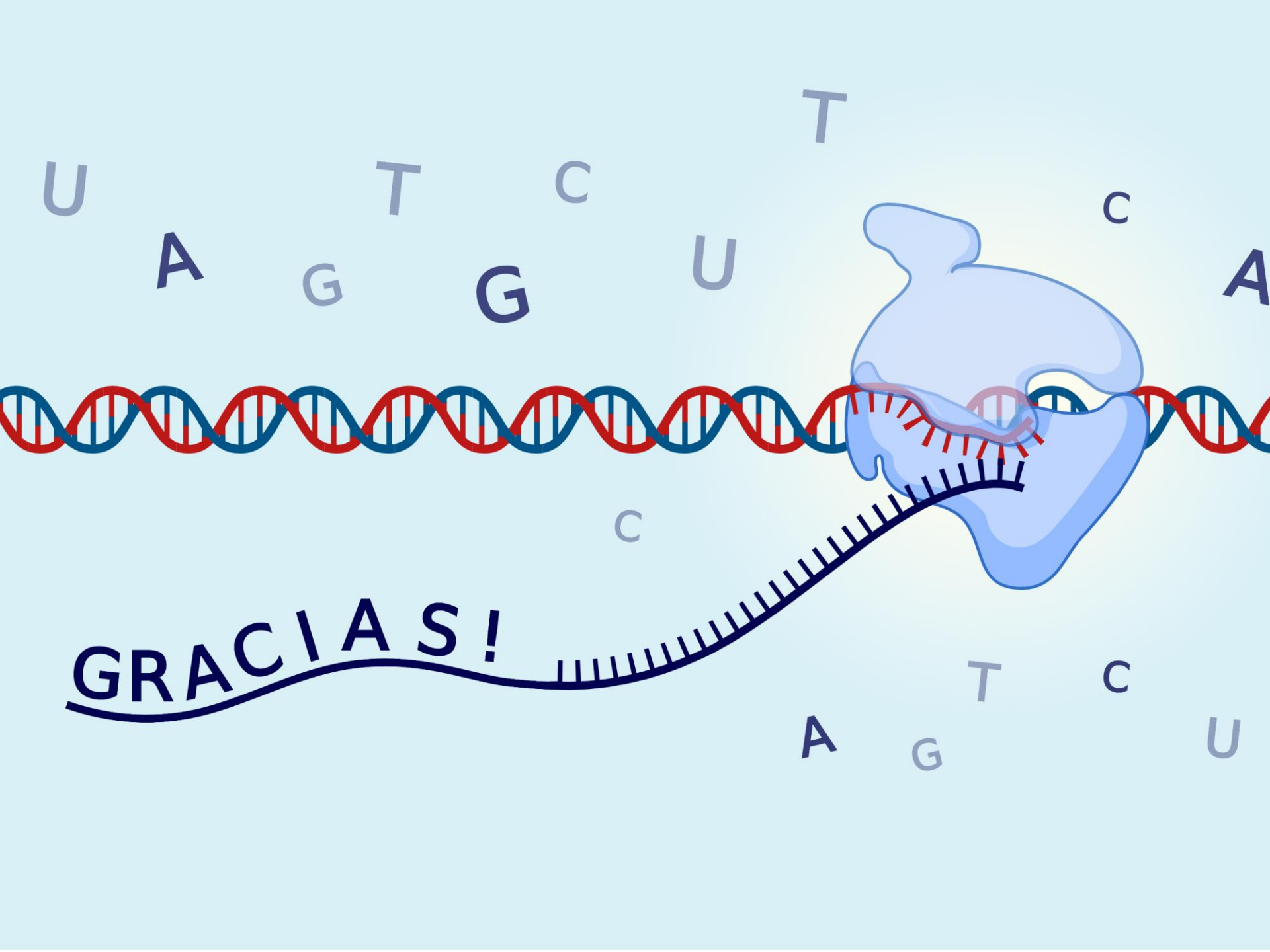
**B**



# MATERIAL DE APOYO

Real-time PCR handbook (Life technologies)

Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide  
(Agilent technologies)



**GRACIAS!**