



ALAG

ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA
DE GENÉTICA



SOCIEDAD
DE GENÉTICA
DE CHILE

Doctorado en
Biotecnología
PUCV - UTFSM

CURSO

Análisis de expresión diferencial de genes e investigación reproducibile con R

Dra. Débora Torrealba Sandoval

Clase 7

Genes de referencia

Plan de la clase

- Cuantificación absoluta
- Cuantificación relativa
- Genes de referencia
- Actividad de aprendizaje con R

Tipos de cuantificación

**Cuantificación
absoluta**



Plantillas



ADN



ARN

**Cuantificación
relativa**



Normalizado



Gen de
referencia

RT-PCR

Cuantificación absoluta

Cuantificación absoluta

- Determina el **número de copias exactas** presentes en la muestra.
- Se necesita de una curva estándar.
- Es un protocolo laborioso y difícil de llevar a cabo.
- Resultado: cantidad de ácidos nucleicos (número de copias o μg) por una cantidad de muestra (por célula, por μg de ARN total).

Plantillas de ADN



❖ Amplicón de PCR o plásmido



Pros: Fácil de generar, cuantificar y mantener estabilidad

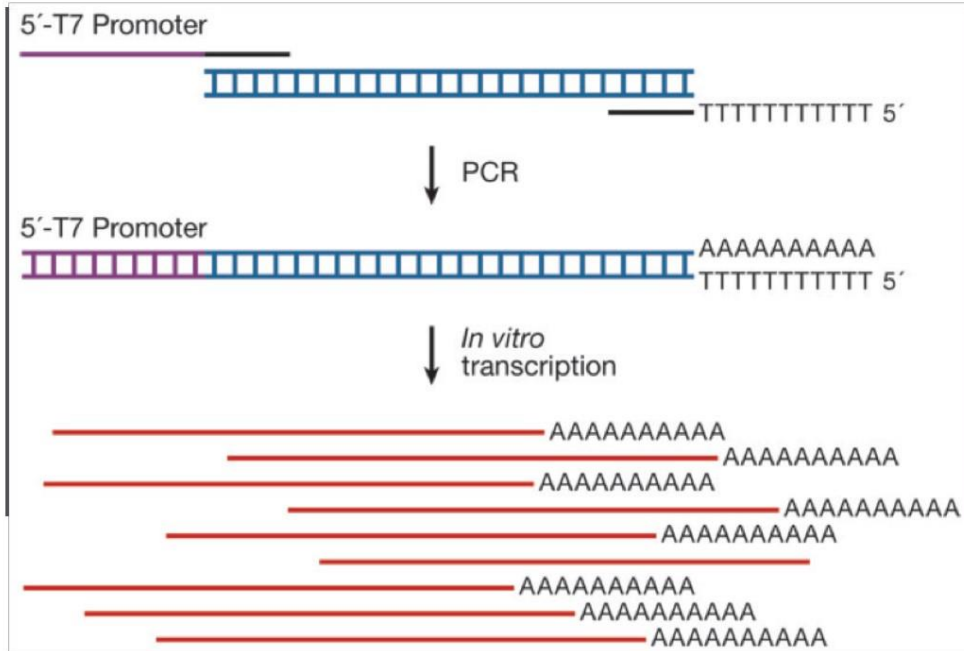


Contra: No puede someterse al paso de transcripción inversa de qRT-PCR, que puede afectar significativamente la eficiencia de la reacción

Plantillas de ARN



❖ ARN transcrito *in vitro*



Real Time-PCR. Life Technologies

Plantillas de ARN



❖ ARN transcrito *in vitro*



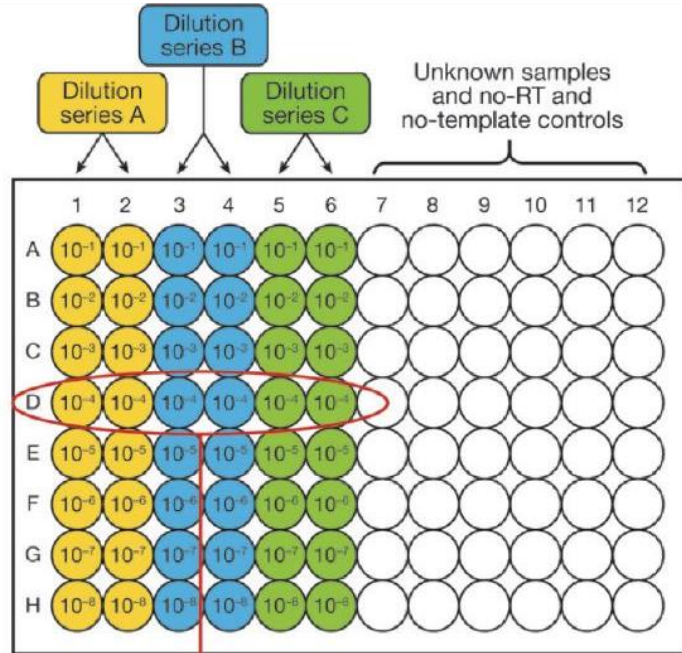
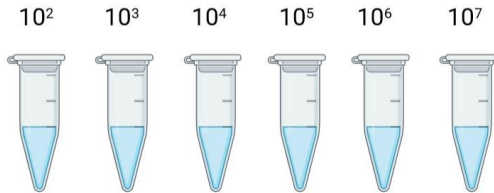
Pros: Aumenta eficiencia RT e imita el objetivo de interés



Contra: Consume tiempo el generar el ARN y es difícil de mantener la precisión a lo largo del tiempo debido a la inestabilidad del ARN

Curva estándar

Dilución
seriada



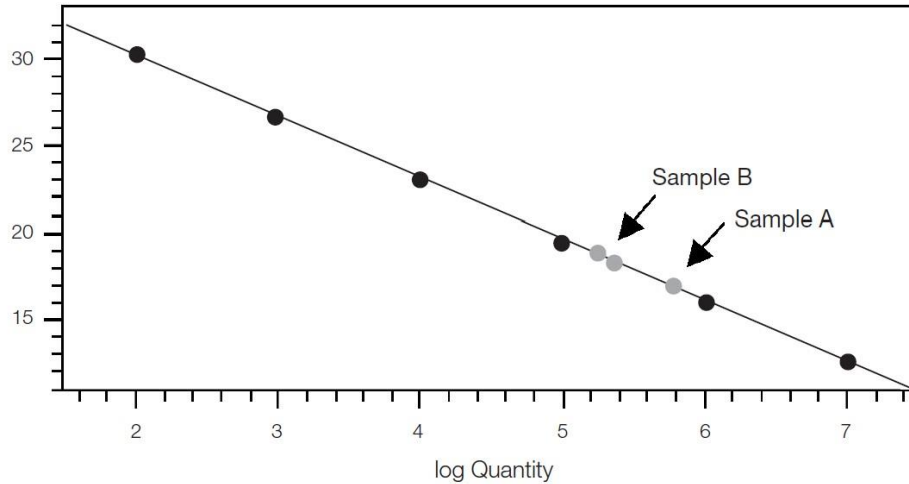
Replicate	1	2	3	4	5	6	AVG
C_t	21.5	22.1	21.8	20.1	20.7	21.7	21.4

Real-Time PCR. BioRad

Curva estándar

$$y = -3.50x + 37.20; r^2 = 0.999$$

B-actina ΔC_T



Real Time-PCR. Life Technologies

Cuantificación absoluta

Table 4.1. Determination of the absolute copy number of β -actin in unknown samples A and B using the absolute quantification method. The equation of the linear regression line shown in Figure 4.1 was used to calculate the copy number of the unknown samples.

Sample	Replicate	C _T	Copies
A	1	18.61	204,577
A	2	18.41	234,115
A	3	18.87	172,300
Average			203,664 \pm 30,917
B	1	17.06	569,789
B	2	17.07	563,823
B	3	17.00	591,173
Average			574,928 \pm 14,381

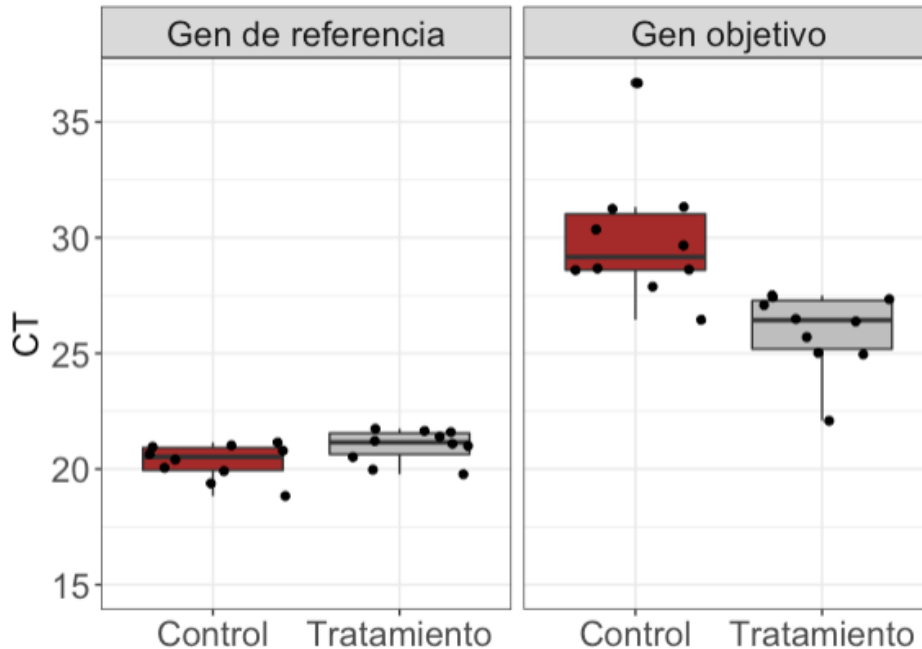
Real-Time PCR. BioRad

RT-PCR

Cuantificación relativa

Cuantificación relativa

Gen de interés es normalizado contra **gen de referencia**



Ejemplo genes de referencia

EF-1, GADPH,
Beta-actina, 18S

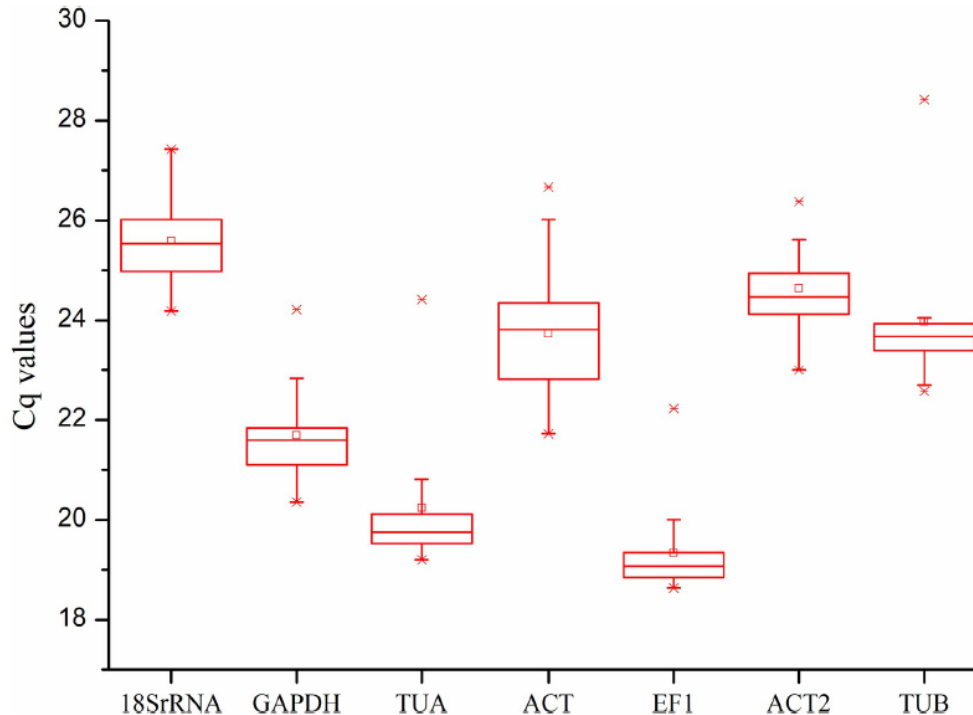
¿Qué es un gen de referencia?

- Se usan como calibradores de la cuantificación relativa.
- Se trata de genes que se expresan de forma constitutiva, estable e independiente del estado fisiológico de la célula.

Constitutiva: Que se expresa siempre en todos los tejidos y estados de desarrollo de un organismo.

Estable e independiente: Que su variación es pequeña entre tejidos o tratamientos.

Ejemplo genes de referencia evaluados en plantas

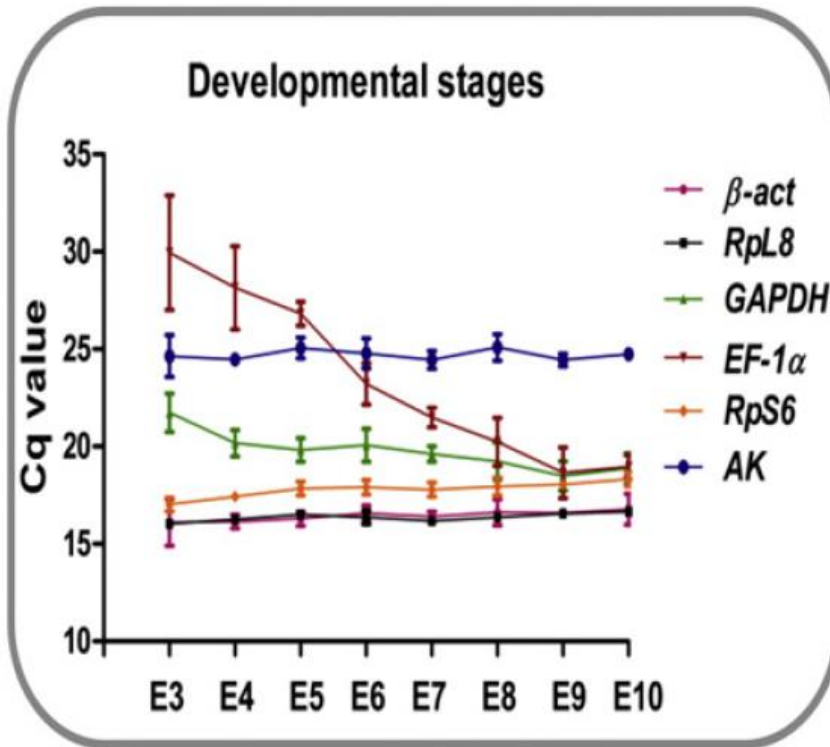


Nogal europeo



Zhou et al. 2018.
PLOS ONE

Variación genes de referencia: estados de desarrollo



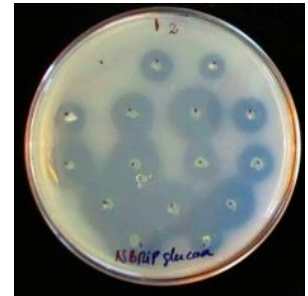
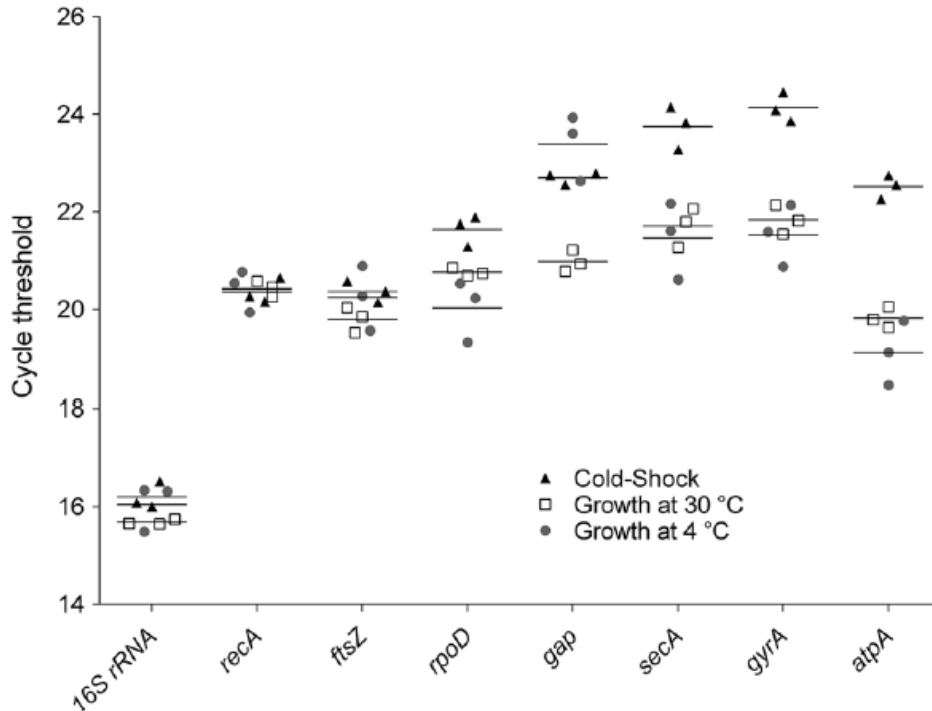
Camarón de río



Jaramillo et al. 2017
Gene

Variación genes de referencia: temperatura

Pseudomonas antartica expuesta a diferentes temperaturas



García-Laviña et al.
2019. Extremophiles

Métricas para evaluar estabilidad

Coeficiente de variación (CV) de los valores de Ct: Es una medida muy simple de calcular y permite comparar entre genes, muestras y tratamientos (tejidos, estados de desarrollo, estrés ambiental, etc.).

- **CV y desviación estándar (SD):** variación más baja esta relacionado al gen más estable.

Cualquier gen con valor mayor a 1 es considerado poco estable.

CV y desviación estándar (SD)

Table 2. The stability of candidate reference genes based on Bestkeeper analysis.

	Flower buds			Leaf buds			Different tissues			Different cultivars		
Rank	Gene	SD	CV (%)	Gene	SD	CV (%)	Gene	SD	CV (%)	Gene	SD	CV (%)
1	<i>EF1</i>	0.31	1.60	<i>18srRNA</i>	0.76	2.89	<i>EF1</i>	0.36	1.87	<i>TUB</i>	0.11	0.49
2	<i>TUA</i>	0.33	1.69	<i>ACT2</i>	0.79	3.10	<i>ACT2</i>	0.52	2.08	<i>TUA</i>	0.13	0.68
3	<i>TUB</i>	0.41	1.73	<i>GAPDH</i>	0.82	3.60	<i>GAPDH</i>	0.54	2.45	<i>EF1</i>	0.15	0.80
4	<i>ACT2</i>	0.43	1.78	<i>TUB</i>	1.22	5.01	<i>18S rRNA</i>	0.88	3.40	<i>GAPDH</i>	0.20	0.94
5	<i>GAPDH</i>	0.49	2.33	<i>EF1</i>	1.23	6.15	<i>ACT</i>	1.07	4.49	<i>ACT2</i>	0.23	0.93
6	<i>18S rRNA</i>	0.54	2.14	<i>ACT</i>	1.26	5.26	<i>TUA</i>	1.62	7.63	<i>18S rRNA</i>	0.37	1.45
7	<i>ACT</i>	0.65	2.76	<i>TUA</i>	1.28	6.16	<i>TUB</i>	1.82	7.34	<i>ACT</i>	0.62	2.65

Zhou et al. 2018. PLoS ONE.

Nogal europeo



Métricas para evaluar estabilidad

- **Valor de estabilidad:** la suma de la variación intra e intergrup al
Valor de estabilidad más bajo significa mayor estabilidad

Table 4

Reference gene expression stability values in embryonic developmental and adult tissues of *M. olfersii* based on several programs.

	Rank	NormFinder	
		Genes	Stability index
Developmental stages	1	<i>AK</i>	0.255
	2	<i>RpS6</i>	0.263
	3	<i>β-act</i>	0.280
	4	<i>RpL8</i>	0.310
	5	<i>GAPDH</i>	0.580
	6	<i>EF-1α</i>	2.969
Adult tissues	1	<i>RpS6</i>	0.699
	2	<i>RpL8</i>	0.706
	3	<i>β-act</i>	1.052
	4	<i>GAPDH</i>	1.329
	5	<i>AK</i>	1.945
	6	<i>EF-1α</i>	2.380

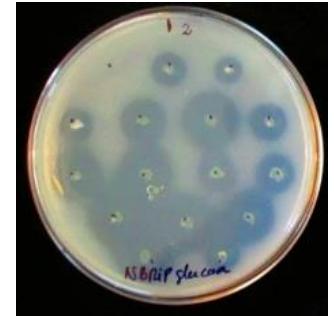
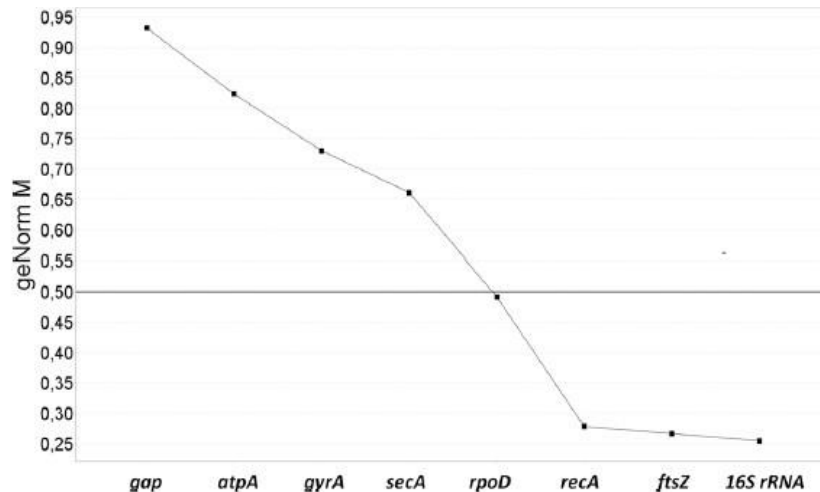
Camarón de río



Jaramillo et al. 2017. Gene.

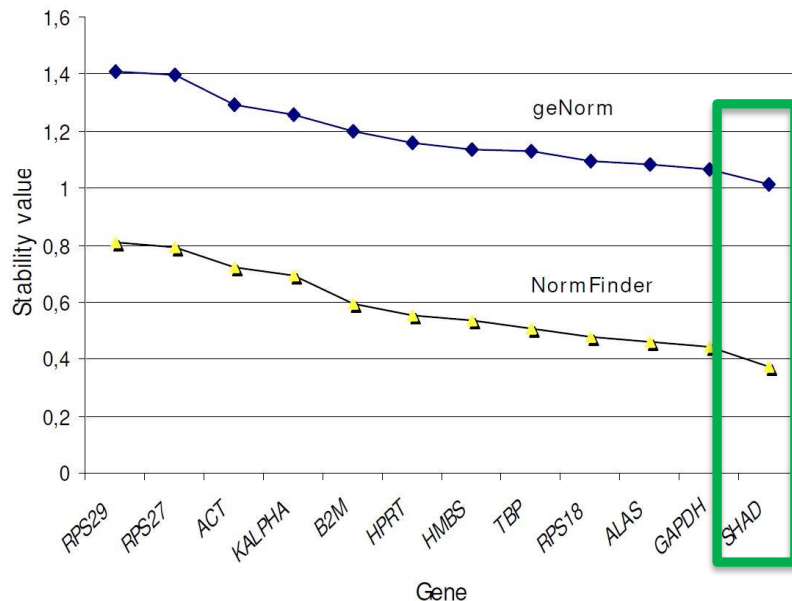
Métricas para evaluar estabilidad

- **Valor M:** variación por pares de un gen en particular en comparación con otros genes.
Valor M más bajo muestra mayor genes más estables. Valor máximo 1,5 M



García-Laviña
et al. 2019
Extremophiles

Software más usados para escoger un gen de referencia



NormFinder



BestKeeper

Lallemant et al. 2009. BMC Molecular Biology

NormFinder



MOMA –Department of Molecular Medicine
Aarhus University Hospital, Denmark

[ABOUT](#) | [RESEARCH](#) | [SERVICES](#) | [LOGIN](#)

Q search...

Genetic Analyses

NGS Core Center

cfDNA Analyses


NormFinder software ▾

NormFinder FAQ

MethCORR software

NormFinder software

Determine the optimal normalization gene

 NormFinder is an algorithm for identifying the optimal normalization gene among a set of candidates.

It ranks the set of candidate normalization genes according to their expression stability in a given sample set and given experimental design.

NormFinder can analyze expression data obtained through any quantitative method e.g. real time RT-PCR and microarray based expression analysis.

"NormFinder.xls" adds the NormFinder functionality directly to Excel. A version for R (updated June 2014) is also available.

License

Downloads



NormFinder Excel Add-In
(* .xls, MS Excel 2003) v0.953



NormFinder for R
version 5, 2015-01-05



Example Data
(MS Excel 2003)

- Valor de estabilidad. Se combina la variación intra e intergrupar, representando una medida del error sistemático que se introducirá al usar el gen investigado.

Actividad de aprendizaje

Selección de genes de referencia con Normfinder en R



Resumen de la clase

- Que es la cuantificación absoluta y revisamos los tipos de plantillas de ADN y ARN para la curva estándar
- Que es la cuantificación relativa y la normalización por unidad de masa y gen de referencia
- Que son los genes de referencia y las medidas de estabilidad
- Selección de genes de referencia con Normfinder en Rstudio.

Próximas clases

- Clase 8: Cálculo de la expresión génica relativa.
- Clase 9: Análisis exploratorio de datos de Ct.

