

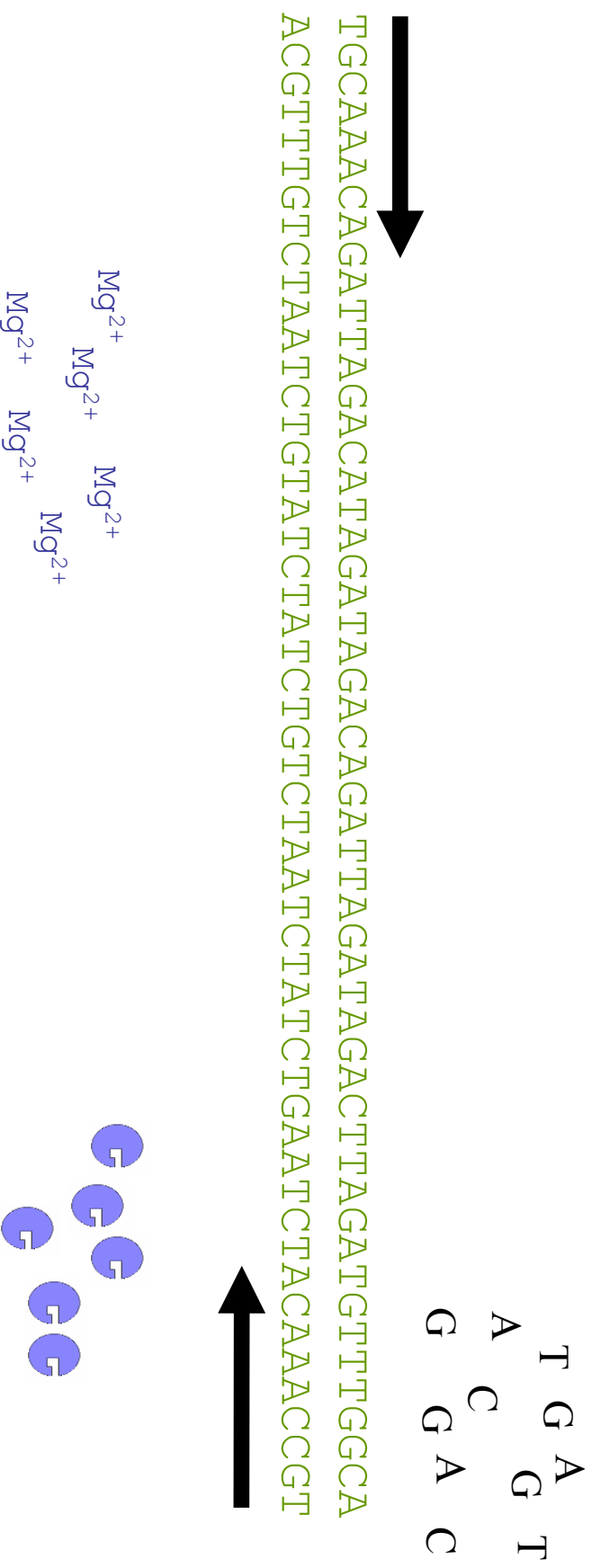
Introducción a la PCR en tiempo real

Proprietary & Confidential

● The world leader in serving science

¿Cómo trabaja la PCR en tiempo real?

Utiliza los mismos componentes básicos que la PCR tradicional (dsDNA, primers, dNTPs, PCR buffer, *Taq* polymerase, etc.).

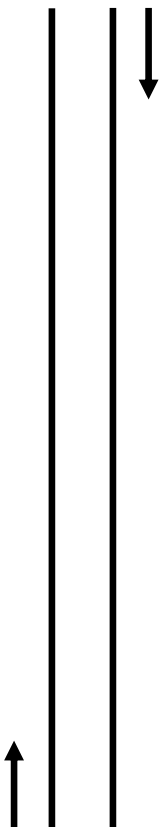


¿Cómo trabaja la PCR en tiempo real?

Como en PCR tradicional, las reacciones se procesan en un ciclador térmico :

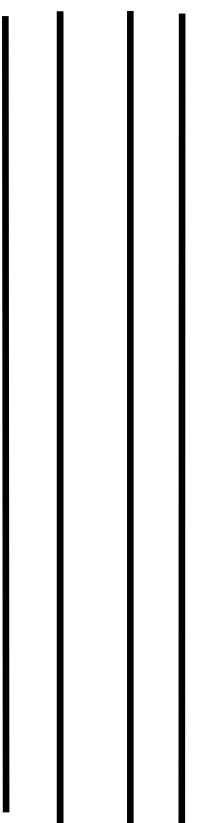
- **Desnaturalización** del templado dsDNA
- **Annealing** de primers al templado
- **Extensión** de los primers → nuevo amplicón

Ejemplo:

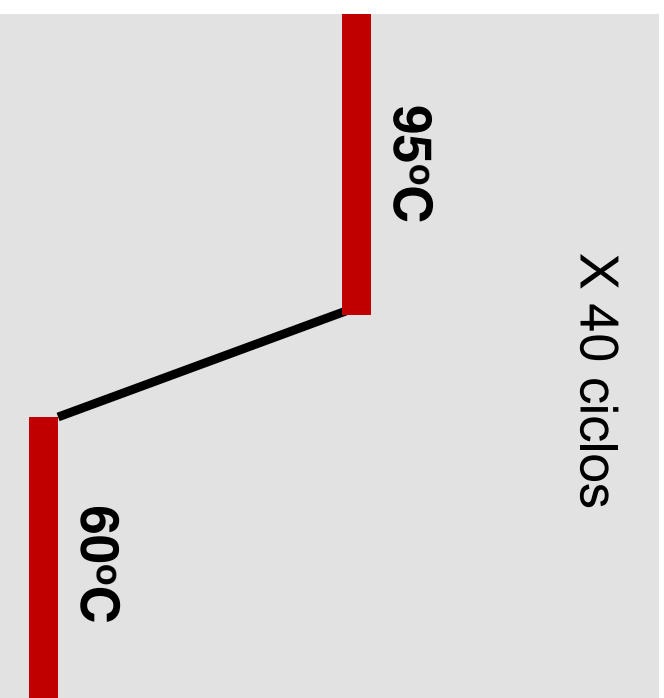


↓
1 ciclo de PCR

Un ciclo de PCR en teoría duplica el target después de cada ciclo.



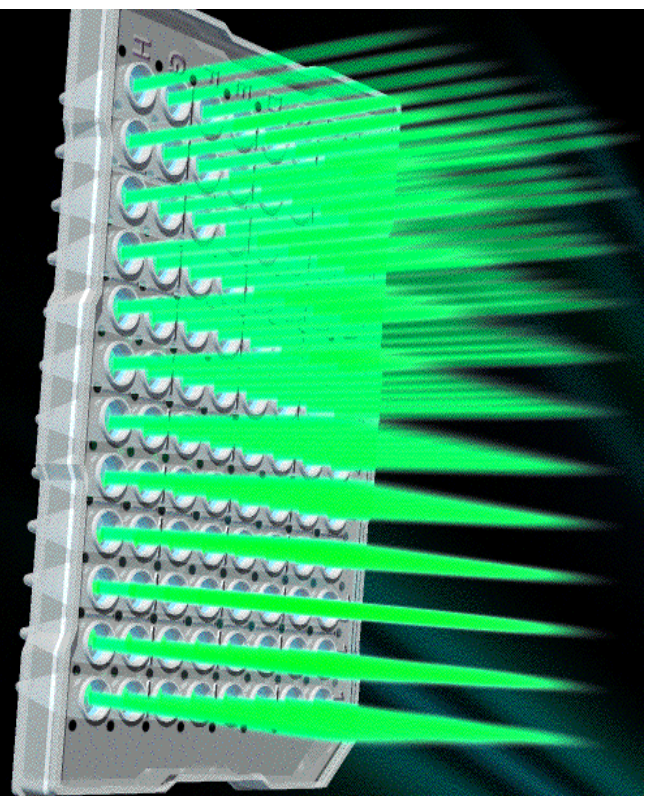
Ciclado universal



- No hay necesidad de optimizar la T de *annealing* para cada aplicación del ensayo.
- Ciclado total más rápido.
- No es obligatorio, pero sí recomendable.

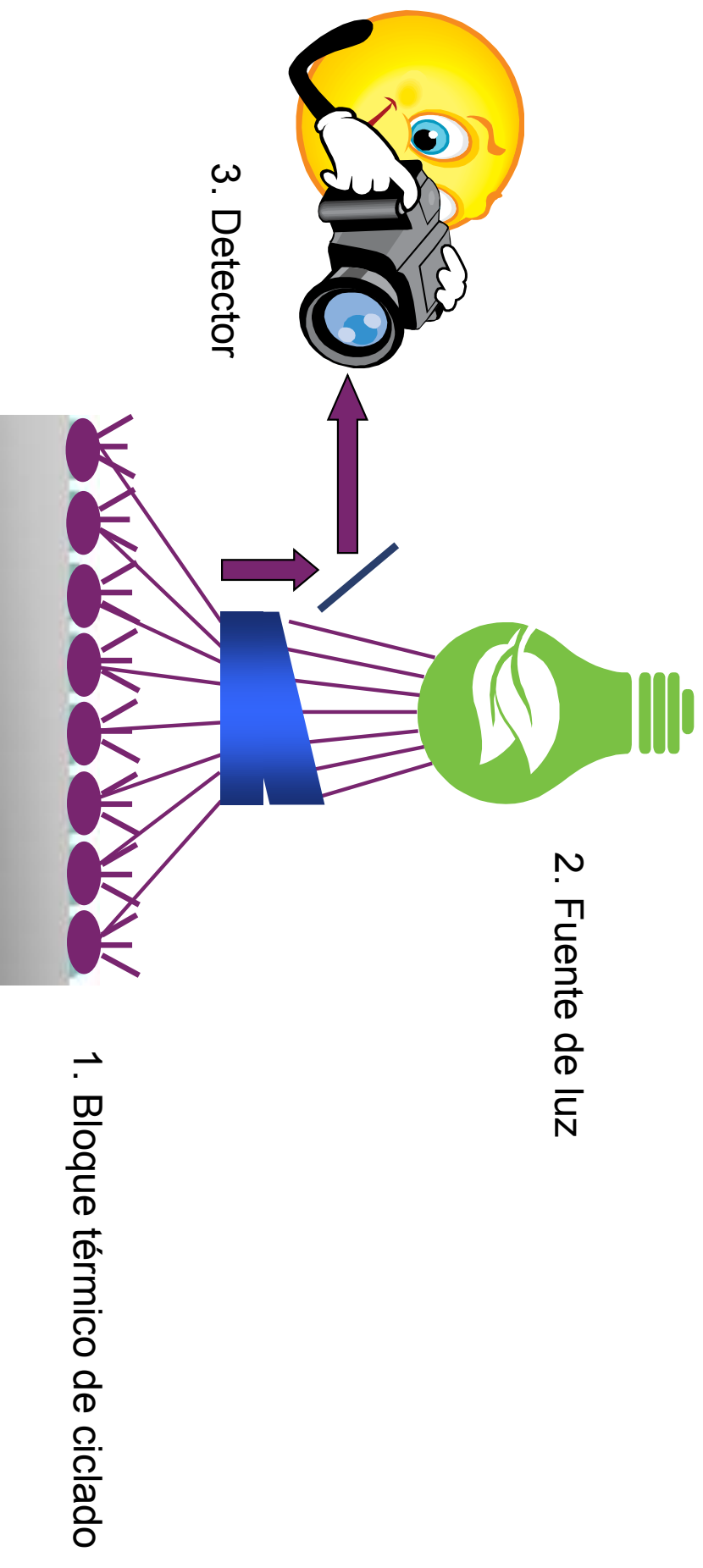
¿Cómo trabaja la PCR en tiempo real?

La mix de PCR contiene moléculas **fluorescentes**.



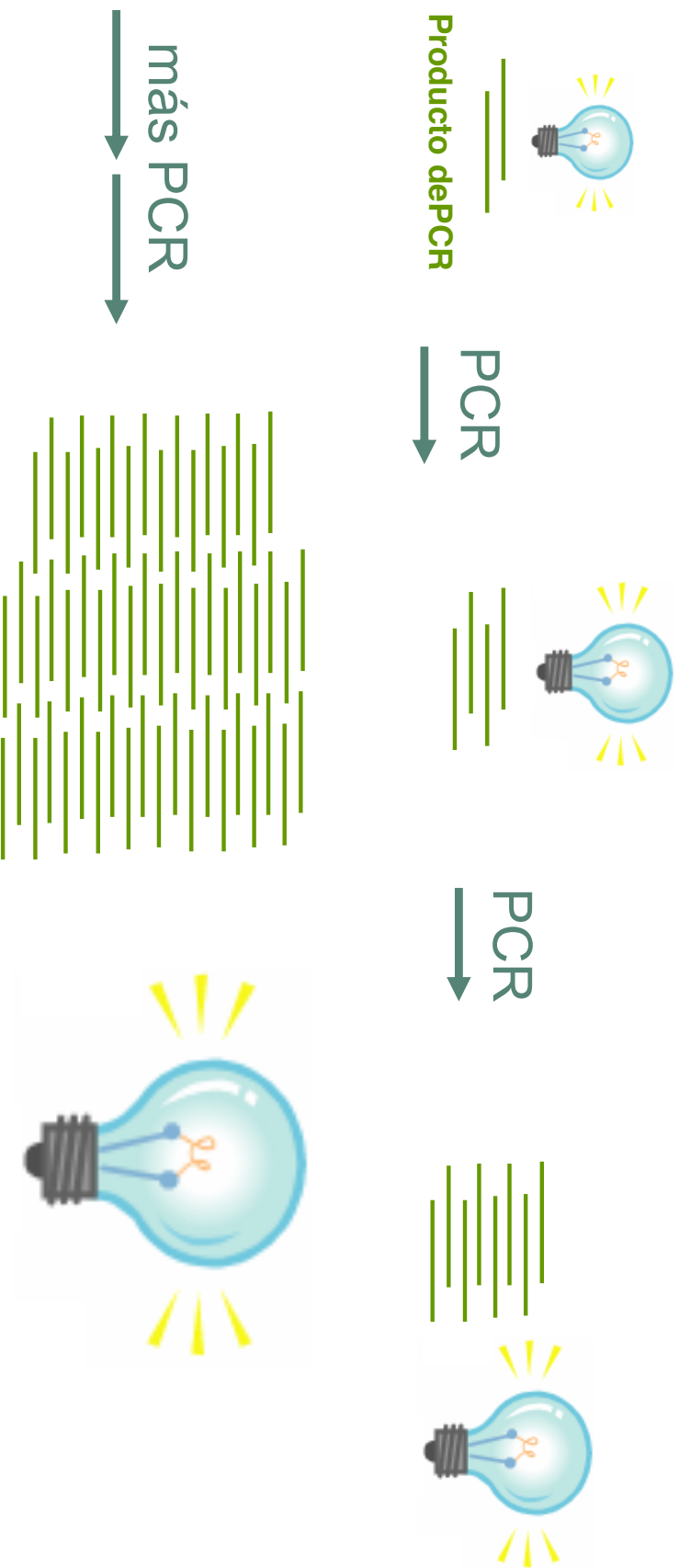
El Instrumento de PCR en Tiempo Real

Más allá del modelo, todos los real-time comparten 3 componentes:



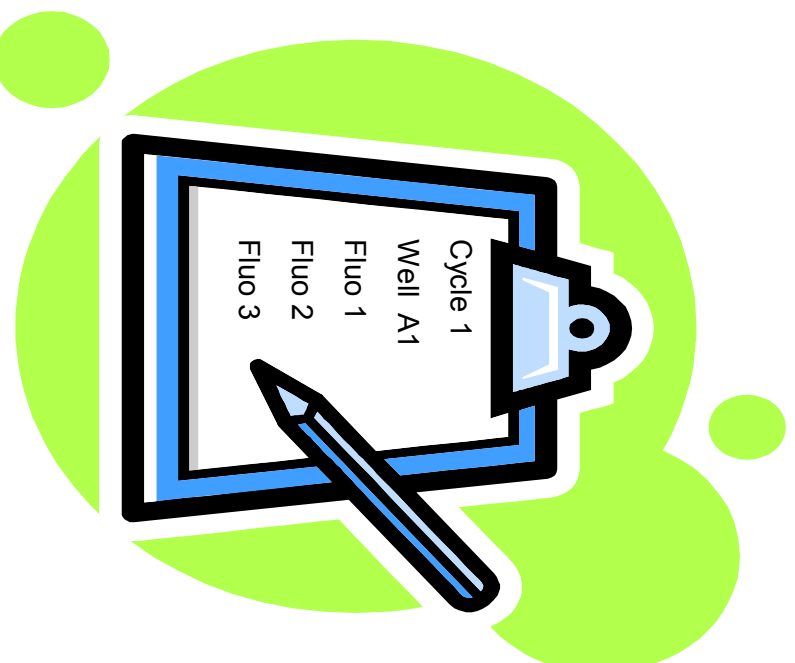
¿Cómo trabaja la PCR en tiempo real?

A medida de que procede la amplificación, la fluorescencia aumenta conforme lo hace la cantidad de producto.



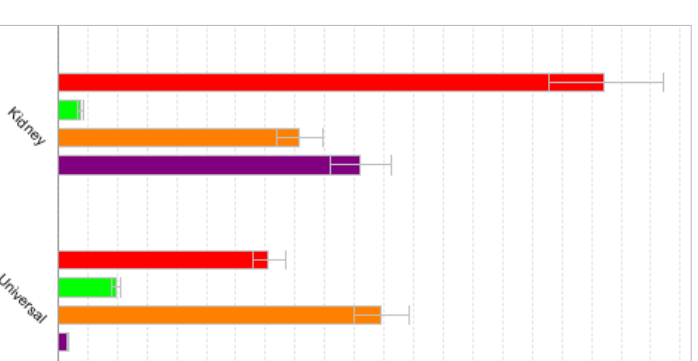
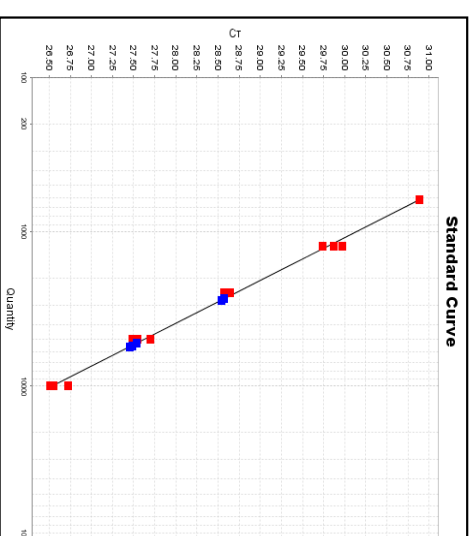
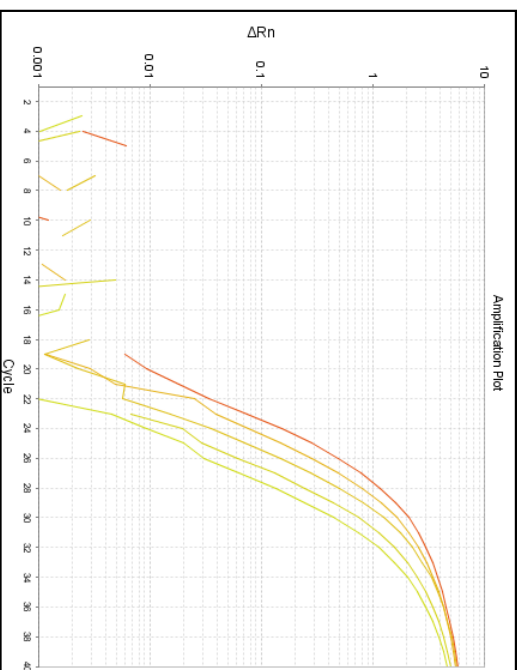
¿Cómo trabaja la PCR en tiempo real?

El instrumento registra este aumento de fluorescencia en **cada filtro** después de **cada ciclo**. Ventaja: mide fluorescencia en cada well de la placa para todos los colores, todos los ciclos.



Finalmente, el software de real-time presenta los datos para el análisis.

A7	<input type="checkbox"/>	Liver	c-myc	UNKNOWN	20.6095	20.532211	7.386	1.057	86.438	-3.696	1.726
A8	<input checked="" type="checkbox"/>	Liver	c-myc	UNKNOWN	20.454922	20.532211	8.133	1.057	86.438	-3.696	1.726
A9	<input checked="" type="checkbox"/>	Liver	c-myc	UNKNOWN
A...	<input type="checkbox"/>	Liver	GAPDH	UNKNOWN	28.380135	28.455734	0.469	...	92.853	-3.506	...
A...	<input type="checkbox"/>	Liver	GAPDH	UNKNOWN	28.464178	28.455734	0.444	...	92.853	-3.506	...
A...	<input type="checkbox"/>	Liver	GAPDH	UNKNOWN	28.522894	28.455734	0.427	...	92.853	-3.506	...
B1	<input type="checkbox"/>	Kidney	c-myc	UNKNOWN	21.135685	21.461496	5.322	1.111	86.438	-3.696	1
B2	<input type="checkbox"/>	Kidney	c-myc	UNKNOWN	21.555302	21.461496	4.098	1.111	86.438	-3.696	1
B3	<input type="checkbox"/>	Kidney	c-myc	UNKNOWN	21.693499	21.461496	3.76	1.111	86.438	-3.696	1
B4	<input type="checkbox"/>	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	28.479626	28.505972	0.439	...	92.853	-3.506	...
B5	<input type="checkbox"/>	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	28.518414	28.505972	0.428	...	92.853	-3.506	...
B6	<input type="checkbox"/>	Kidney	GAPDH	UNKNOWN	28.51987	28.505972	0.428	...	92.853	-3.506	...



PCR en Tiempo Real

Es un método que permite cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos mediante la reacción de PCR.

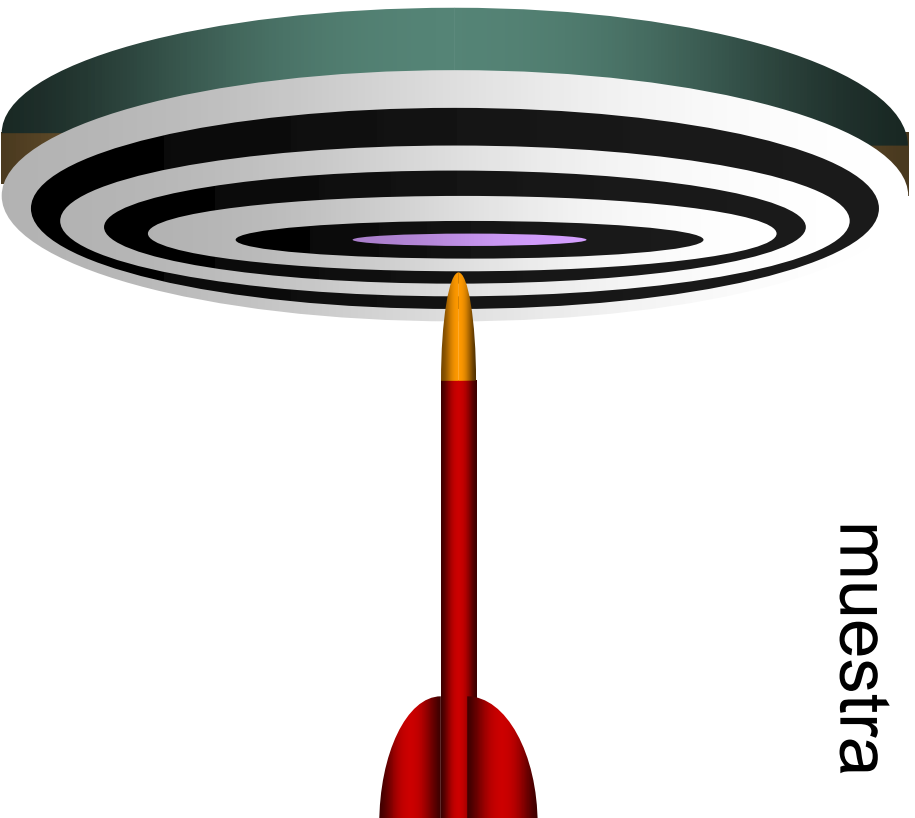
- Específico
- Exacto
- Preciso
- Sensible
- Amplio rango dinámico



Parámetros básicos en cuantificación

Exactitud

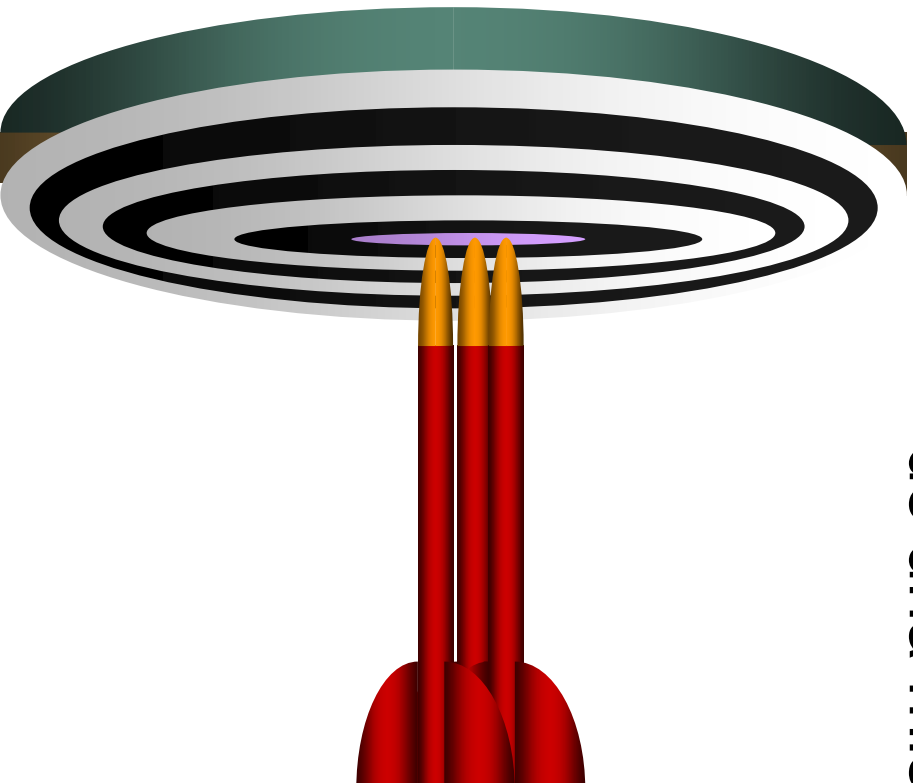
Cuán verdadero es el valor
obtenido en la medición de una
muestra



Exacto!

Precisión

Cuán reproducible es la cuantificación
de una misma muestra



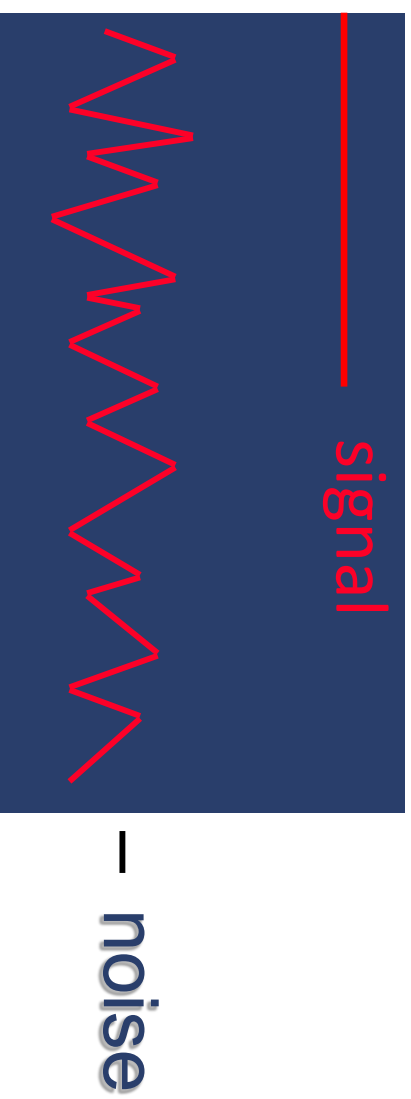
Preciso!

Sensibilidad

Una **sol**a molécula de DNA puede ser detectada por PCR en tiempo real (teoría)

Biotechniques 24:744-746 (May 1998)

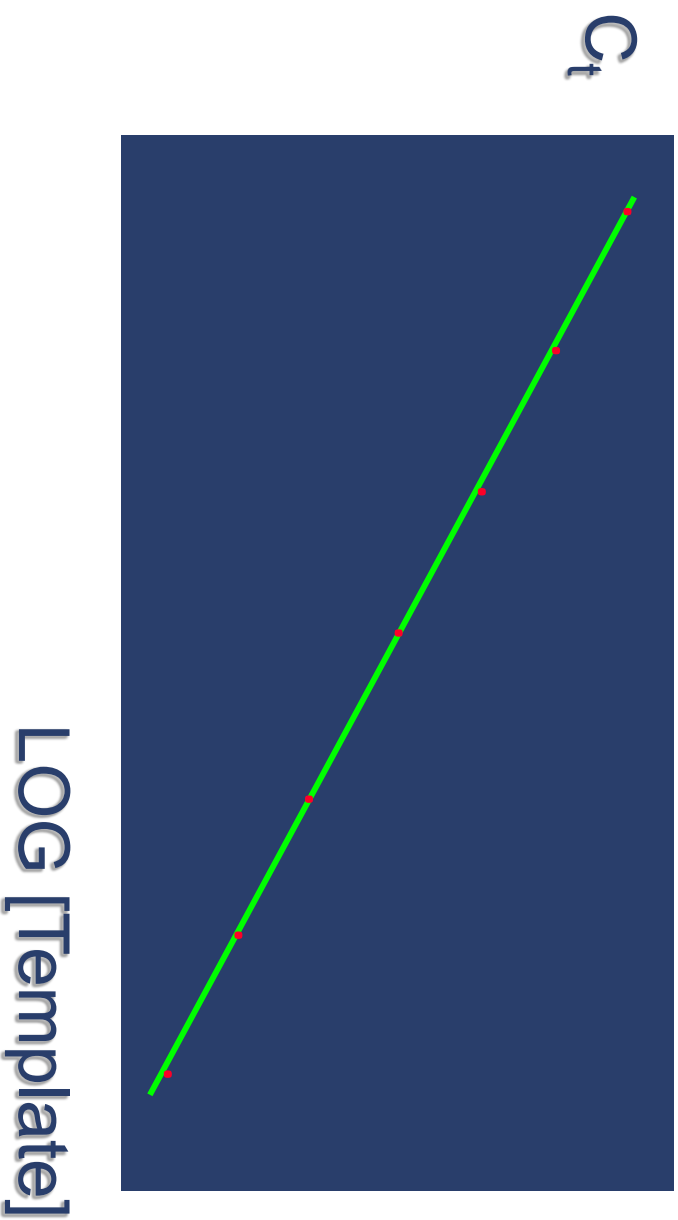
Señal significativamente mayor al background



Rango Dinámico

Ventana de concentración en la cual el templado puede ser cuantificado con precisión y exactitud

(Concentración máxima - mínima)

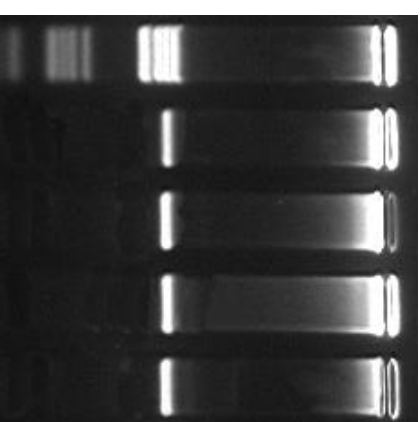


End Point PCR (ePCR)

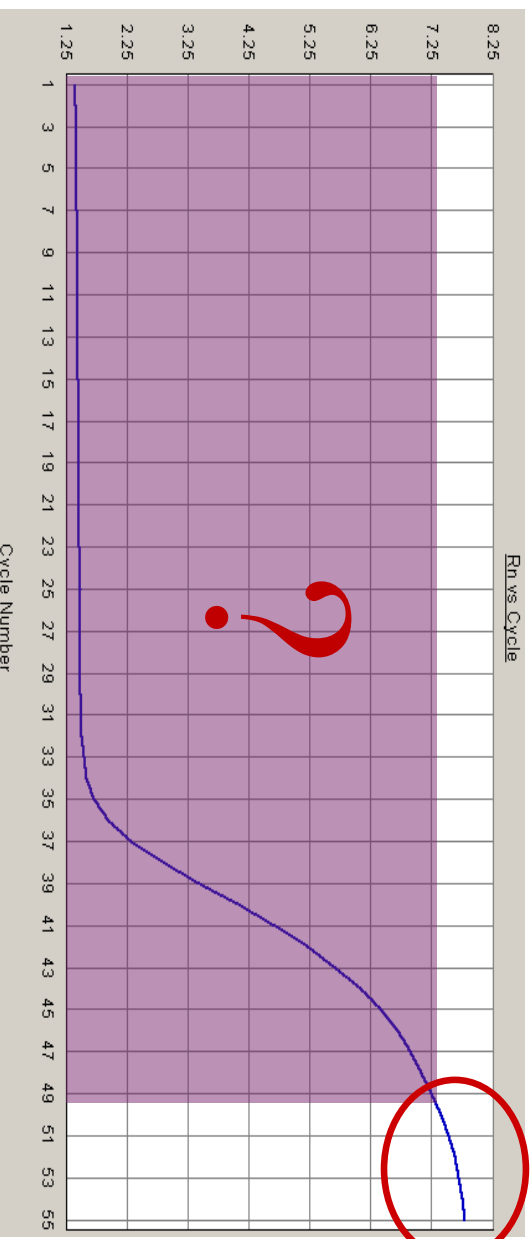
1°



2°



=



Cinética de la fase exponencial

$$P = T (1 + E)^n$$

Al evaluarse la cantidad de P en la fase exponencial, se asegura que $E=1$ (o sea 100%)

P = Producto final

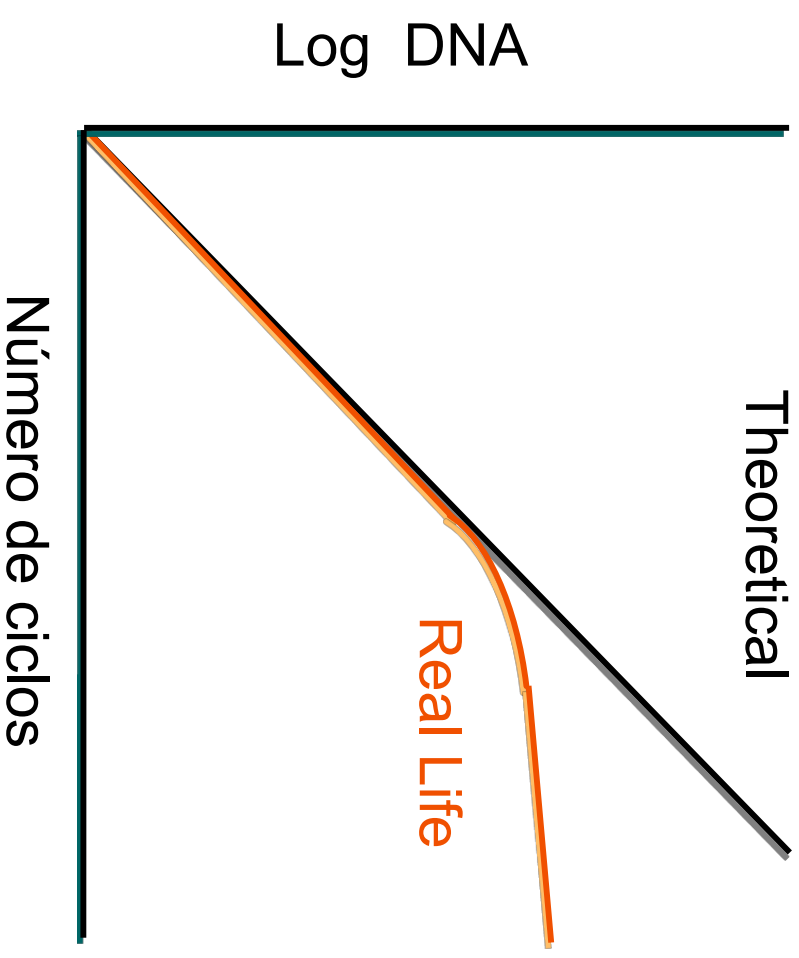
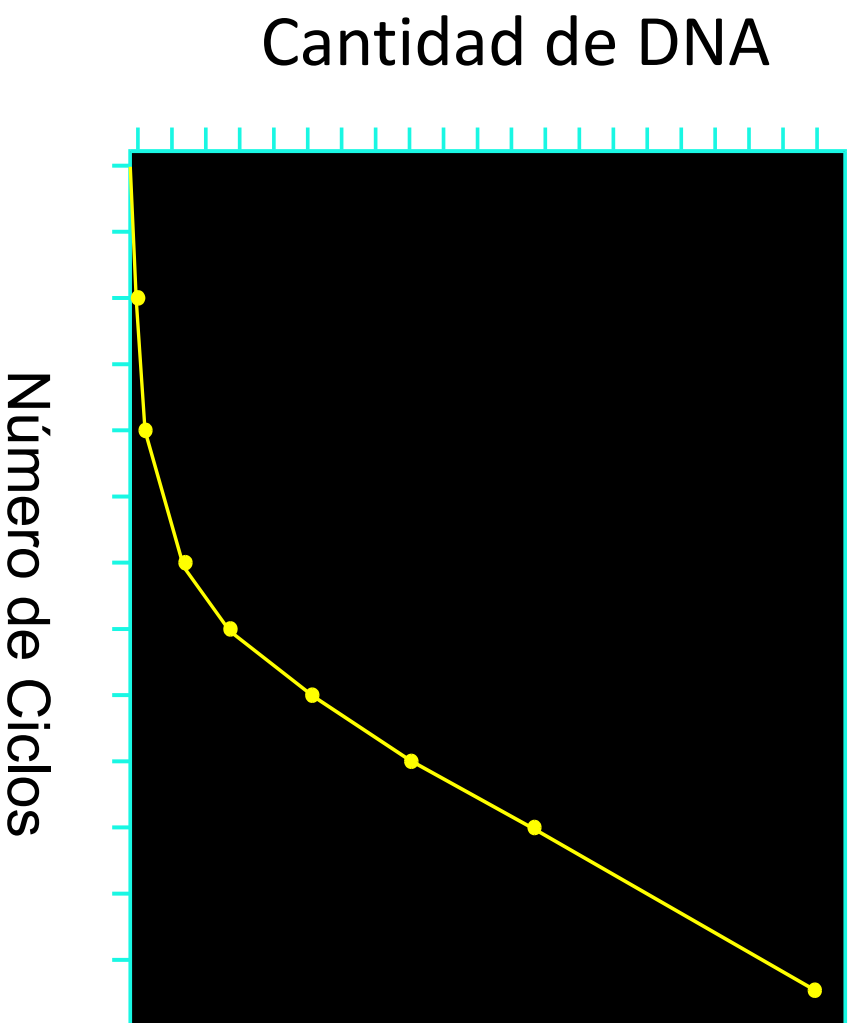
T = Templado al inicio de la reacción

E = Eficiencia de amplificación

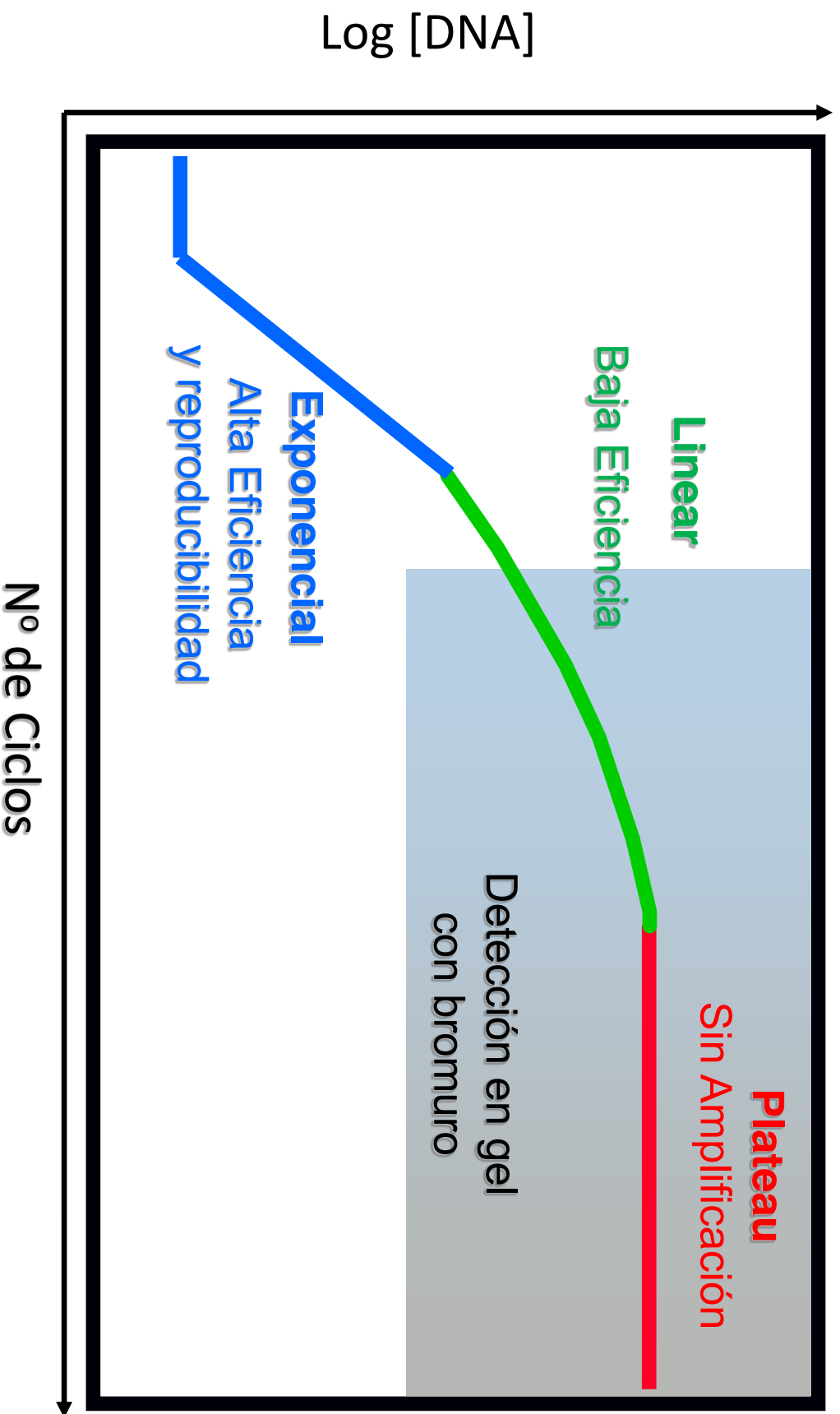
n = Número de ciclos

Cinética de amplificación del DNA en la PCR

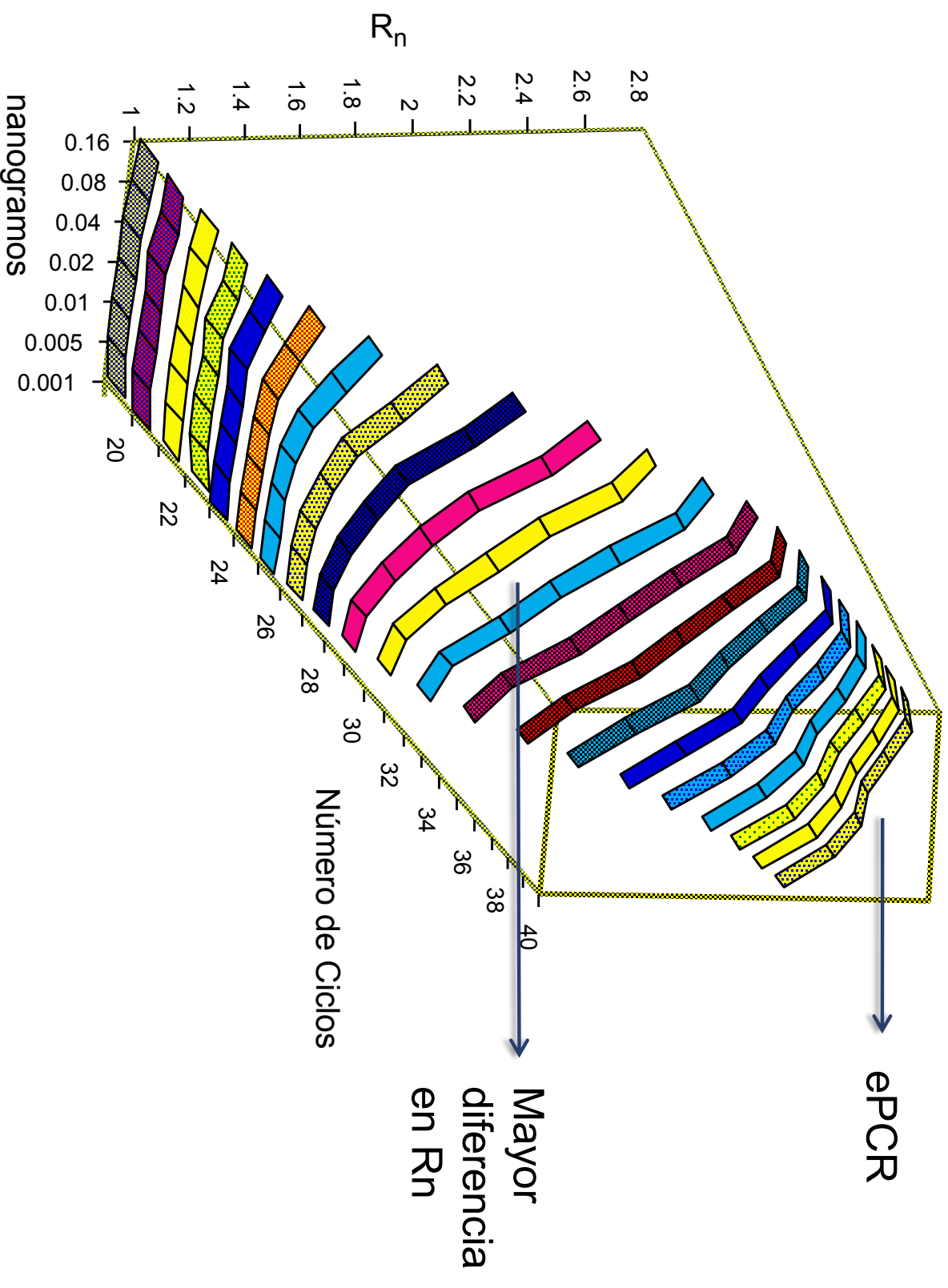
$$2^n$$



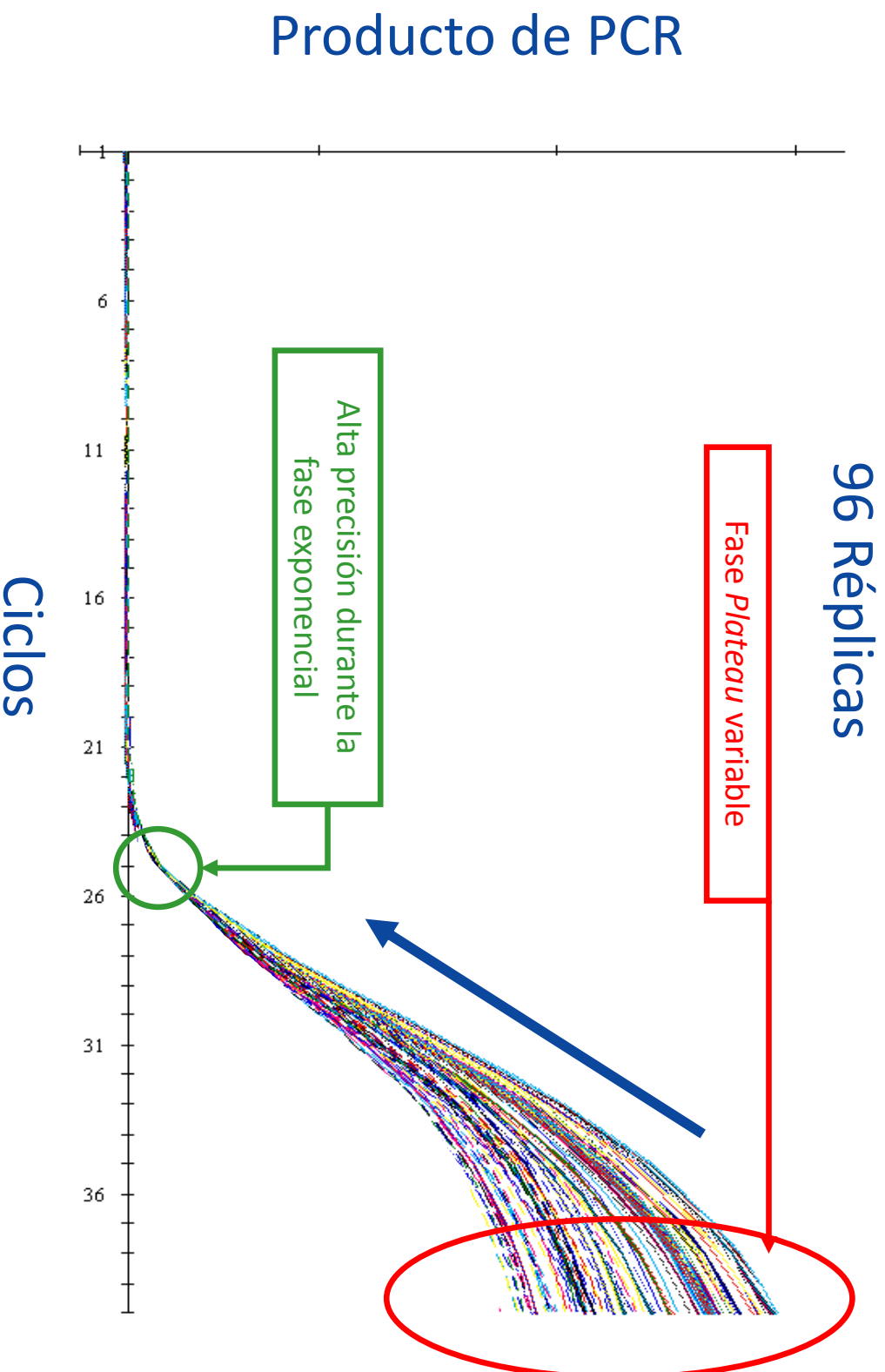
Fases de una PCR



Cinética de Amplificación



¿Por qué usar real time PCR?



Amplificación exponencial

Ciclo	Cantidad Relativa*
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
.	.
.	.
20	1,048,576
.	.
.	.
30	1,073,741,824

* Asumiendo Eficiencia del 100%

Eficiencia de Amplificación

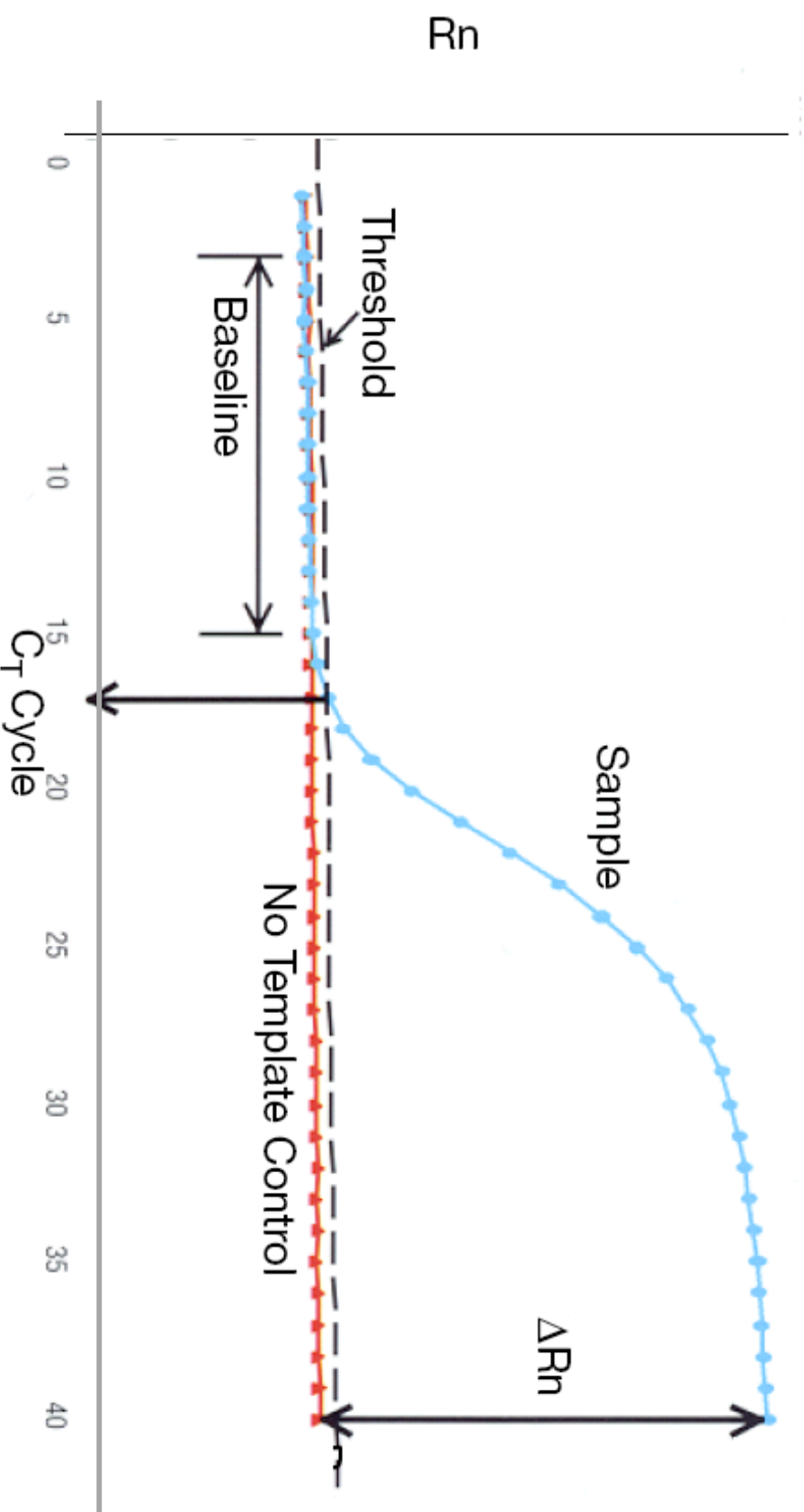
Depende de:

- Tamaño del Amplicón
- Diseño de los primers (T_m , estructuras secundarias, etc.)
- Concentración de los reactivos
- Condiciones de termociclado (T de annealing, rampa, etc.)
- Calidad del templado (integridad del DNA/ cDNA)
- Presencia de inhibidores (calidad de extracción)
- Preparación de la reacción (pipeteo)

Conceptos importantes en real time PCR

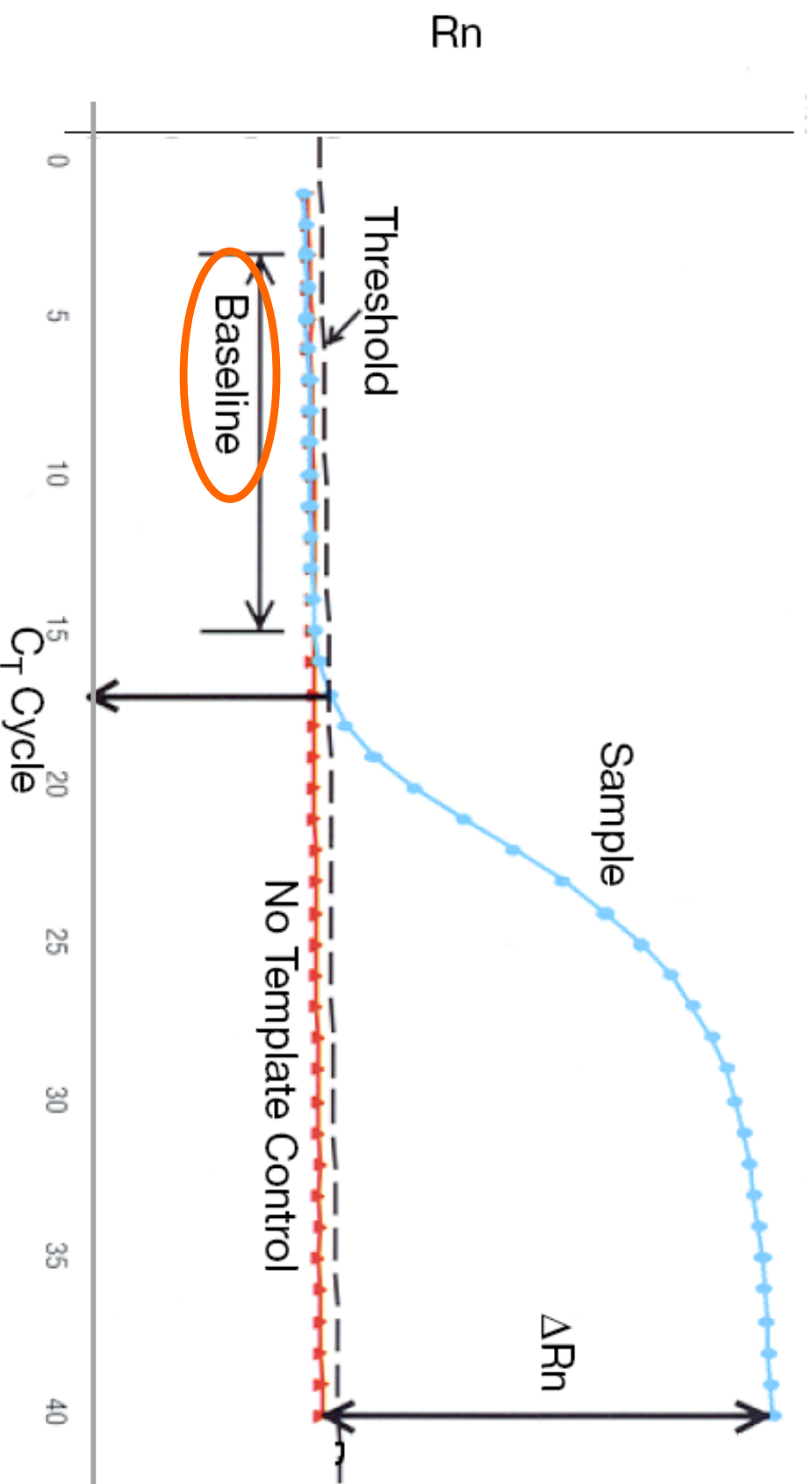
Amplification plot

Gráfica de la señal de fluorescencia vs. el número de ciclos.



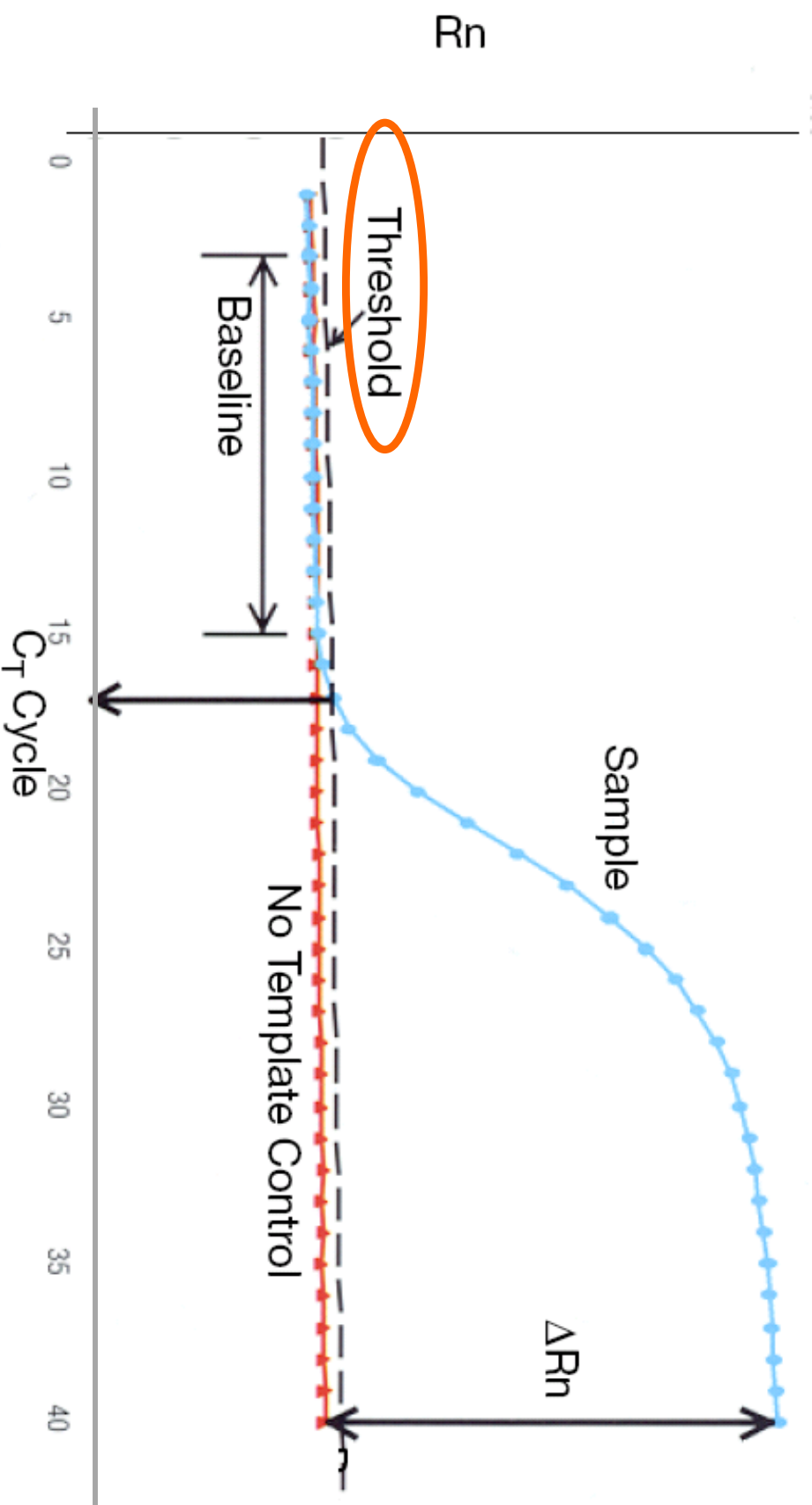
Baseline

Los ciclos iniciales de la PCR, en los cuales el cambio en la señal de fluorescencia es mínimo.



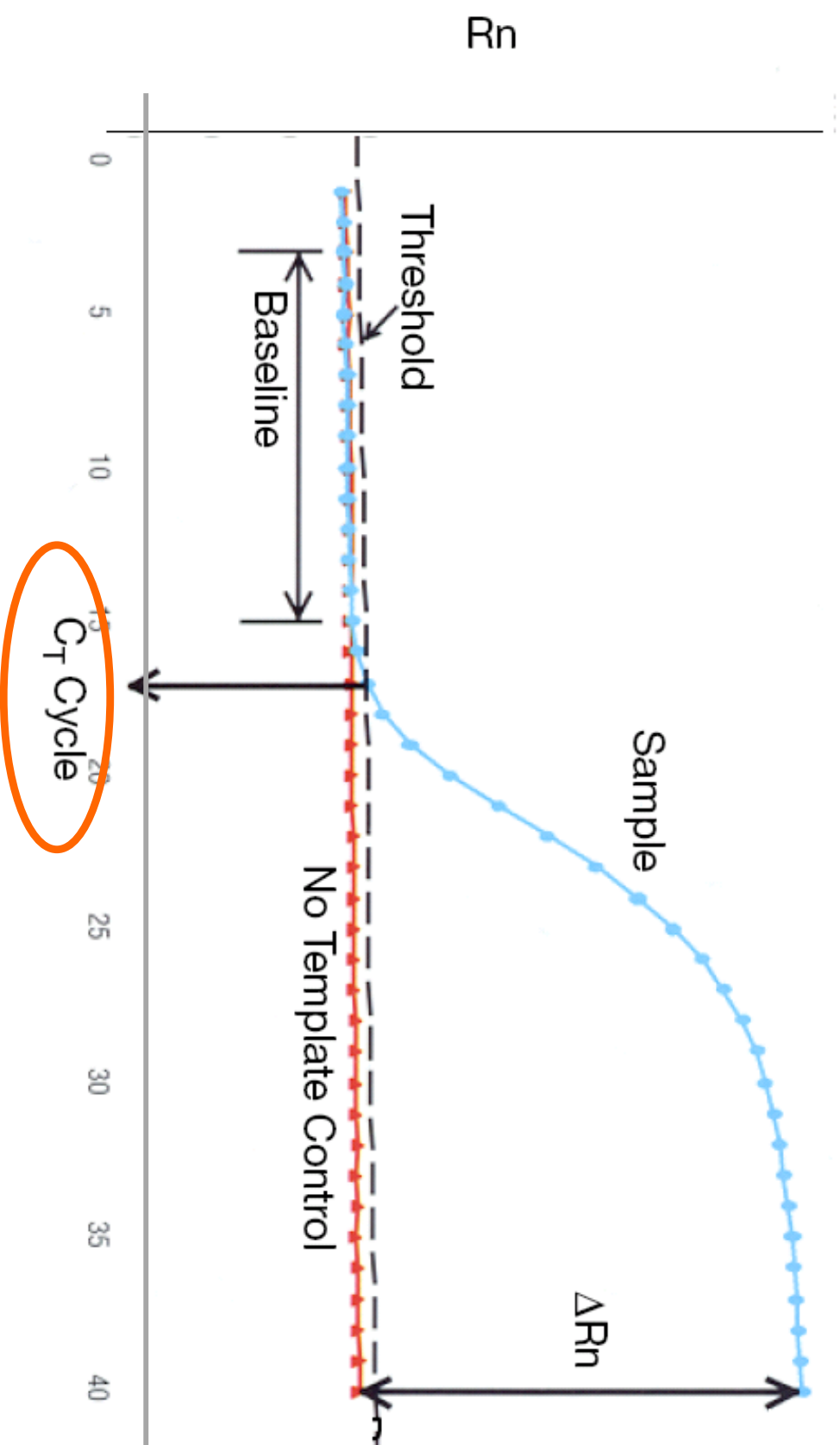
Threshold

Umbral de detección de fluorescencia.



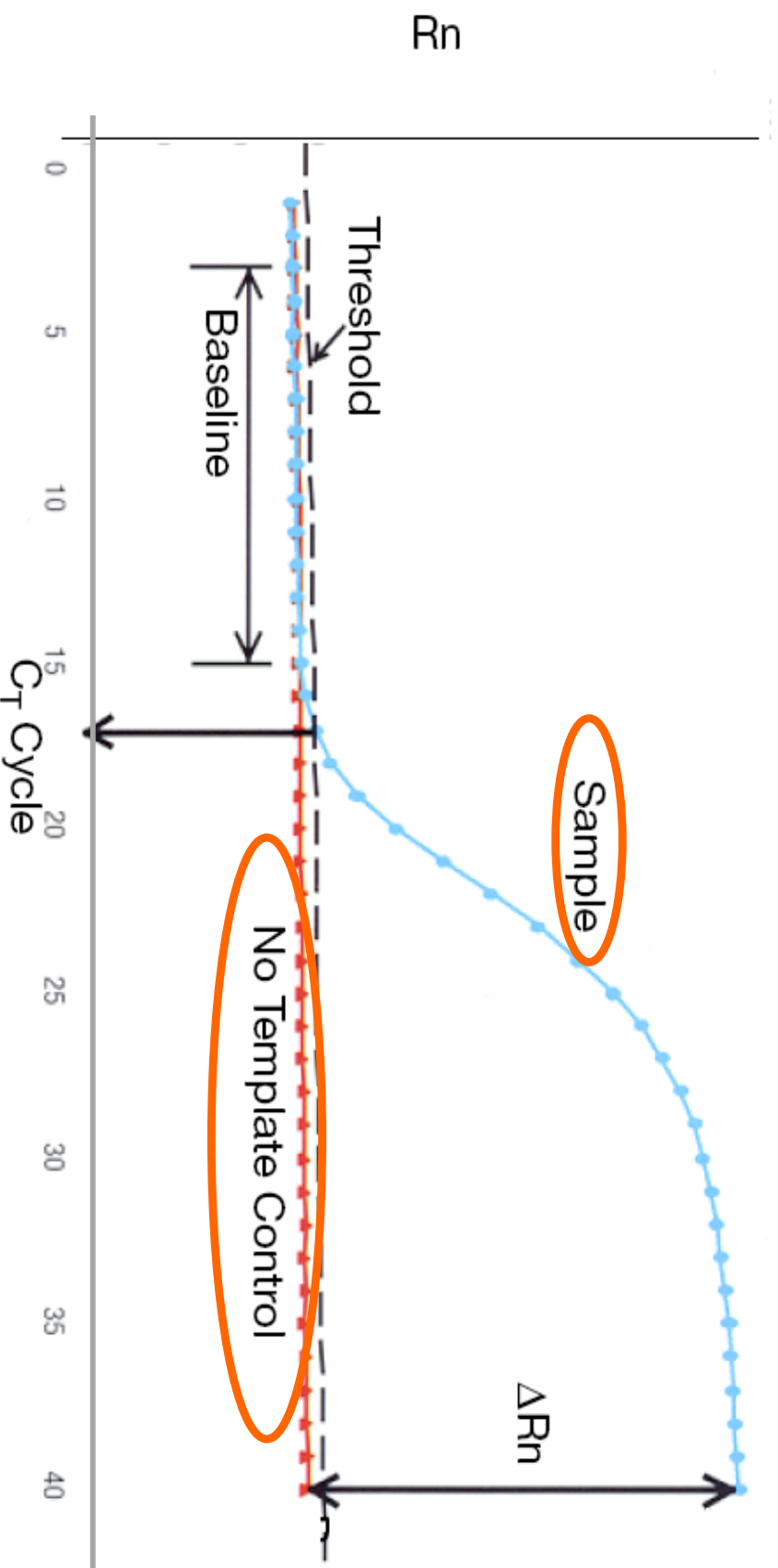
Ct (*threshold cycle*).

El número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el threshold fijado.



Ácido nucleico blanco (molde)

Secuencia nucleotídica que se desea detectar y/o cuantificar

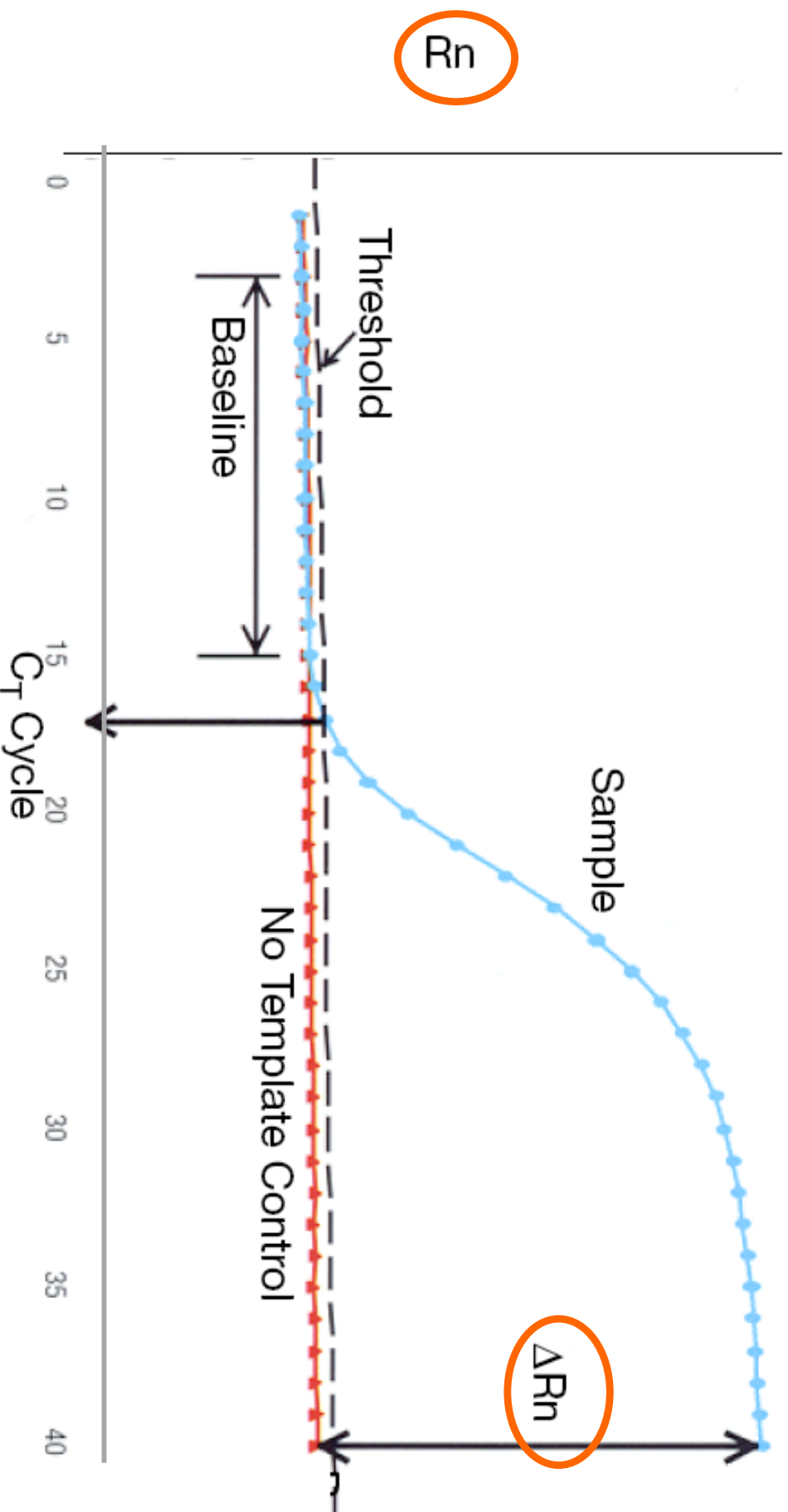


NTC (No Template Control)

Una muestra que no contiene templado, usada para la verificación de la calidad de la amplificación.

R_n

Nivel de fluorescencia generada por la PCR.



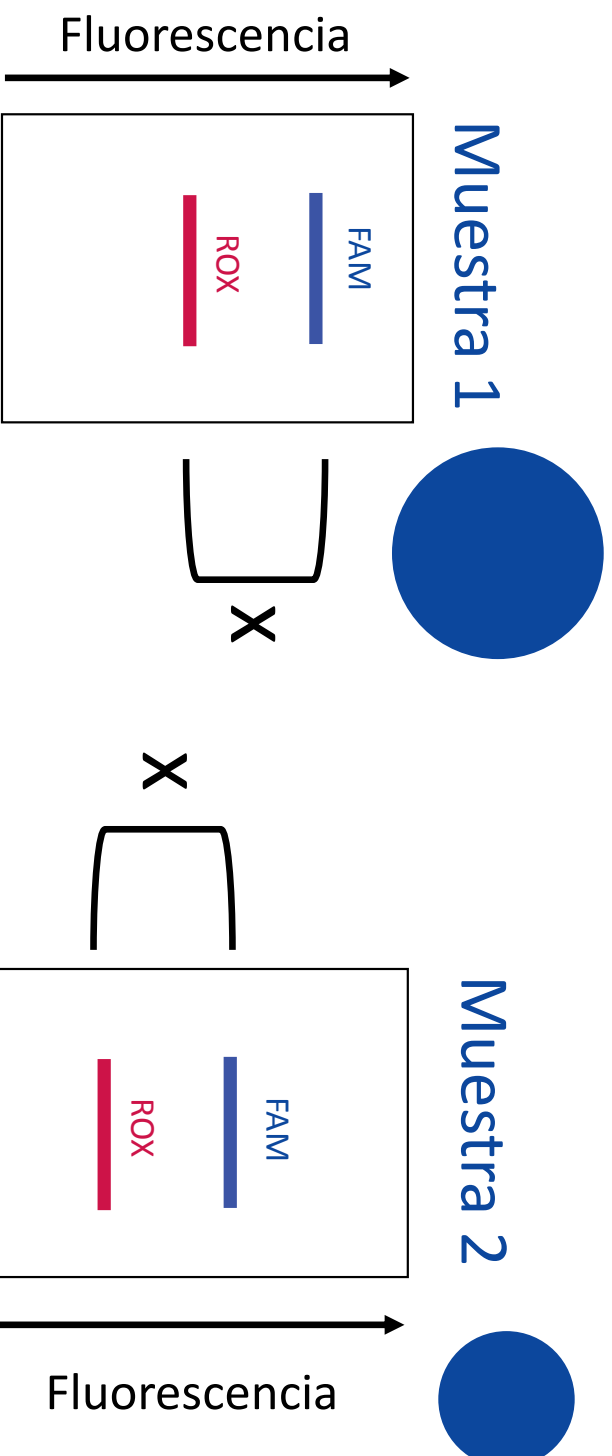
ΔR_n

Nivel de fluorescencia de la reacción menos la fluorescencia de los reactivos.

Referencia pasiva

El ROX normaliza **variaciones** fluorescentes **no relacionadas a la PCR**

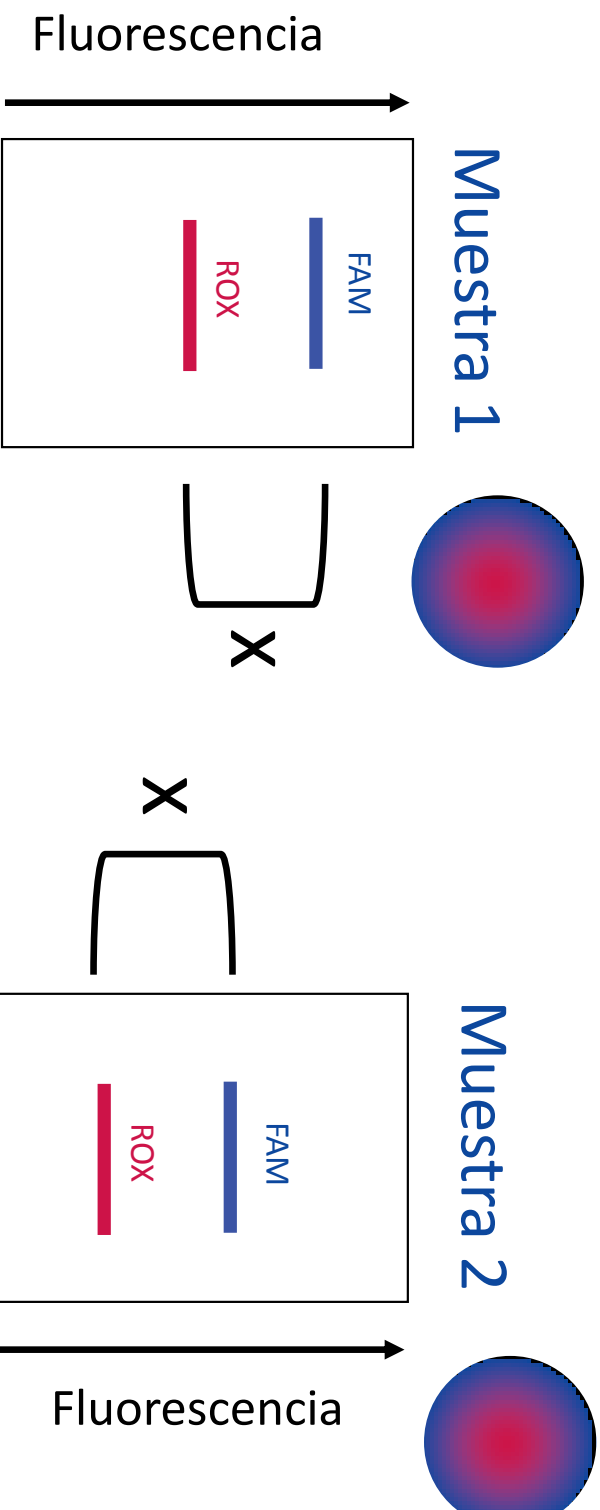
ROX dye



Referencia pasiva

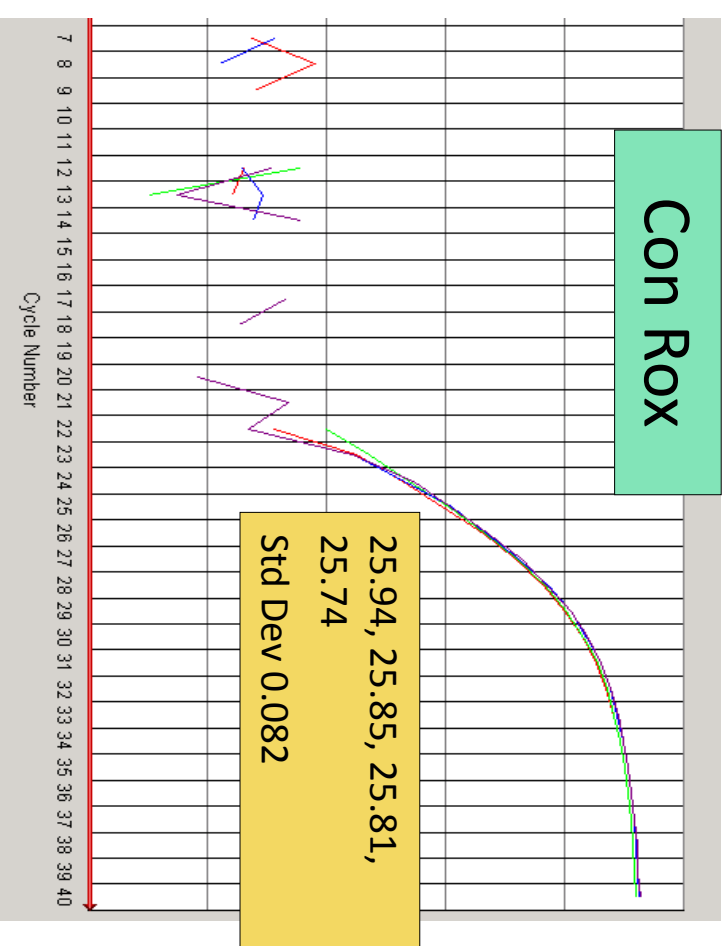
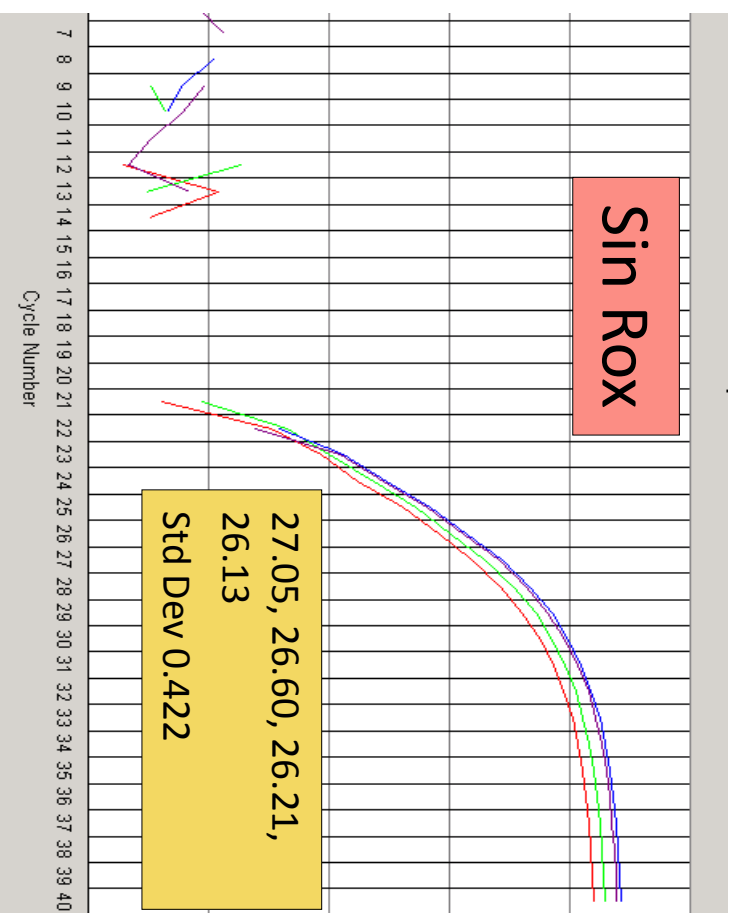
El ROX normaliza **variaciones fluorescentes** no relacionadas a la PCR

ROX dye

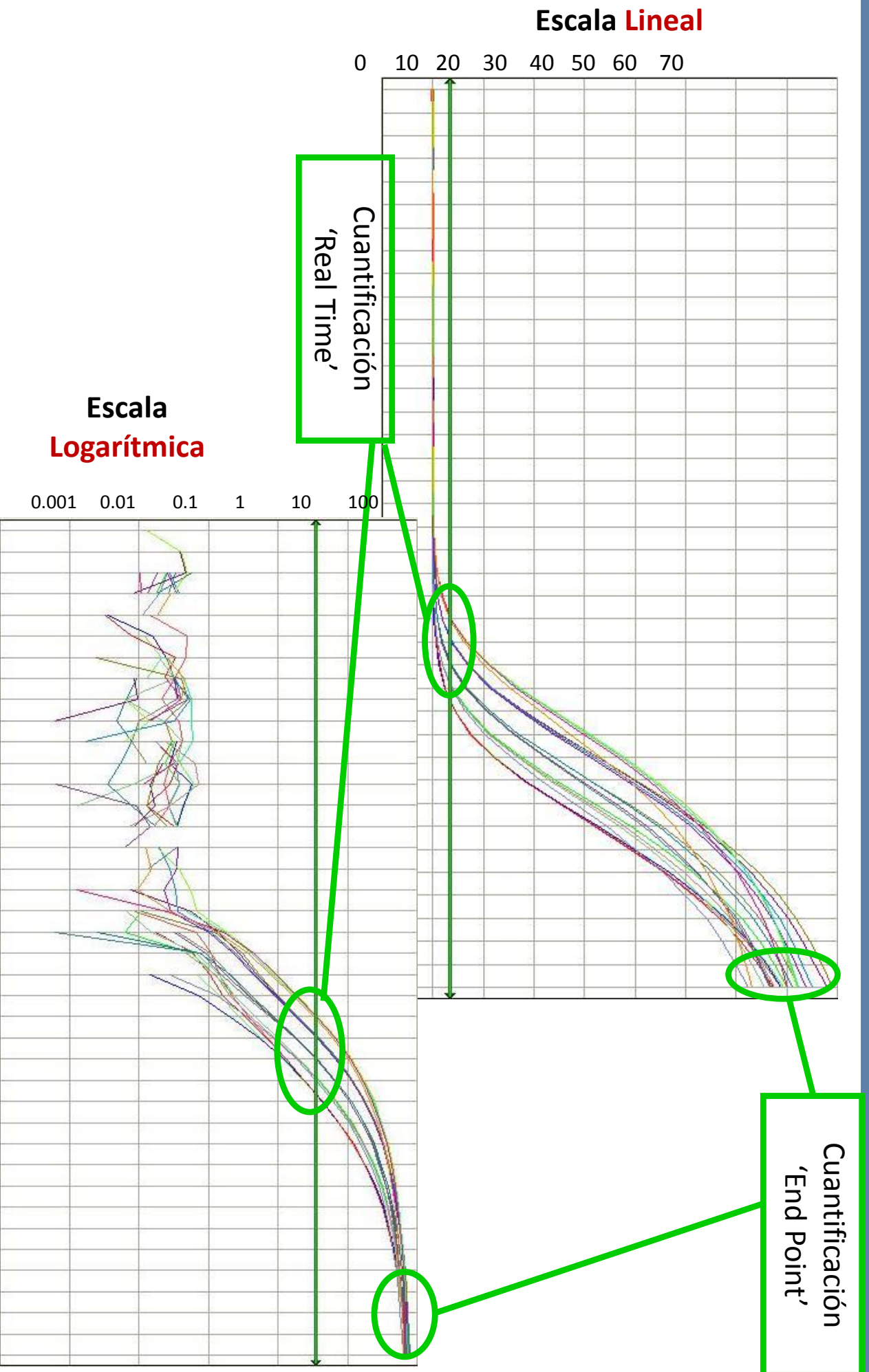


Referencia pasiva (ROX)

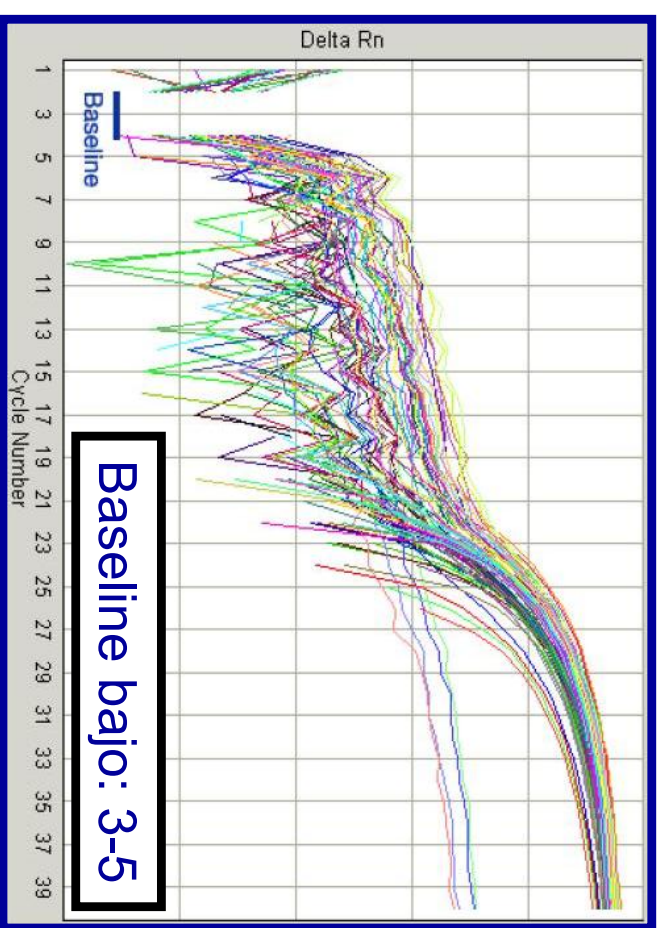
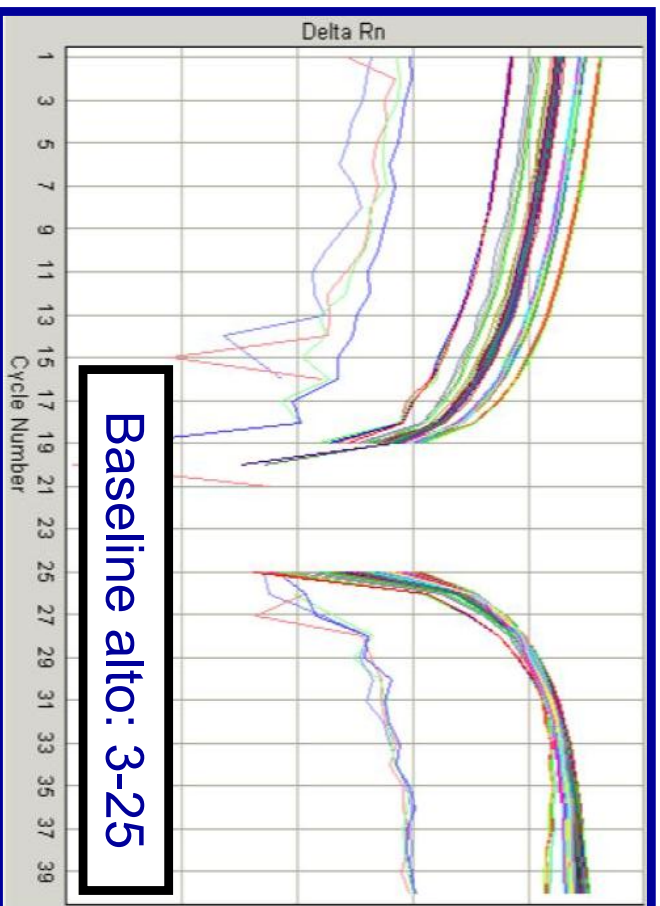
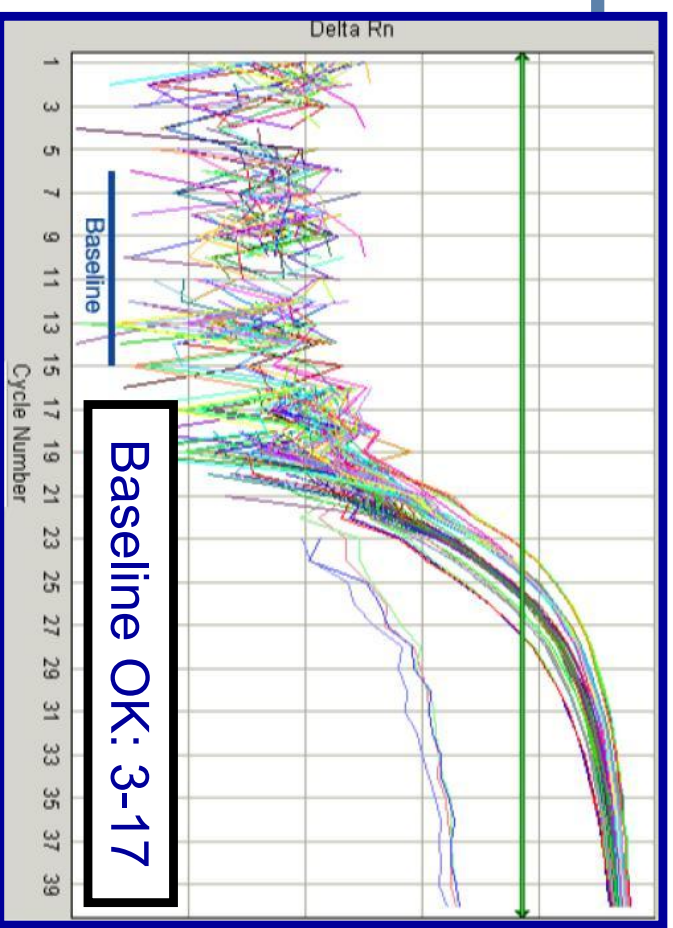
Incremento en la precisión usando ROX.



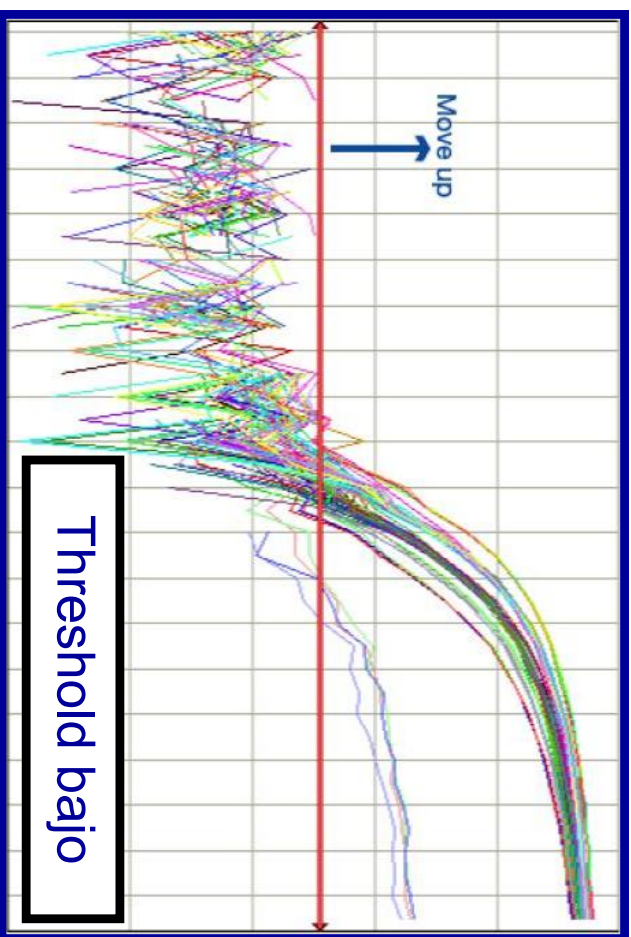
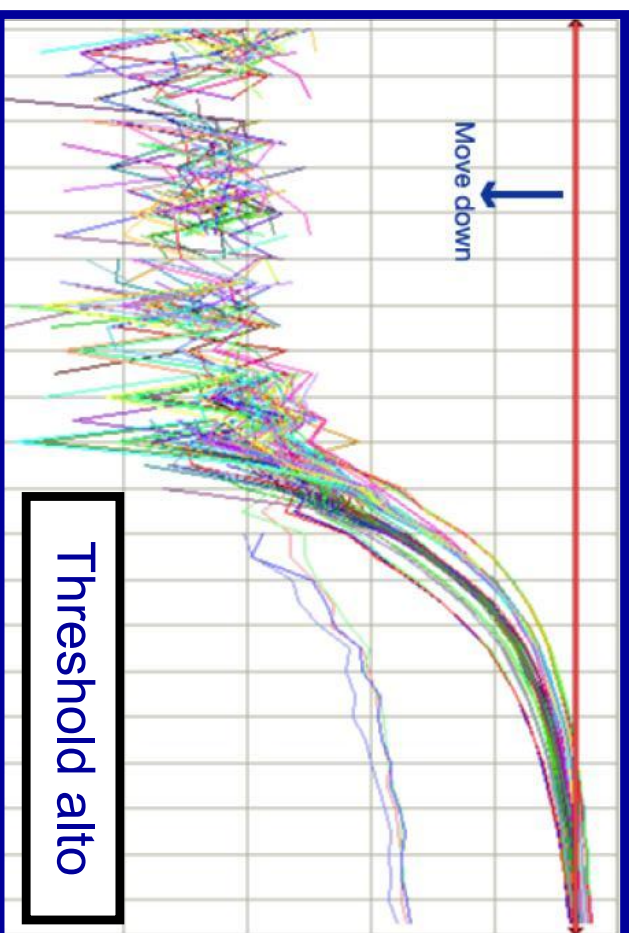
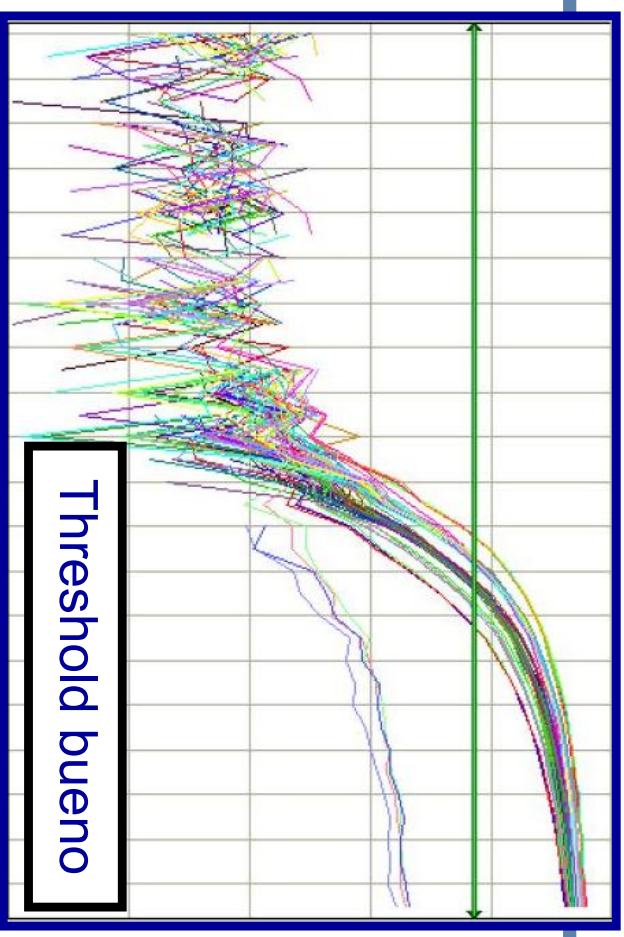
Visualización de las curvas



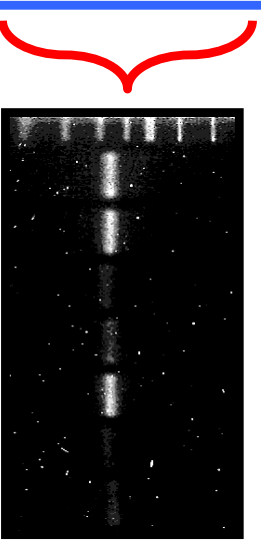
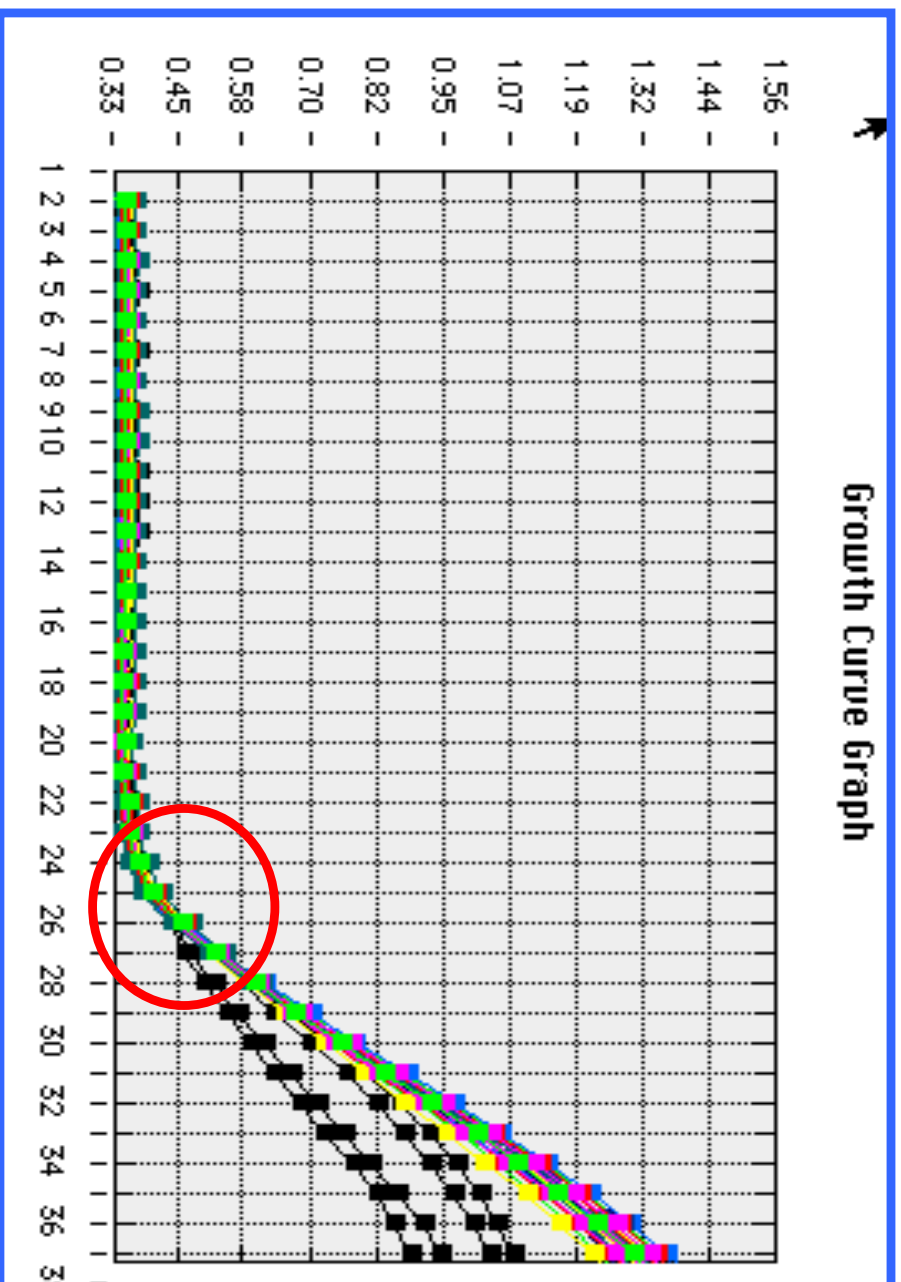
Análisis de Baseline



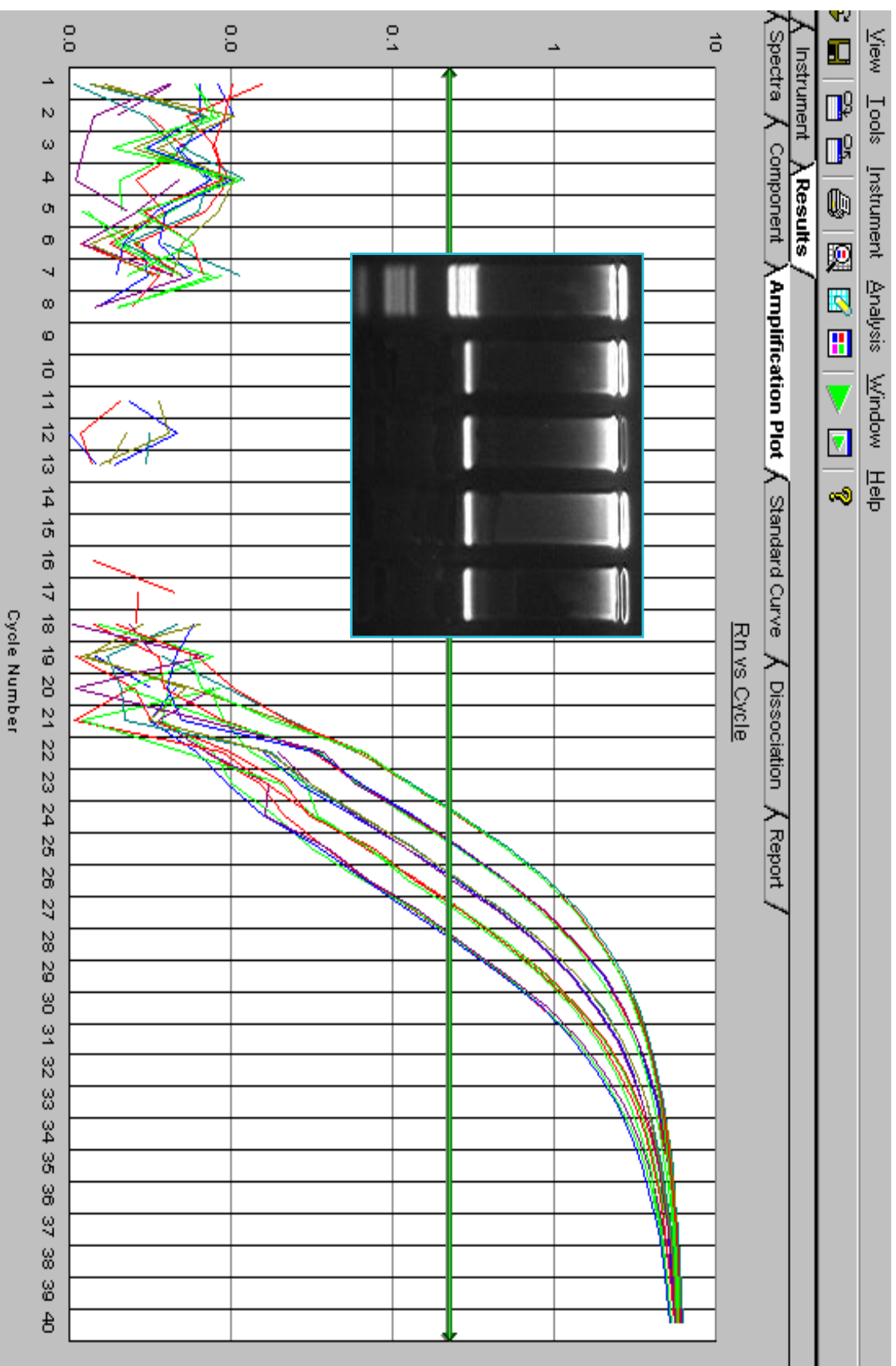
Análisis del Threshold



Punto Final vs. Tiempo Real



Punto Final vs. Tiempo Real



Ventajas PCR tiempo real

Método confiable de cuantificación:

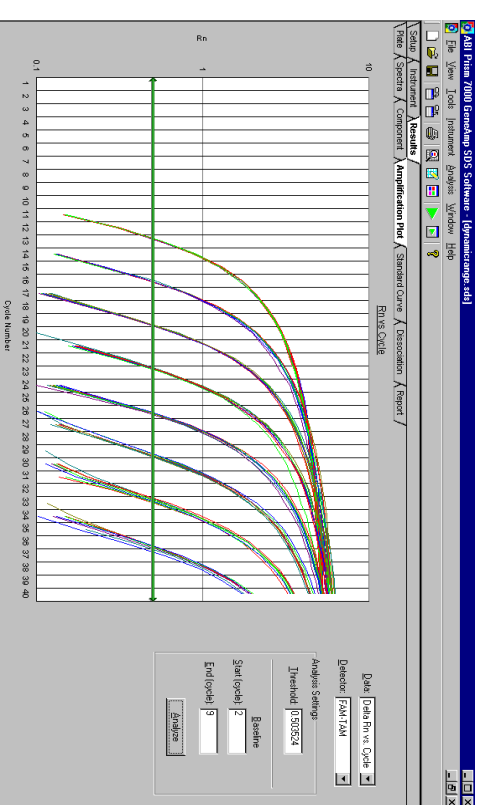
- Análisis en la fase geométrica de amplificación.
- Específico .
- Exacto.
- Preciso.
- Alta sensibilidad.
- Amplio Rango Dinámico.

Múltiples aplicaciones.

Resultados rápidos en gran escala.

Elimina el uso de electroforesis.

Sin riesgo de contaminación!



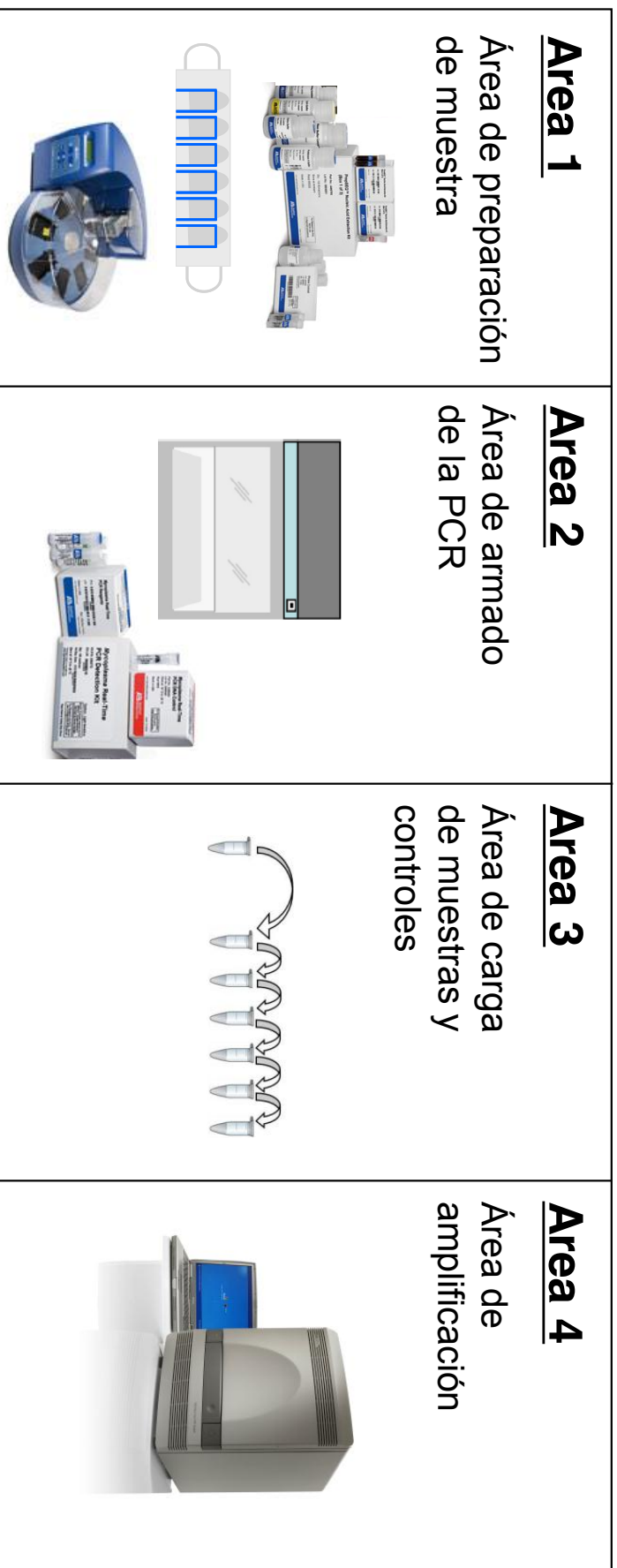
!!!No más Geles!!!



Buenas prácticas de laboratorio

Cómo organizar un Laboratorio de Real Time PCR

Para evitar contaminación cruzada y falsas amplificaciones, considere montar 4 áreas separadas en el laboratorio



Reactivos

- Mantenerlos tapados siempre
- Almacenaje adecuado
- Minimizar los ciclos de congelamiento/enfriamiento:

ALICUOTAR

- Mezclar en vortex antes de usar



Tips

- Usar tips con filtro
- Cambiar el tip cuando se cambia de reactivo o muestra
- No tocar los tips

Pipetas

- Utilizar diferentes pipetas para cada área
- Mantenerlas calibradas



Tubos & Placas

- Mantenerlos tapados
- No tocar su interior
- Todo es descartable y no puede utilizarse más de una vez
- No autoclavar antes de usar



Guantes

- Guantes libres de talco (o lavados con agua y jabón)
- Cambiar los guantes entre áreas

