



qPCR: DISEÑO EXPERIMENTAL

CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL

Preparación y manipulación de la muestra

Calidad de los ácidos nucleicos

- Muestras ARN:
 - ✓ integridad del ARN
 - ✓ contaminación con ADN genómico
 - ✓ síntesis de ADNc
- Muestras ADN

Síntesis de ADNc

Selección del gen target

Controles

Selección y validación de genes de referencia

Réplicas

PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LA MUESTRA

Variabilidad experimental:

- Adquisición de la muestra: perturbación de los perfiles de ARNm
- Extracción de ácidos nucleicos
 - Homogeneización adecuada
 - Tipo de muestra
 - Densidad de ARN o ADN blanco
 - Estado fisiológico de la muestra
 - Método de extracción
 - etc

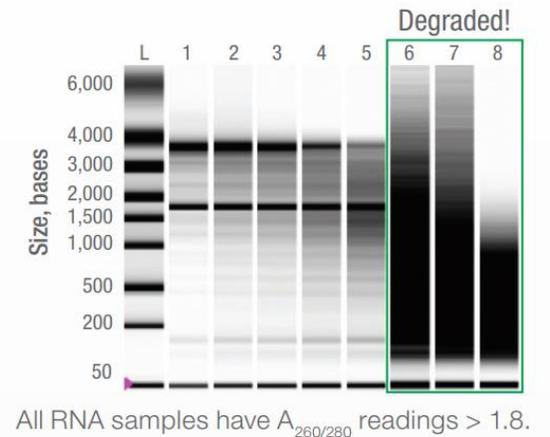
CALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Muestras ARN

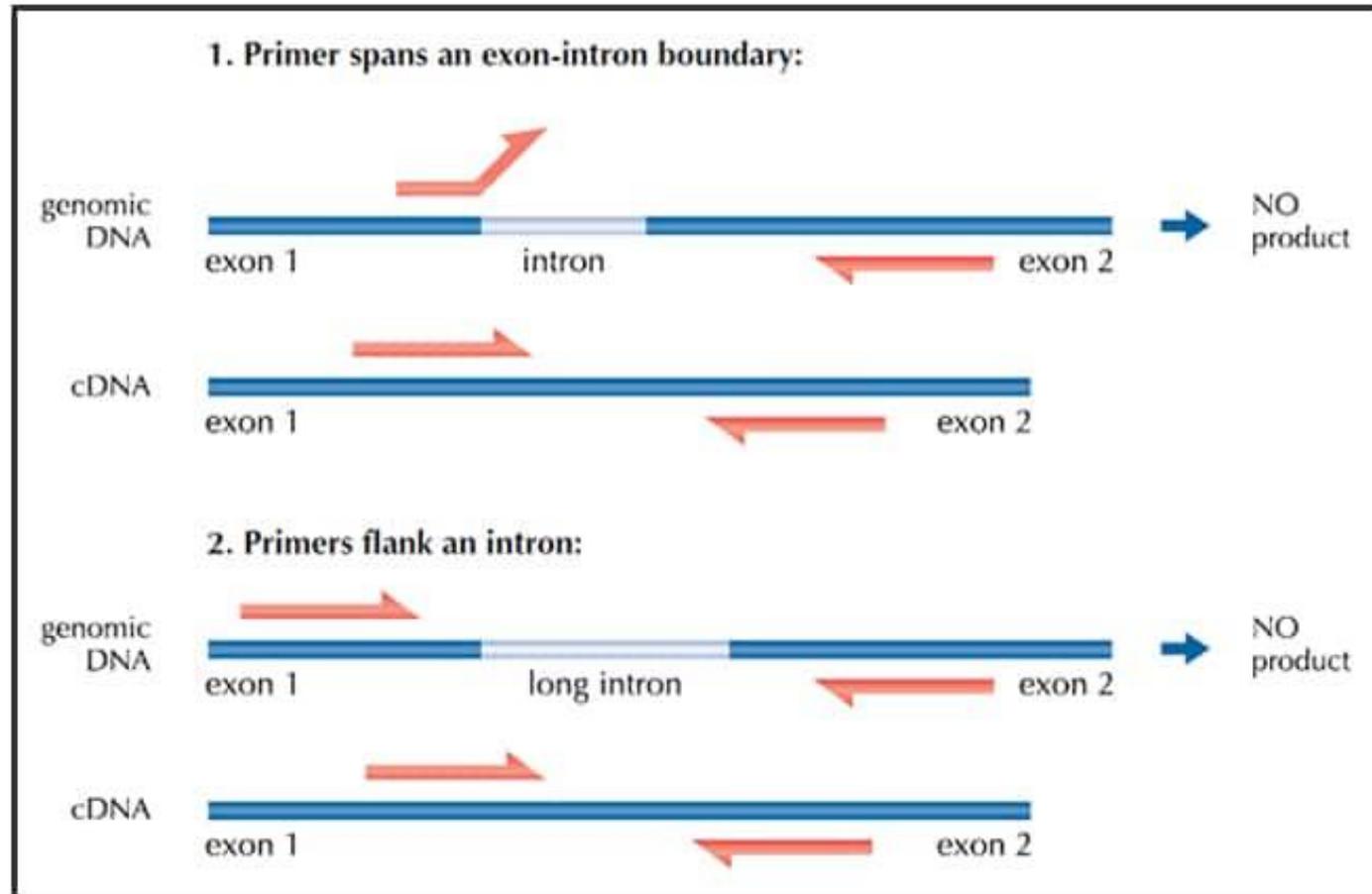
- Integridad
 - Gel agarosa
 - Bioanalyzer (RIN)
- Métodos de cuantificación:
 - Basados en espectrofotometría: NanoDrop; espectrofotómetro
 - Análisis de microfluidos: Bioanalyzer
 - Electroforesis capilar: Qiagen's QIAxcel
 - Detección de colorantes fluorescentes: Ambion/Applied Biosystems' RiboGreen.
- Contaminación con ADN genómico

Muestras ADN

- Integridad
- Métodos de cuantificación



CONTAMINACIÓN CON ADN_g: DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

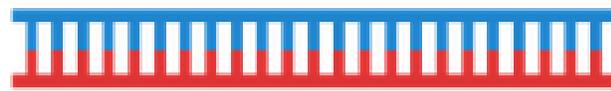
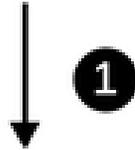


SÍNTESIS DE ADNc

ARNm 5' ————— A-A-A-A 3'
3' T-T-T-T 5'

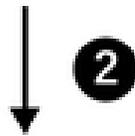
Oligo dT
Oligos al azar (random primers)
Oligo específico

Incubar con transcriptasa
inversa para sintetizar
la cadena de ADNc



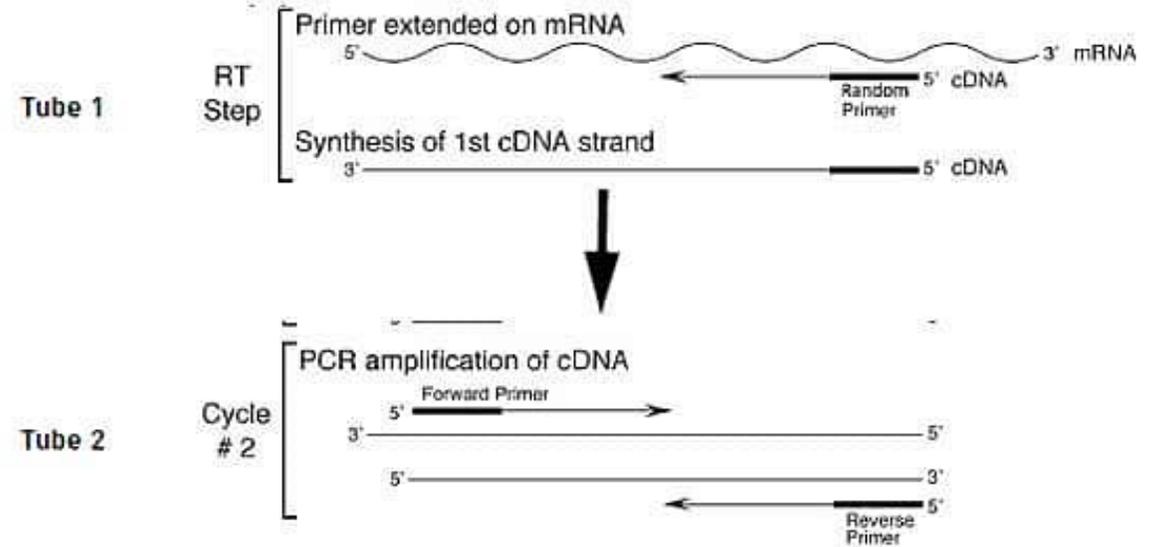
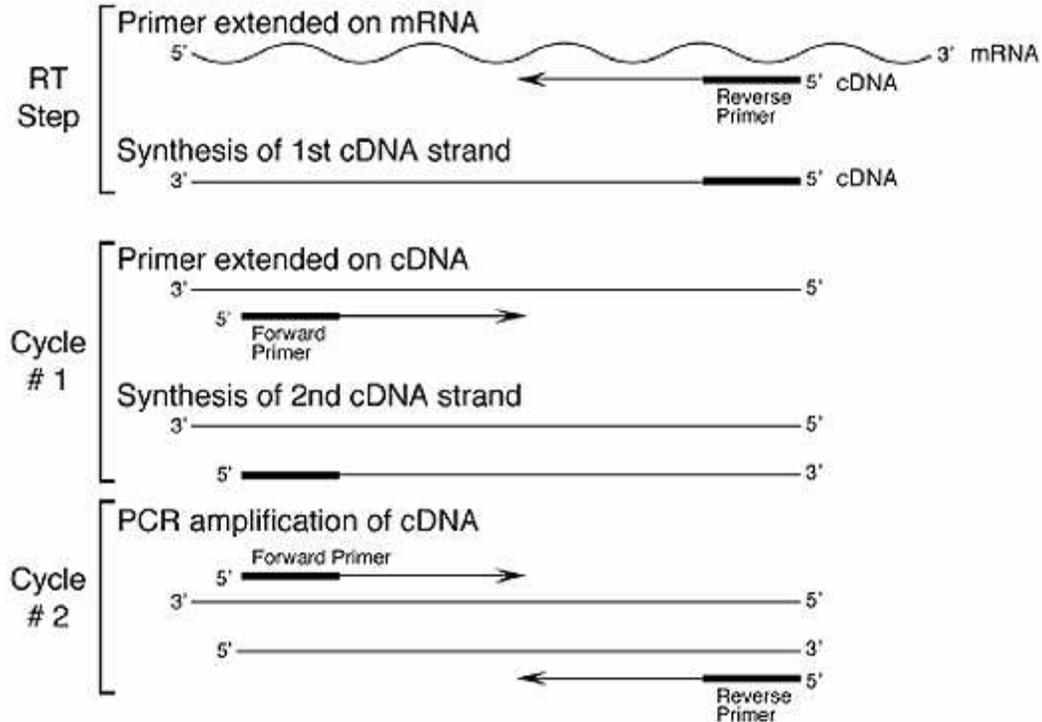
ARNm
ADNc

Cuando la hebra de ADNc
se complete, hidroliza
el soporte de ARN



ADNc

SÍNTESIS DE ADN_c: UN PASO O DOS PASOS



GEN BLANCO A ANALIZAR

Especificidad

- Detección específica del gen
- Detección de una variante de splicing del gen
- Discriminación entre miembros similares de una familia de proteínas

Eficiencia

- Cercana al 100% para tener buena sensibilidad y rango dinámico lineal permitiendo la detección de transcritos poco abundantes

Reproducibilidad

- Depende de los reactivos, primers, etc

CONTROLES

Control sin retrotranscripción (contaminación ADNg)

NTC (amplificación inespecífica, dímeros de primers)

Control positivo

Calibradores de cuantificación

Eficiencia de los cebadores



CONTROL SIN RETROTRANSCRIPCIÓN

Consiste en un molde ARN no sometido a transcripción reversa

Si ocurre amplificación, la muestra quedó contaminada con ADN genómico

CONTROL NEGATIVO NTC

Consiste en una reacción con todos los reactivos excepto el molde

Si ocurre amplificación, algún reactivo se contaminó con molde, dímeros de primers, estructuras secundarias estables, etc

CONTROL POSITIVO

Consisten en analizar el gen blanco en una muestra positiva

Constituye un control positivo de funcionamiento correcto de reactivos

CALIBRADORES DE CUANTIFICACIÓN

Consisten en un segundo gen blanco cuya expresión se mide a partir de la misma muestra del gen de interés (multiplex o en otro well)

Constituye un control positivo de funcionamiento correcto de reactivos

Control de integridad de la muestra

Puede usarse para cuantificar

qPCR controls



NEGATIVE

- No Template Control
- No Amplification Control
- No RT Control

AIM

Detection of primers dimers and contamination

Detection of probe's degradation

Detection of genomic DNA contamination



POSITIVE

- Endogenous Control
(same sample, different target)
- Exogenous Control
(same target, different sample)
- Spiking Control
(additional DNA spiked into the sample, different target)

AIM

Check quality of reagents.
Also used for normalization.

Check quality of reagents.

Detect inhibitors presence
Reject false negative in diagnostic assays

SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA

Su expresión no debe variar en las condiciones ensayadas

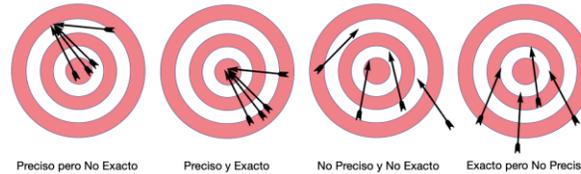
Alta eficiencia del PCR: resultados robustos y precisos

Eficiencias similares entre gen de referencia y gen problema (curvas de calibración)

Rango lineal dinámico (al menos tres órdenes de magnitud)

RÉPLICAS

Precisión y exactitud



Mayor precisión permite discriminar entre diferencias menores

Réplicas → Reproducibilidad → Determinar Precisión

Réplicas técnicas vs. Réplicas biológicas

- Réplicas técnicas: repeticiones de la misma muestra (generalmente triplicados)
- Réplicas biológicas: diferentes muestras del mismo grupo

AUMENTAR LA REPRODUCIBILIDAD



Buenas practicas de laboratorio para minimizar contaminación:

- Guantes
- área dedicada a qPCR
- tips con filtro resistentes a aerosoles
- agua grado PCR
- reactivos en alícuotas
- No abrir los tubos post PCR

Asegurarse de que las pipetas estén calibradas

Usar NTC para verificar ausencia de contaminación

Trabajar con master mix (+ 10% extra)

Evitar pipetear volúmenes muy pequeños ($< 5 \mu\text{l}$)

DISEÑO EXPERIMENTAL: SELECCIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN

TaqMan:

- Sondas marcadas que usan la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa. La disponibilidad de estas sondas fluorescentes permite cuantificar un producto de amplificación específico.
- Permite realizar análisis múltiplex

SYBR:

- El colorante SYBR Green I se une al ADN doble cadena inespecíficamente permitiendo detectar productos de PCR que se acumulan en los sucesivos ciclos

DISEÑO EXPERIMENTAL: SELECCIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

Cuantificación relativa

- Permite analizar cambios en la expresión de un gen en una muestra dada relativa a un gen normalizador (gen de referencia)
- **Aplicaciones:**
- Comparar niveles de expresión de un gen en diferentes tejidos
- Comparar niveles de expresión de un gen en muestras tratadas y sin tratar
- Comparar niveles de expresión en muestras tratadas con un compuesto en diferentes condiciones experimentales en un período de tiempo definido (método $2^{-\Delta\Delta CT}$)

Cuantificación absoluta

- Se usa una curva estándar para determinar la cantidad absoluta del blanco en la muestra. Se realizan diluciones seriadas de una muestra estándar de número de copias conocidas y se construye una curva estándar. A partir de estos datos se intrapola la cantidad absoluta del blanco en las muestras.