



qPCR: MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

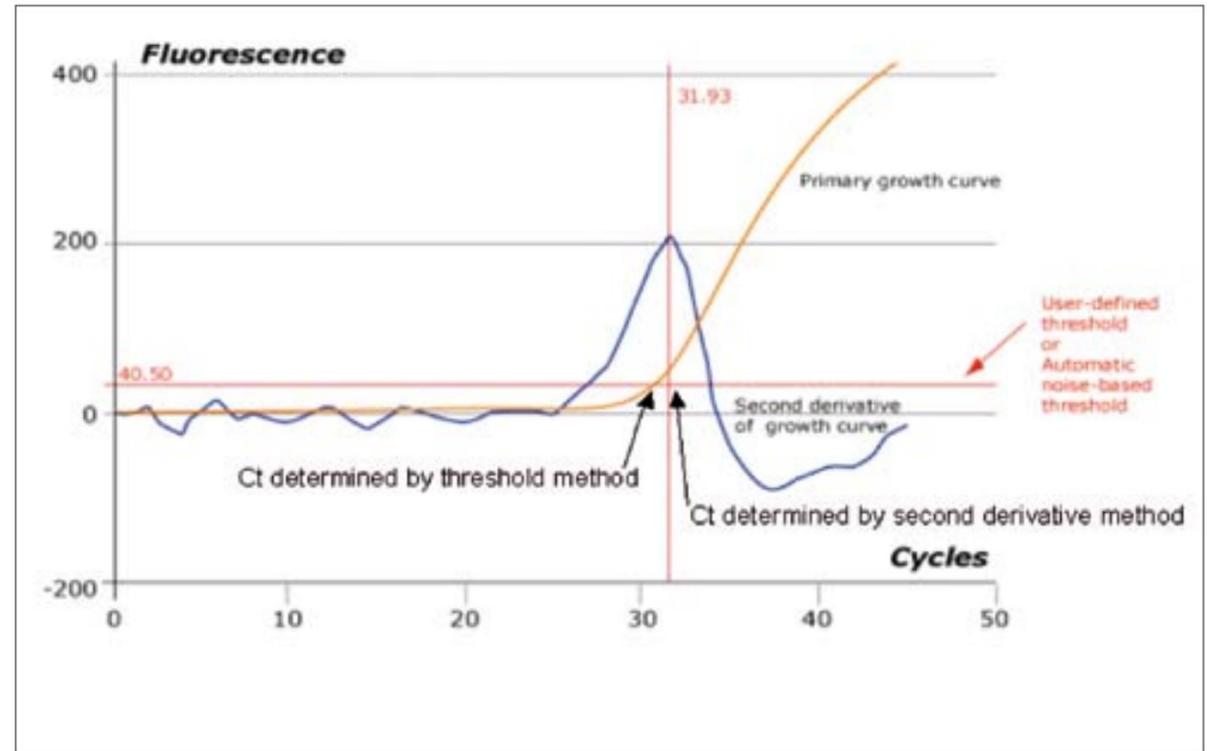
PARÁMETROS IMPORTANTES

Curvas de amplificación (Fluorescencia vs Ciclo)

Línea de base (background)

Línea umbral (threshold)

Valor CT



NORMALIZACIÓN

Variables:

- Cantidad Material de partida
- Eficiencias enzimáticas
- Diferencias entre tejidos, individuos o condiciones experimentales

Estas variables deben ser **normalizadas** para una buena comparación de los resultados

Formas de normalizar resultados:

- Número original de células
- Masa total de ARN inicial (o ADN)
- Genes de referencia (housekeeping)
- Calibrador externo

MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

- **Cuantificación absoluta:**

Se calcula el **número exacto de copias** de un gen de interés

- ✓ Cargas virales
- ✓ Presencia de patógenos y transgénicos

- **Cuantificación relativa:**

La expresión del gen de interés se expresa **relativa a otro gen** usado como referencia

- ✓ Expresión génica

CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA

Requiere una CURVA ESTANDAR con número de copias conocido.

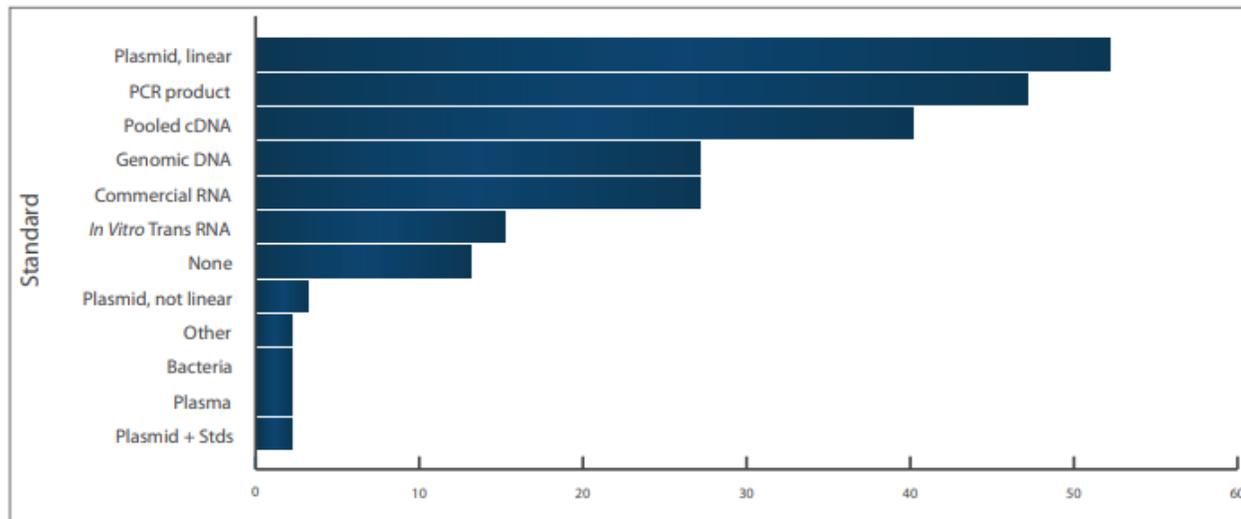


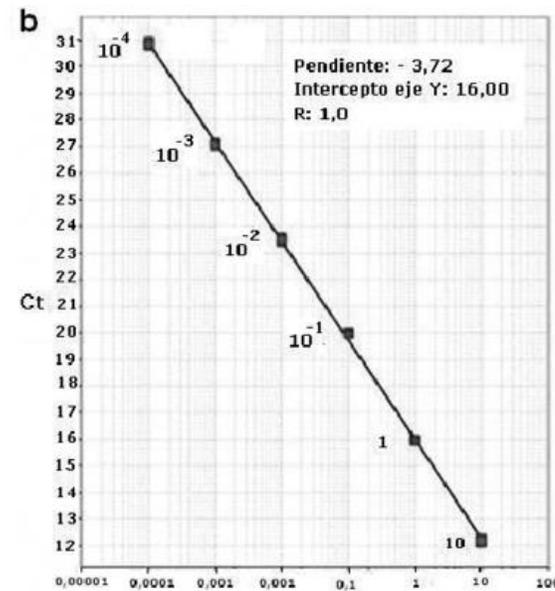
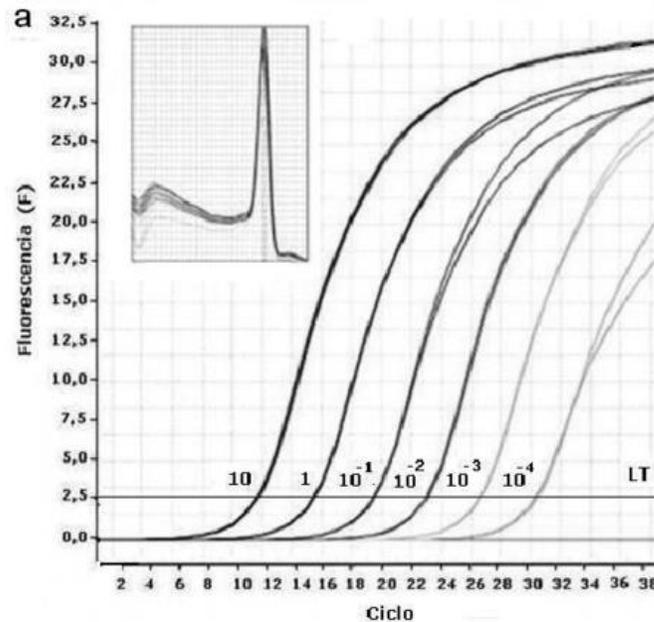
Figure 21: Most frequently used quantification standards. From Nucleic Acid Research Group, (NARG) survey 2007, <http://www.abrf.org/NARG/>

Para estudios de expresión génica:

Estándar ARN para tener en cuenta variaciones en la RT

CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA: CURVA ESTÁNDAR

- Deben usarse los mismos cebadores que el gen de interés (eficiencia)
- La cuantificación del estándar debe ser PRECISA (A260, Bionalyzer, RiboGreen)



Ct vs log []

$$Ct = a \log [] + b$$

EL ROL DE LA CURVA ESTANDAR

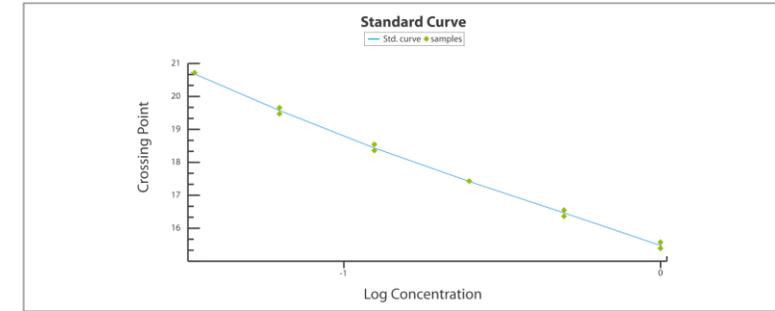


Figure 24: Example of a 2 times-serial diluted cDNA standard curve. Detection using SYBR® Green I on a LC480 thermocycler.

La curva estándar nos da una idea del funcionamiento y la performance del PCR

Debe cubrir todo el rango dinámico de expresión

Debe incluir al menos 5 puntos (replicas)

Debe ser lineal en el rango estudiado

Permite calcular la eficiencia de la amplificación

Permite determinar la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo

CUANTIFICACIÓN RELATIVA

Los niveles de expresión del gen blanco se calculan relativos a la cantidad de un gen endógeno de referencia que está presente en todas las muestras

La expresión del gen de referencia **no debe cambiar** en las condiciones del experimento o entre diferentes muestras

EL MÉTODO DELTA DELTA CT ($\Delta\Delta C_T$)

- Método simple
- Compara los valores C_t del gen blanco y del gen de referencia
- La eficiencia de amplificación del gen blanco y del gen de referencia debe ser similar y cercana a 100%
- Requiere la normalización contra una muestra calibradora (muestra sin tratar, muestra sana, etc)

METHODS 25, 402-408 (2001)
doi:10.1006/meth.2001.1262, available online at <http://www.idealibrary.com> on IDEAL[®]

Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method

Kenneth J. Livak* and Thomas D. Schmittgen†¹

EL MÉTODO DELTA DELTA CT ($\Delta\Delta\text{CT}$)

2 pasos:

Primero se calcula el ΔCt entre el gen blanco y el gen de referencia en la muestra tratada (muestra) y en la muestra sin tratar (control o calibrador)

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gen blanco}} - \text{Ct}_{\text{gen referencia}}$$

Segundo se calcula la diferencia entre el ΔCt de la muestra y del control

$$\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{gen blanco}} - \text{Ct}_{\text{gen referencia}})_{\text{control}} - (\text{Ct}_{\text{gen blanco}} - \text{Ct}_{\text{gen referencia}})_{\text{muestra}}$$

El nivel de expresión de la muestra con respecto al control (FC) es igual a $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

EFICIENCIAS DE PCR DIFERENTES

Si la diferencia en la eficiencia de los cebadores para el gen blanco y el gen de referencia es mayor al 10 % **no se recomienda usar el método $\Delta\Delta Ct$** .

En este caso, hay que corregir los valores usando los datos de eficiencia

$$FC = (E_{\text{blanco}})^{\Delta Ct_{\text{blanco}} (\text{control} - \text{muestra})} / (E_{\text{reference}})^{\Delta Ct_{\text{referencia}} (\text{control} - \text{muestra})}$$

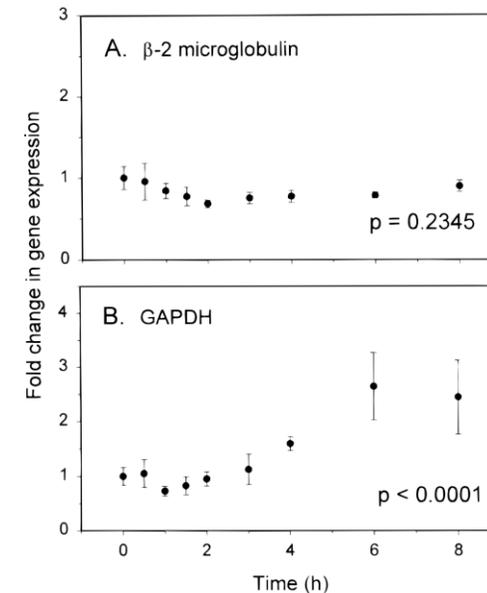
COMO ELEGIR UN GEN DE REFERENCIA?

✓ Características:

- ✓ Su expresión no puede ser muy distante de la del gen o genes en estudio
- ✓ La estabilidad y tamaño del amplificado deben ser similares a los del genes en estudio
- ✓ Se asume que el normalizador y el gen de interés tienen la misma **eficiencia de amplificación**
- ✓ **Bajo ninguna condición su expresión se debe alterar**

✓ Datos transcriptómicos

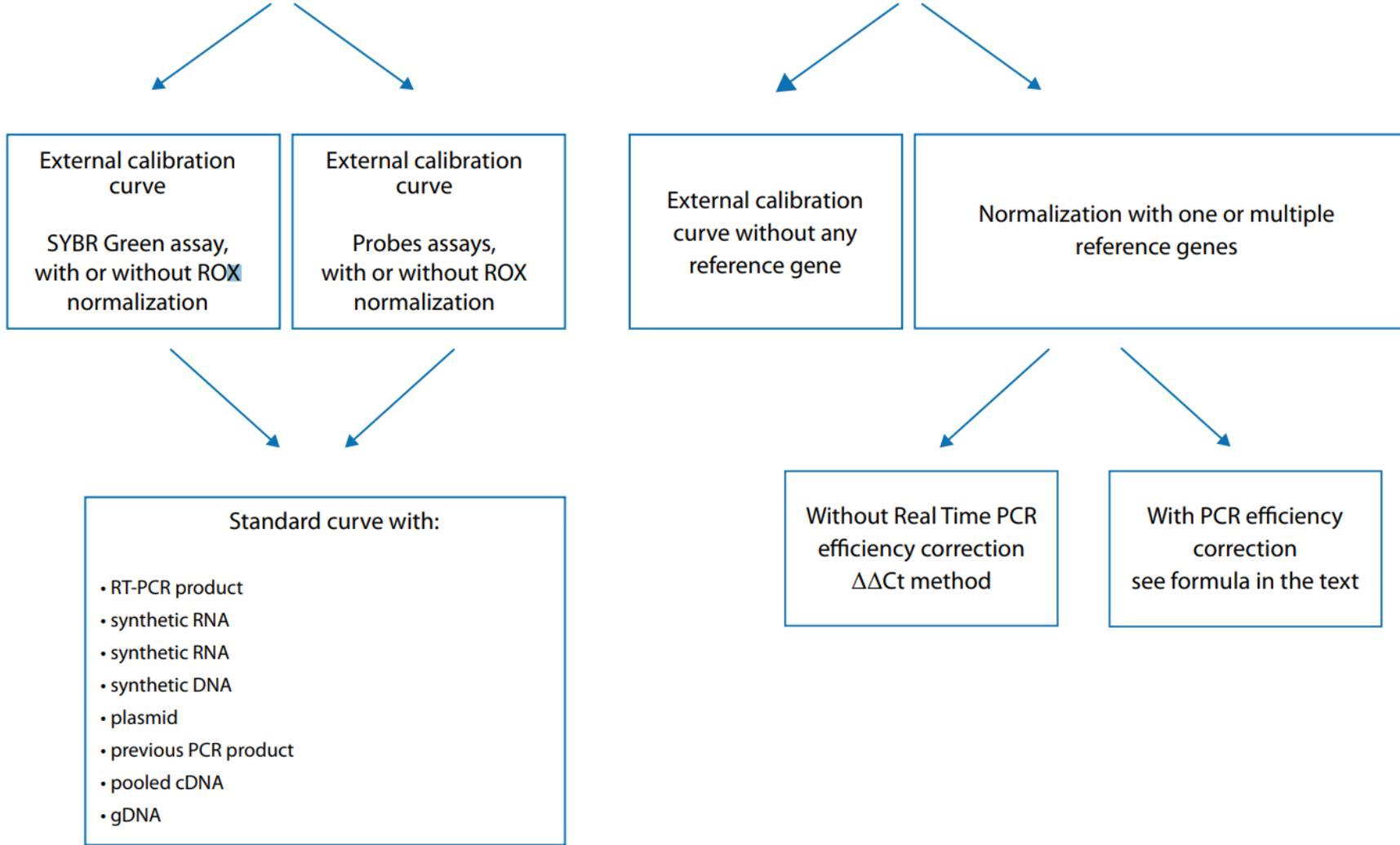
✓ Chequear dos o más genes de referencia ($\Delta\Delta Ct = 0$)



Análisis de Ct a lo largo del tiempo luego de incubación de cels NIH 3T3 con SFB

Absolute quantification

Relative quantification



External calibration curve
SYBR Green assay,
with or without ROX
normalization

External calibration curve
Probes assays,
with or without ROX
normalization

- Standard curve with:
- RT-PCR product
 - synthetic RNA
 - synthetic DNA
 - plasmid
 - previous PCR product
 - pooled cDNA
 - gDNA

External calibration curve without any
reference gene

Without Real Time PCR
efficiency correction
 $\Delta\Delta C_t$ method

Normalization with one or multiple
reference genes

With PCR efficiency
correction
see formula in the text

EJEMPLO DE CUANTIFICACIÓN RELATIVA

Estudio del efecto de un nuevo veneno de rata en la expresión del gen de la protrombina

Condicion	Ct ptmb	Ct tub	Ct gapdh	Ct efTu
Ratas Control	25,301	22,557	23,557	24,357
	25,232	22,669	23,669	24,769
	25,779	23,260	23,860	25,019

Condicion	Ct ptmb	Ct tub	ct gapdh	Ct efTu
Ratas tratadas con Veneno	27,981	22,080	27,430	24,080
	27,933	22,315	27,780	24,315
	28,000	22,269	27,460	24,269