PCR EN TIEMPO REAL: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN INVESTIGACIÓN

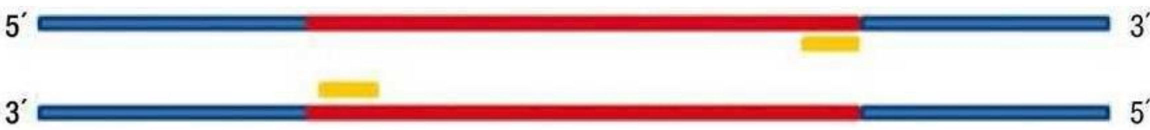
DISEÑO DE PRIMERS

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (QPCR)

Método enzimático *in vitro* de amplificación exponencial de una región de ADN determinada que permite su cuantificación en tiempo real

Involucra ciclos de desnaturalización del molde, apareamiento de cebadores y extensión de estos iniciadores

Los iniciadores empleados ("primers") hibridan con hebras opuestas y flanquean la región de interés



Iniciadores = primers = cebadores = oligonucleótidos

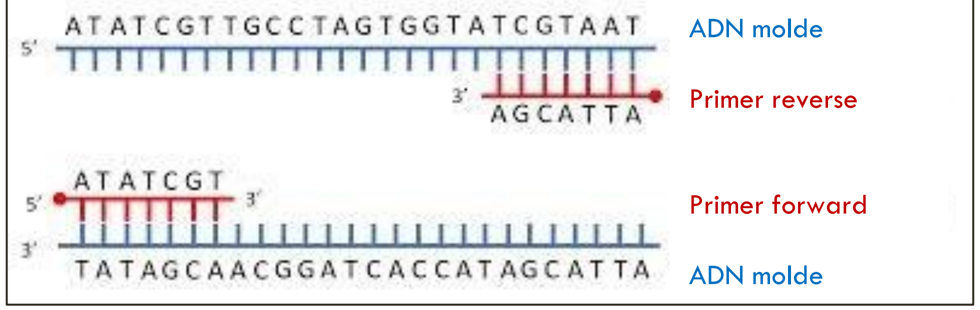
1. DISEÑO DE PRIMERS

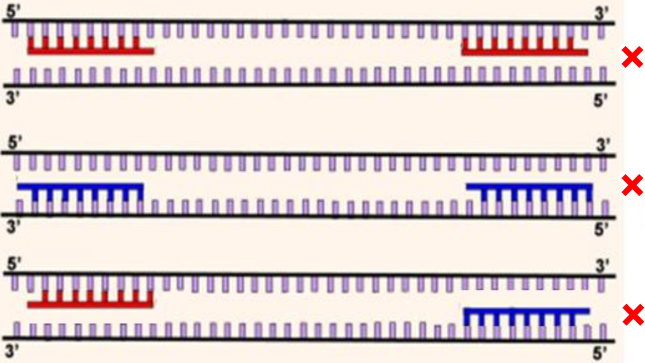
2. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL DISEÑO DE PRIMERS

3. EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE PRIMERS

SELECCIÓN DE INICIADORES: ESPECIFICIDAD

Reconocer una SECUENCIA ÚNICA dentro del ADN molde FLANQUEANDO la región de interés





SELECCIÓN DE PRIMERS

Forward

ATGGGAGAACTGGAGCCTTC 5´→3´

Reverse OJO!!!!

TTGGCTCCATATTCAATCGGT

AACCGAGGTATAAGTTAGCCA 3´→5´ complementaria

ACCGATTGAATATGGAGCCAA 5´→3´

```
ORIGIN
      901 gcagagtacc tgaaacagga agtattttaa atattttgaa tcaaatgagt taatagaatc
      961 tttacaaata agaatataca cttctgctta ggatgataat tggaggcaag tgaatcctga
     1021 gcgtgatttg ataatgacct aataatgatg ggttttattt ccagacttca cttctaatga
     1081 tgattatggg agaactggag ccttcagagg gtaaaattaa gcacagtgga agaatttcat
     1141 tctgttctca gttttcctgg attatgcctg gcaccattaa agaaaatatc atctttggtg
     1201 tttcctatga tgaatataga tacagaagcg tcatcaaagc atgccaacta gaagaggtaa
     1261 gaaactatgt gaaaactttt tgattatgca tatgaaccct tcacactacc caaattatat
     1321 atttggctcc atattcaatc ggttagtcta catatattta tgtttcctct atgggtaagc
     1381 tactgtgaat ggatcaatta ataaaacaca tgacctatgc tttaagaagc ttgcaaacac
     1441 atgaaataaa tgcaatttat tttttaaata atgggttcat ttgatcacaa taaatgcatt
     1501 ttatgaaatg gtgagaattt tgttcactca ttagtgagac aaacgtcctc aatggttatt
     1561 tatatggcat gcatataagt gatatgtggt atctttttaa aagataccac aaaatatgca
```

EL DISEÑO DE PRIMERS PARA UNA PCR ES FUNDAMENTAL

Características a evaluar:

- Longitud
- Contenido GC
- Especificidad
- Temperatura de melting (Tm)
- Complementariedad de secuencias

- ✓ 18 a 25 nucleótidos (Evitar A o T en 3’ si es posible)
- ✓ Entre 40 - 60 % (Evitar repeticiones de más de 4 nt)
- ✓ Blast
- ✓ Entre 55 y 65 °C
- ✓ Evitar estructuras secundarias, auto- complementariedad, dímeros de primers

Amplicones de entre 80 y 150 pb

LONGITUD DEL PRIMER

Asegurar la unión estable entre el primer y el ADN molde

La longitud de la secuencia es fundamental para la asociación (Especificidad)

Muy cortos: falla especificidad

Muy largos: fallas en el annealing (bajo rendimiento)

TEMPERATURA DE MELTING (TM)

Temperatura a la cual la mitad de las moléculas de primer están apareadas al ADN molde

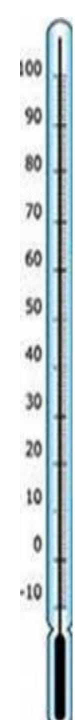
Depende de la longitud y la composición del primer. Tm teórica = 2 (A+T) + 4 (G+C)

Los primers deben tener Tm similares entre sí (menos de 3ºC de diferencia)

La temperatura de annealing depende de la temperatura de melting o fusión (Tm) de los primers:

- Temperatura de annealing por debajo de la Tm más baja del par de primers (hasta 5ºC por debajo)

TEMPERATURA DE ANNEALING



Bajo rendimiento o no amplificación

Óptima

Inespecificidad

- **3-step cycling**

Cycles	Temp.	Time	Notes
1	*95 °C	*2 min	Polymerase activation
40	95 °C 60-65 °C 72 °C	5 s 10 s **5-20 s	Denaturation Annealing Extension (acquire at end of step)

- **2-step cycling**

Cycles	Temp.	Time	Notes
1	*95 °C	*2 min	Polymerase activation
40	95 °C 60-65 °C	5 s **15-30 s	Denaturation Annealing/extension (acquire at end of step)

SYBR Green

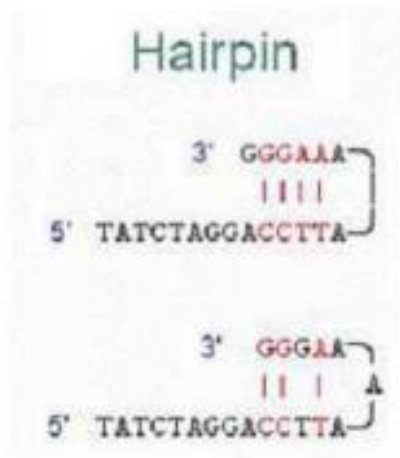
COMPLEMENTARIEDAD DE SECUENCIAS

Intra-primer

El primer se pliega sobre sí mismo en una

estructura doble cadena

(interfiere con el annealing al ADN molde)



Inter-primer

Formación de dímeros

Disminuye la formación de producto por competencia

Self-Dimer

8 bp

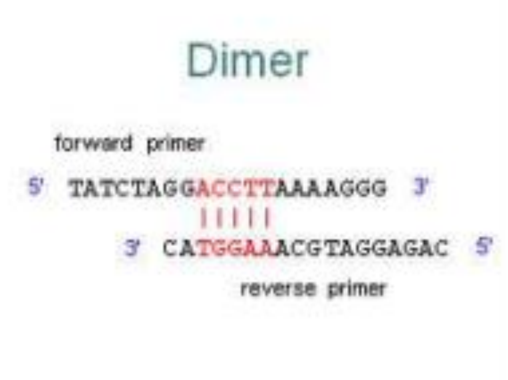
3' GGGAAAATTCCAGGATCTAT 5'

5' TATCTAGGACCTTAAAAGGG 3'

4 bp

3' GGGAAAATTCCAGGATCTAT 5'

5' TATCTAGGACCTTAAAAGGG 3'



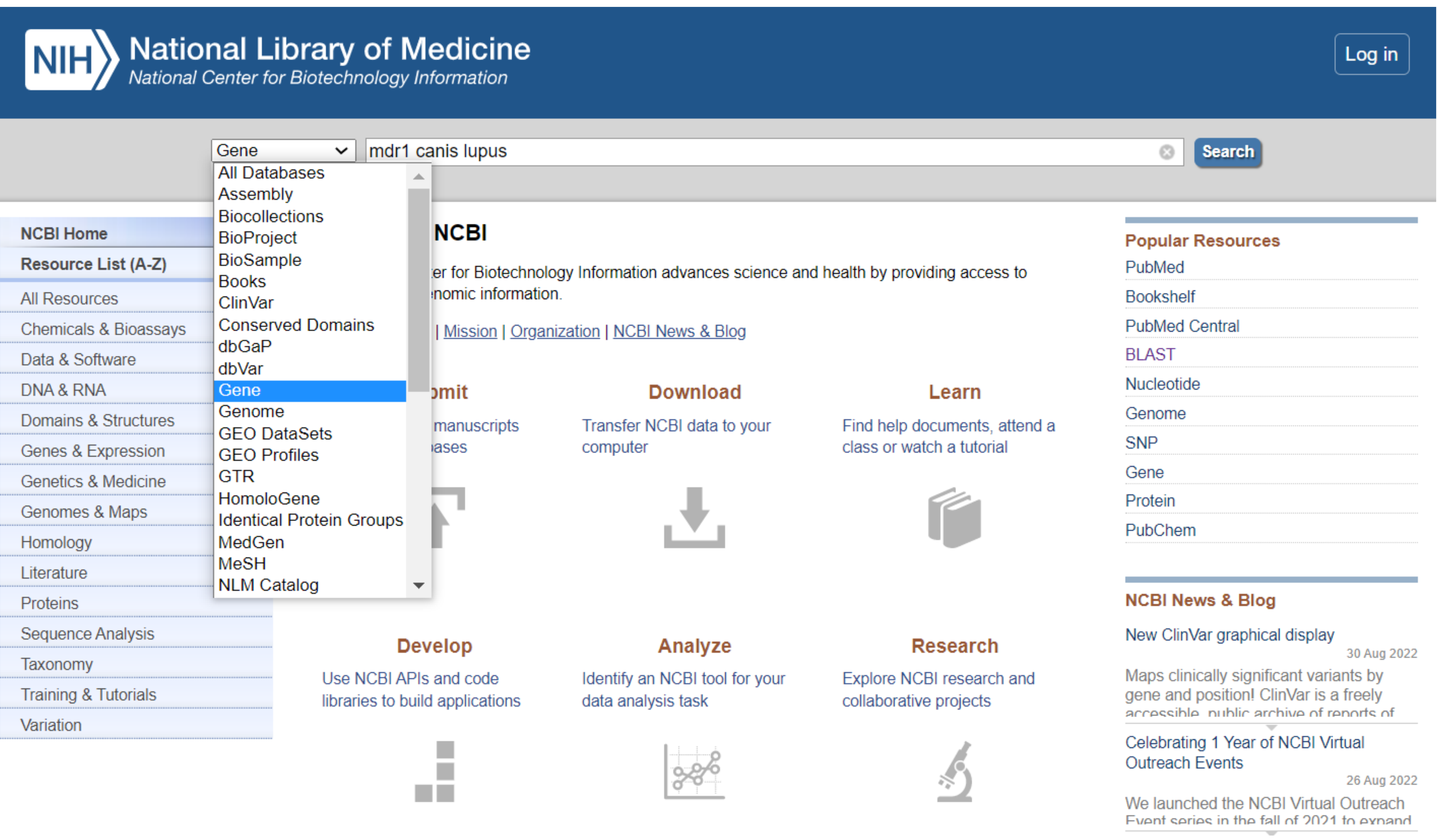
1. DISEÑO DE PRIMERS

2. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL DISEÑO DE PRIMERS

3. EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE PRIMERS

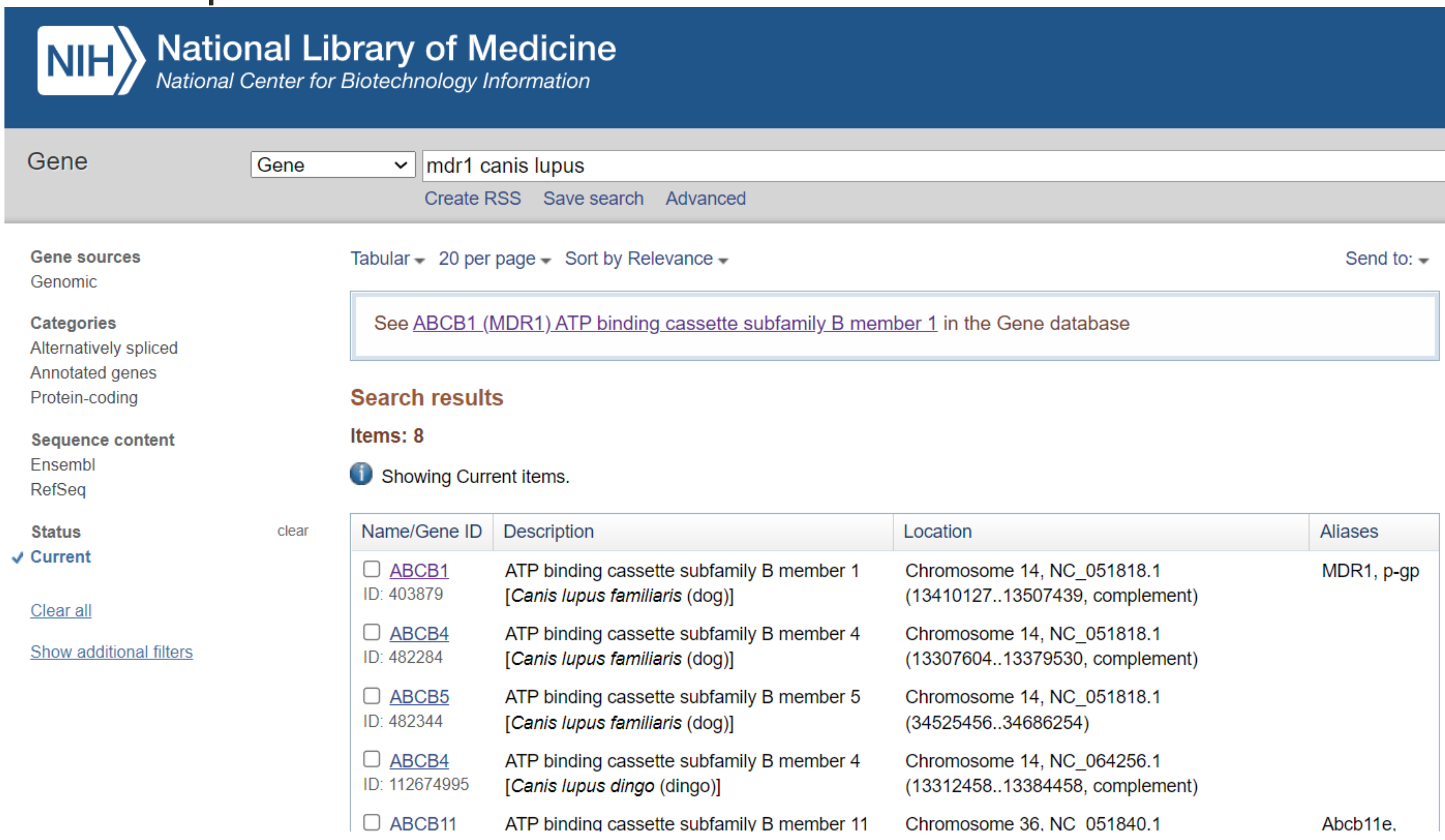
DISEÑO DE PRIMERS

Búsqueda de la secuencia de interés en bases de datos



DISEÑO DE PRIMERS

Búsqueda de la secuencia de interés en bases de datos



DISEÑO DE PRIMERS

Búsqueda de la secuencia de interés en bases de datos

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

NEW Try the new Transcript table

RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

RefSeqs of Annotated Genomes: Canis lupus familiaris Annotation Release 106 details...

The following sections contain reference sequences that belong to a specific genome build. Explain

Reference ROS_Cfam_1.0

Genomic

1. **NC_051818.1 Reference ROS_Cfam_1.0**

Range	13410127..13507439 complement
Download	GenBank, FASTA, Sequence Viewer (Graphics)

mRNA and Protein(s)

1. XM_038685912.1 → XP_038541840.1 **ATP-dependent translocase ABCB1 isoform X1**

UniProtKB/TrEMBL	A0A8C0L6Y9, A0A8C0MHY8, F1PH01
Related	ENSCAFP00845011123.1, ENSCAFT00845014360.1

Conserved Domains (1) summary

PTZ00265 Location:48 → 1269	PTZ00265; multidrug resistance protein (mdr1); Provisional

2. XM_038685913.1 → XP_038541841.1 **ATP-dependent translocase ABCB1 isoform X2**

Conserved Domains (1) summary

PTZ00265 Location:10 → 1231	PTZ00265; multidrug resistance protein (mdr1); Provisional

DISEÑO SOBRE ADNc SIN INTRONES

For intron spanning primers the first half of the oligo must hybridize to the 3' end of one exon and to the 5' end of the other exon. In this way only cDNA will be amplified and not gDNA (fig. 11).

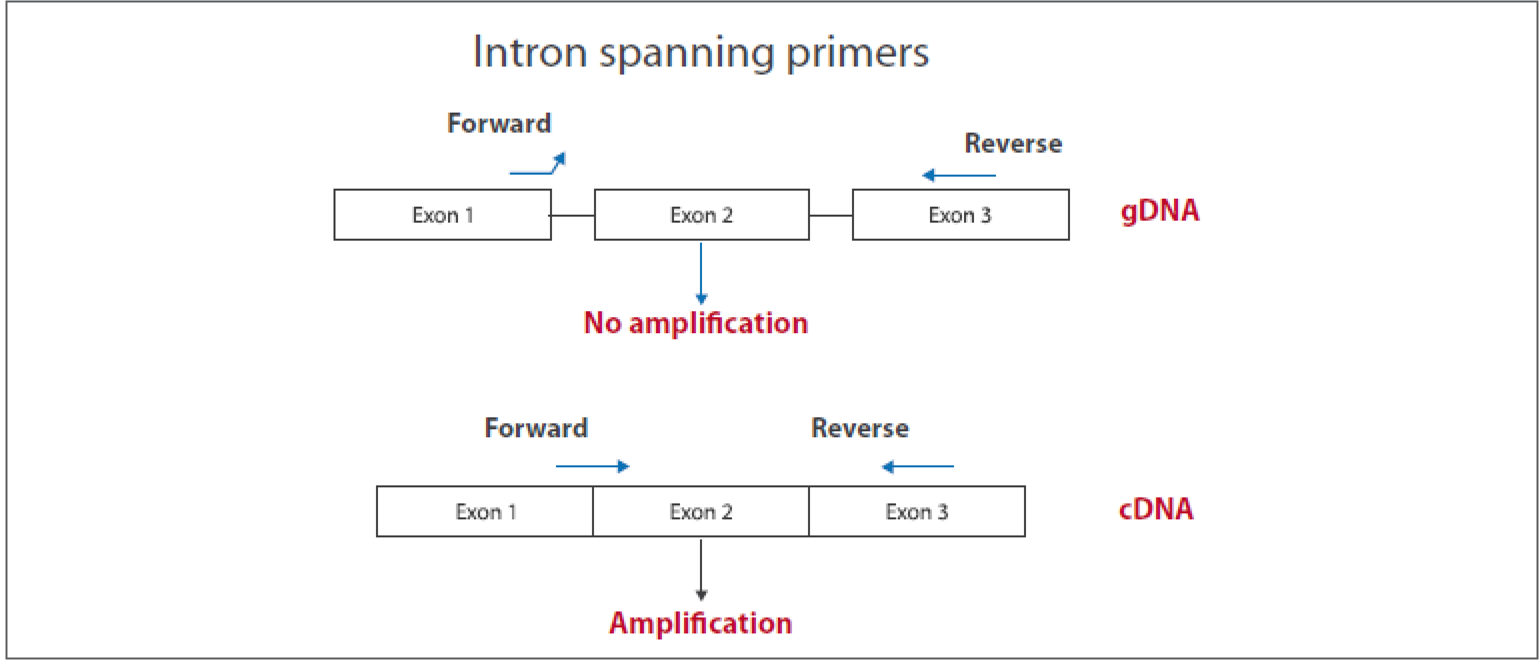


Figure 11. Intron spanning primers

DNAsa I

DISEÑO DE PRIMERS

TcCLB.509153.90

expand all | collapse all

Search section names...

1 Gene models
2 Annotation, curation and identifiers
3 Link outs
4 Genomic Location
5 Literature
6 Taxonomy
7 Orthology and synteny
8 Phenotype
9 Genetic variation
10 Transcriptomics
11 Sequence analysis
12 Sequences
13 Structure analysis
14 Protein features and properties
15 Function prediction
16 Pathways and interactions
17 Proteomics
18 Immunology

expand all | collapse all

Predicted RNA/mRNA Sequence (Introns spliced out)

Copy to clipboard

1566 bp

```
ATGTCGCTGTTTAAGATCCGCATGCCGGAGACGGTGGCGGAGGGGACACGTCTCGCACTGCGTGCCTTTTCCCTCGTTGT
AGCGGTCGACGAGCACGGCGGCATTGGGGACGGGCGGTCGATCCCATGGAATGTGCCCGAGGACATGAAGTTTTTCCGGG
ATTTGACAACAAAACTGCGGGGGAAGAACGTCAAACCATCGCCTGCGAAGCGCAACGCCGTTGTGATGGGCCGCAAGACG
TGGGACAGCATTCCGCCCAAATTCCGCCCGCTTCCCGGTCGCCTGAACGTCGTTTTGTCGTCCACCCTCACGACGCAACA
CCTCTTGGACGGCCTGCCAGACGAAGAAAAACGGAATTTGCATGCCGACAGCATTGTGGCGGTAAATGGTGGACTCGAGC
AGGCATTGCGGTTGCTCGCGTCCCCCAATTACACGCCGAGCATTGAGACGGTCTACTGCATTGGTGGCGGCTCTGTGTAT
GCGGAGGCCCTTCGCCCGCCGTGCGTTCATTTGCTGCAAGCCATTTACCGCACCACCATCCGCGCCAGCGAGTCTTCTTG
CAGCGTGTTTTTTCGCGTTCCCGAGTCGGGTACGGAGGCGGCGGCGGGGATTGAGTGGCAGCGGGAGACAATCTCCGAGG
AGCTCACGTCGGCAAACGGCAACGAGACAAAGTACTACTTTGAGAAGCTCATCCCACGCAACAGAGAGGAGGAGCAGTAT
CTAAGCCTTGTGGATCGCATCATACGCGAGGGGAATGTGAAGCATGACCGCACTGGGGTGGGCACGCTCTCCATCTTTGG
CGCACAGATGCGTTTCTCGCTCCGCAACAATCGCCTACCACTTTTGACAACGAAGCGGGTTTTTTGGCGCGGTGTGTGCG
```

Show more

Genomic Sequence

Copy to clipboard

1566 bp

```
ATGTCGCTGTTTAAGATCCGCATGCCGGAGACGGTGGCGGAGGGGACACGTCTCGCACTGCGTGCCTTTTCCCTCGTTGT
AGCGGTCGACGAGCACGGCGGCATTGGGGACGGGCGGTCGATCCCATGGAATGTGCCCGAGGACATGAAGTTTTTCCGGG
ATTTGACAACAAAACTGCGGGGGAAGAACGTCAAACCATCGCCTGCGAAGCGCAACGCCGTTGTGATGGGCCGCAAGACG
TGGGACAGCATTCCGCCCAAATTCCGCCCGCTTCCCGGTCGCCTGAACGTCGTTTTGTCGTCCACCCTCACGACGCAACA
CCTCTTGGACGGCCTGCCAGACGAAGAAAAACGGAATTTGCATGCCGACAGCATTGTGGCGGTAAATGGTGGACTCGAGC
AGGCATTGCGGTTGCTCGCGTCCCCCAATTACACGCCGAGCATTGAGACGGTCTACTGCATTGGTGGCGGCTCTGTGTAT
GCGGAGGCCCTTCGCCCGCCGTGCGTTCATTTGCTGCAAGCCATTTACCGCACCACCATCCGCGCCAGCGAGTCTTCTTG
CAGCGTGTTTTTTCGCGTTCCCGAGTCGGGTACGGAGGCGGCGGCGGGGATTGAGTGGCAGCGGGAGACAATCTCCGAGG
AGCTCACGTCGGCAAACGGCAACGAGACAAAGTACTACTTTGAGAAGCTCATCCCACGCAACAGAGAGGAGGAGCAGTAT
CTAAGCCTTGTGGATCGCATCATACGCGAGGGGAATGTGAAGCATGACCGCACTGGGGTGGGCACGCTCTCCATCTTTGG
CGCACAGATGCGTTTCTCGCTCCGCAACAATCGCCTACCACTTTTGACAACGAAGCGGGTTTTTTGGCGCGGTGTGTGCG
```

HERRAMIENTAS DE DISEÑO DE PRIMERS

bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager | Help | About | Source Code

Task: Detection

Detection
Cloning
Sequencing
Primer_List
Primer_Check

Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Pick Primers | Reset Form

Main ...ettings | Advanced Settings | Internal Oligo | Penalty Weights | Sequence Quality

Sequenc...

Paste source sequence below

Or upload sequence file: Seleccionar archivo Ningún archi...seleccionado Upload File

Mark selected region: < > | [ ] | { } | Clear

Excluded Regions: < >

Targets: [ ]

Included Region: { }

DETECCIÓN

SECUENCIACIÓN

CLONACIÓN

HERRAMIENTAS DE DISEÑO DE PRIMERS

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager | Help
About | Source Code

Task: Detection — *Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.* — Pick Primers | Reset Form

Main | General Settings | Advanced Settings | Internal Oligo | Penalty Weights | Sequence Quality

Sequence Id:

Paste source sequence below — Or upload sequence file: Seleccionar archivo Ninguno …hivo selec. Upload File

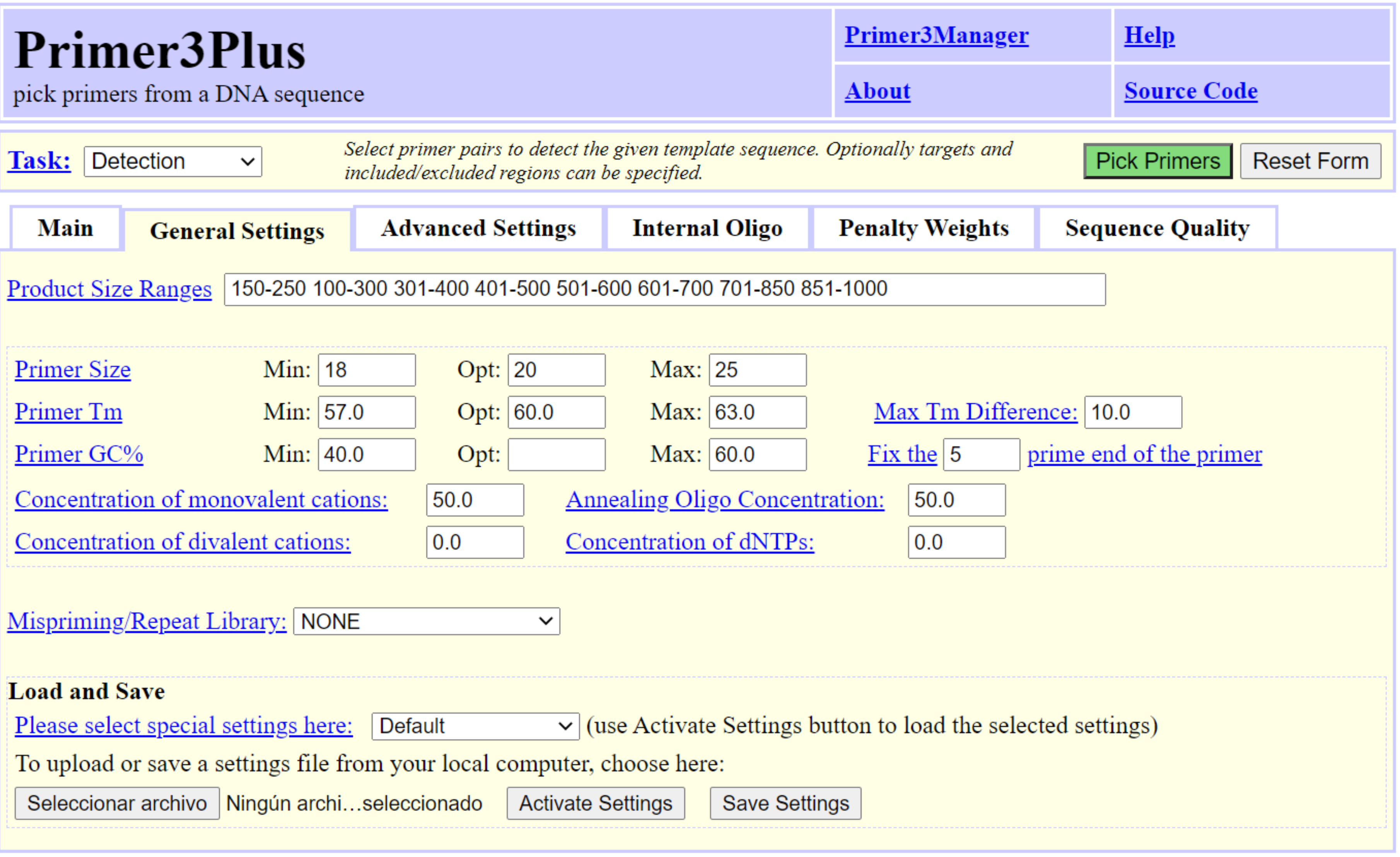
```
AGCTCACGTCGGCAAACGGCAACGAGACAAAGTACTACTTTGAGAAGCTCATCCCACGCAACAGAGAGGAGGAGCAGTAT
CTAAGCCTTGTGGATCGCATCATACGCGAGGGGAATGTGAAGCATGACCGCACTGGGGTGGGCACGCTCTCCATCTTTGG
CGCACAGATGCGTTTCTCGCTCCGCAACAATCGCCTACCACTTTTGACAACGAAGCGGGTTTTTTGGCGCGGTGTGTGCG
AGGAACTGCTGTGGTTTCTACGGGGCGAAACATATGCCAAAAAGTTAAGTGACAAGGGAGTCCACATATGGGACGACAAC
GGCTCGCGCGTTTCTTGACAGTCGTGGCCTCACAGAGTACGAGGAGATGGACCTCGGTCCTGTCTACGGCTTTCAGTG
GCGTCACTTTGGTGCCGCCTACACACACCATGATGCCAACTATGACGGACAGGGTGTGGATCAAATCAAGGCAATCGTTG
AAACGCTAAAGACAAATCCTGACGATCGCCGGATGCTATTCACGGCATGGAATCCGAGCGCTTTGCCCAGGATGGCCCTA
CCACCGTGCCACCTGCTCGCACAGTTTTACGTGAGCAATGGGGAACTGTCTTGCATGCTCTACCAGCGCTCATGTGACAT
GGGCCTTGGCGTCCCGTTCAACATTGCCTCCTACGCCCTCTTGACCATCCTCATCGCAAAGGCGACGGGGCTGCGGCCGG
GAGAGTTGGTGCACACCCTTGGTGACGCTCACGTGTACAGCAATCACGTCGAGCCGTGCAATGAGCAACTGAAACGTGTG
CCACGTGCCTTTCCGTATCTTGTGTTTCGCCGCGAGCGCGAGTTCCTGGAGGACTACGAGGAGGGTGACATGGAGGTCAT
TGACTATGCGCCATACCCTCCCATCTCCATGAAGATGGCGGTTTAG
```

Mark selected region: < > | [ ] | { } | Clear — Save Sequence

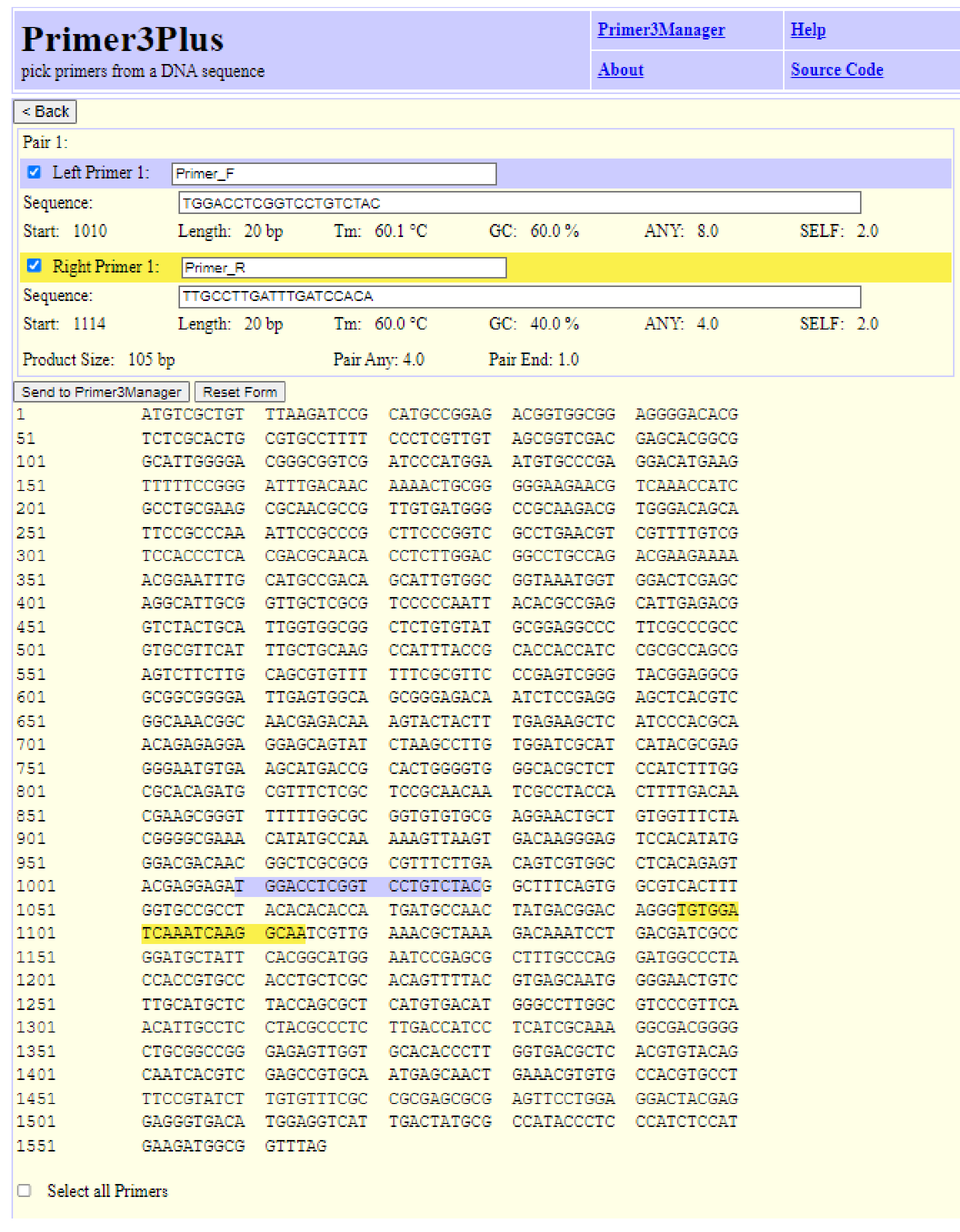
Excluded Regions: < >

Targets: [ ]

HERRAMIENTAS DE DISEÑO DE PRIMERS



HERRAMIENTAS DE DISEÑO DE PRIMERS



Herramientas de análisis de primers
Oligo Analyzer (IDT)

OligoAnalyzer 3.1 https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer

Instructions | Definitions | Feedback

Sequence — 0 Bases

5'- -3'

CLEAR SEQUENCE

ADD TO ORDER

Parameter sets: SpecSheet (Default)

Target type	DNA	
Oligo Conc	0.25	μM
Na^+ Conc	50	mM
Mg^{++} Conc	0	mM
dNTPs Conc	0	mM

ANALYZE

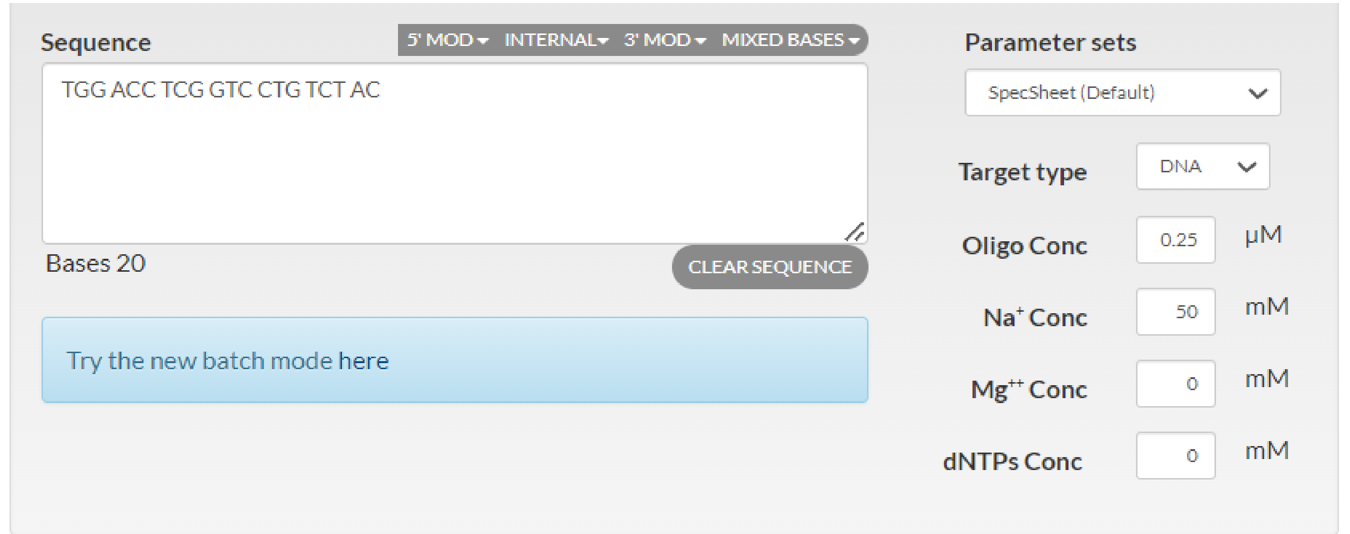
HAIRPIN

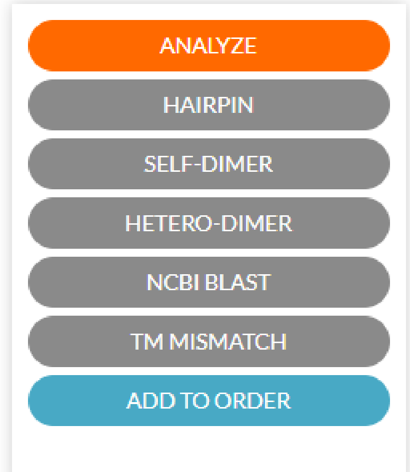
SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

TM MISMATCH





Results

RESUSPENSION DILUTION

SEQUENCE	5'- TGG ACC TCG GTC CTG TCT AC -3'
COMPLEMENT	5'- GTA GAC AGG ACC GAG GTC CA -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	60 %
MELT TEMP	58 ºC
MOLECULAR WEIGHT	6060 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	177400 L/(mole·cm)
nmole/OD_{260}:	5.64
μg/OD_{260}:	34.16

HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS DE PRIMERS HAIRPIN

Structures

Structure Name	Image	ΔG(kcal.mole^{-1})	T_m (°C)	ΔH(kcal.mole^{-1})	ΔS(cal.K^{-1}mole^{-1})	Output	
1		0.16	22.9	-23.4	-79.04	Ct	Det
2		0.42	19	-20.5	-70.17	Ct	Det
3		0.99	4	-13.1	-47.27	Ct	Det
4		1.01	6.2	-15	-53.69	Ct	Det
5		1.11	4.6	-15.1	-54.37	Ct	Det

La Tm debe ser menor que la temperatura de annealing propuesta para la reacción.

HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS DE PRIMERS
SELF-DIMER

El valor de ΔG debe estar entre 0 y -9 kcal/mol

Dimer Sequence:

5'- ATGGGAGAACTGGAGCCTTC -3'
Maximum Delta G: -38.72 kcal/mole

Delta G: -3.52 kcal/mole **Base Pairs:** 3

```
5' ATGGGAGAACTGGAGCCTTC
          |||         :::
3'        CTTCCGAGGTCAAGAGGGTA
```

Delta G: -3.14 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5' ATGGGAGAACTGGAGCCTTC
                 ||
3'              CTTCCGAGGTCAAGAGGGTA
```

HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS DE PRIMERS HETERO-DIMER

Hetero-Dimer Analysis

Primary Sequence:

5'- ATG GGA GAA CTG GAG CCT TC -3'

Secondary Sequence:

5'- -3'

CREATE COMPLEMENT CALCULATE

HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS DE PRIMERS
HETERO-DIMER

El valor de ΔG debe estar entre 0 y -9 kcal/mol

Primary Sequence: 5'- ATGGGAGAACTGGAGCCTTC -3'

Secondary Sequence: 5'- ATGCGTATTAGC -3'

Maximum Delta G: -38.72 kcal/mole

Delta G: -3.14 kcal/mole **Base Pairs**2

```
5'  ATGGGAGAACTGGAGCCTTC
          :        ||  :
3'        CGATTATGCGTA
```

Delta G: -3.14 kcal/mole **Base Pairs**2

```
5'  ATGGGAGAACTGGAGCCTTC
                   ||
3'                 CGATTATGCGTA
```

1. DISEÑO DE PRIMERS

2. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL DISEÑO DE PRIMERS

3. EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE PRIMERS

UN 100% DE EFICIENCIA IMPLICA QUE EN CADA CICLO SE DUPLICA EL NÚMERO DE AMPLICONES

USANDO LA ECUACIÓN DE PCR

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

X_n = PCR product after cycle n
X_0 = initial copy number
E = amplification efficiency
n = cycle number

EFECTO DE LA EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN

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

Caso 1: Eficiencia 90%

$$X_n = 100\ (1+0.9)^{30}$$

$$X_n = 2.3 \times 10^{10}$$

Caso 2: Eficiencia 80%

$$X_n = 100\ (1+0.8)^{30}$$

$$X_n = 4.6 \times 10^{9}$$

Resultado

Una **diferencia de 0.1 en la eficiencia** de amplificación resulta en una diferencia de **5 veces menos producto** a partir de la misma cantidad inicial luego de **30 ciclos**

EFICIENCIA DE LOS PRIMERS

A partir de un gráfico de **$\log_{10}$ concentración de molde vs C_T,**
la eficiencia de una reacción de PCR puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$\mathbf{Eff = 10^{(-1/slope)} - 1}$$

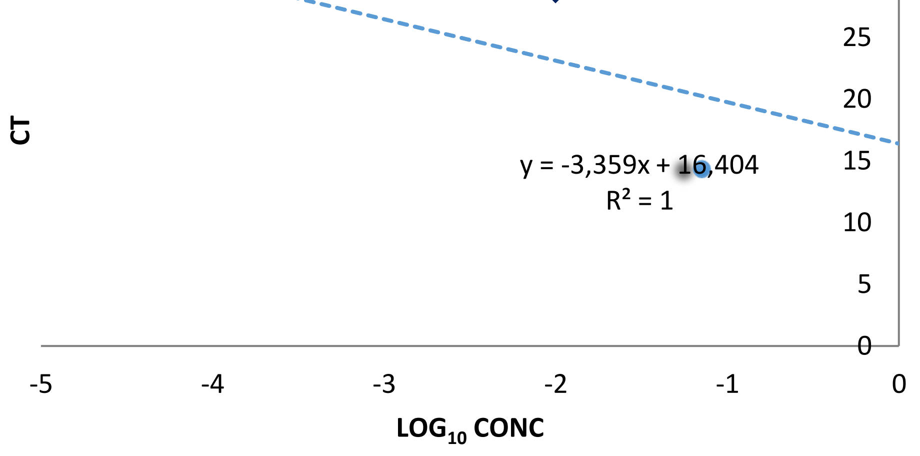
- Curva estándar con concentraciones de molde conocidas
- El molde a usar debe ser **idealmente** el mismo que se usará para los ensayos
- Duplicados o **triplicados**
- NTC

CÁLCULO DE EFICIENCIA DE PRIMERS

Tube	Sample
A	Stock cDNA
B	1\10
C	1\100
D	1\1,000
E	1\10,000

Tube	Ct 1	Ct 2
A	16.37	16.4
B	19.78	19.79
C	23.14	23.1
D	26.45	26.54
E	29.87	29.78

Promedio CT	Conc	Log_{10} Conc
16.385	1	0
19.785	0.1	-1
23.12	0.01	-2
26.495	0.001	-3
29.825	0.0001	-4



$$Eff=10^{(-1/slope)} -1$$

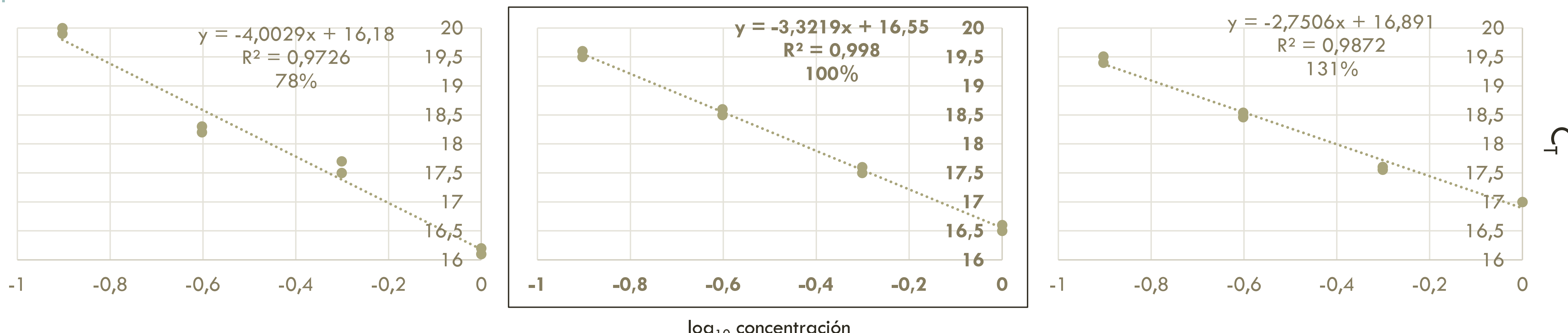
$$Eff=10^{(-1/-3.359)} -1 = 0.98 = 98\%$$

Idealmente, la eficiencia del PCR debería ser entre 90-110% (ideal slope = 3.32)

Variables que afectan la eficiencia:

- Largo del amplicon
- Estructura secundaria de los primers
- Inhibidores

Eficiencia de los primers



- Mal diseño de cebadores
- Concentraciones de reactivos no óptimas
- Condiciones de reacción no óptimas

- Inhibidores de la reacción (material remanente en la muestra o cantidades excesivas de ADN/ARN)
- Contaminantes comunes: heparina, hemoglobina, polisacáridos, clorofilas, proteinasa K, acetato de sodio. O transferidos en el paso de aislamiento: etanol, fenol y SDS

Validation Experiment

Before using the $\Delta\Delta C_T$ method for quantitation, perform a validation experiment like that in Figure 6 to demonstrate that efficiencies of target and reference are approximately equal. The absolute value of the slope of log input amount vs. ΔC_T should be < 0.1. The slope in Figure 6 is 0.0492, which passes this test. Once this is proven, you can use the $\Delta\Delta C_T$ calculation for the relative quantitation of target without running standard curves on the same plate.

If the efficiencies of the two systems are not equal, perform quantitation using the standard curve method. Alternatively, new primers can be designed and synthesized for the less efficient system to try to boost efficiency.

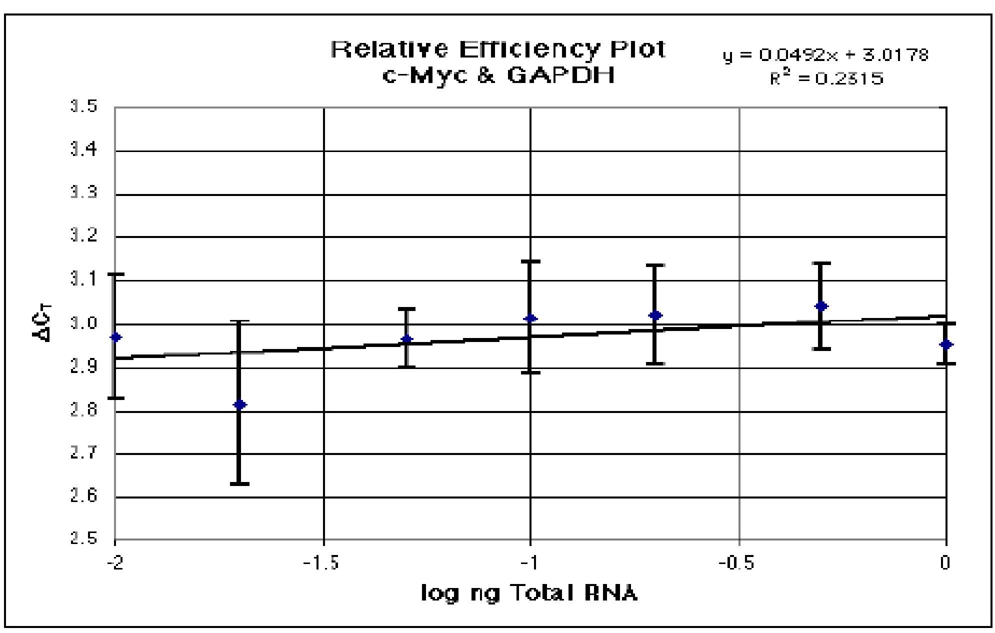


Figure 6. Plot of log input amount versus ΔC_T

Menos del 10% de diferencia

ABI-7700 User Bulletin #2

PFAFFL METHOD

© 2001 Oxford University Press
Nucleic Acids Research, 2001, Vol. 29, No. 9 00

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR

Michael W. Pfaffl*

Se usa para calcular la expresión génica relativa entre dos genes cuyos primers tienen **eficiencias diferentes**

$$Gene\ expression\ ratio = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct\ GOI}}{(E_{HKG})^{\Delta Ct\ HKG}}$$

¿Preguntas?