



ALAG

ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA
DE GENÉTICA



SOCIEDAD
DE GENÉTICA
DE CHILE

Doctorado en
Biotecnología
PUCV - UTFSM

CURSO

Análisis de expresión diferencial de genes e investigación reproducible con R

Dra. Débora Torrealba Sandoval



ALAG

ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA
DE GENÉTICA



SOCIEDAD
DE GENÉTICA
DE CHILE

Doctorado en
Biotecnología
PUCV - UTFSM

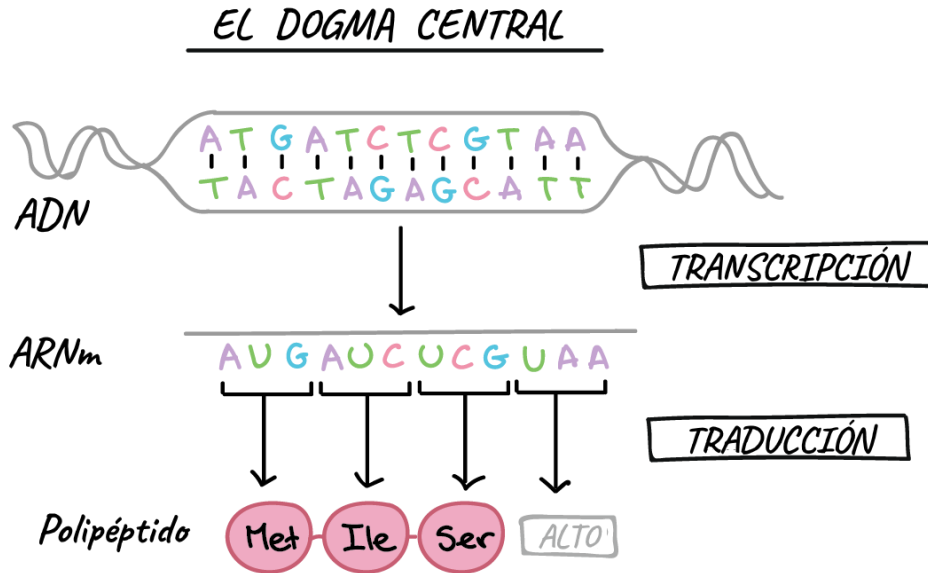
Clase 1

Introducción a la biología molecular y al análisis de la expresión diferencial de genes por qPCR

Plan de la clase

- Introducción al análisis de expresión diferencial de genes por qPCR.
- Recolección de muestras y mantención
- Métodos comunes de extracción de ARN
- Cuantificación de ARN
- Calidad del ARN

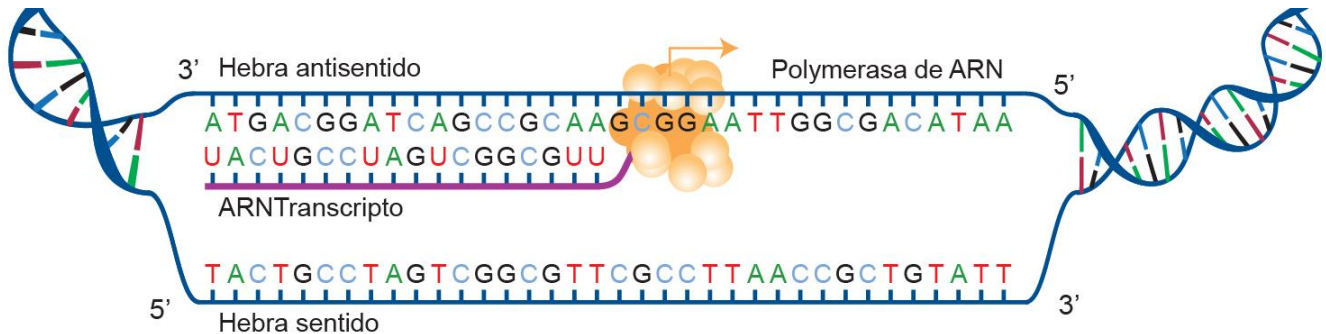
DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR



<https://genotipia.com/dogma-central-bm/>

TRANSCRIPCIÓN ADN A ARN

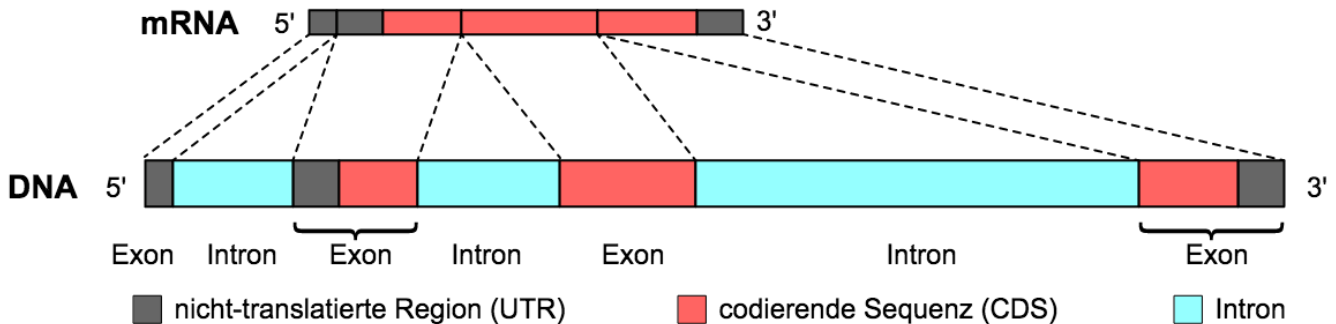
ARN polimerasa: Enzima que transcribe el ADN a ARN



ESTRUCTURA DE UN GEN

Los genes eucariones tienen exones e intrones.

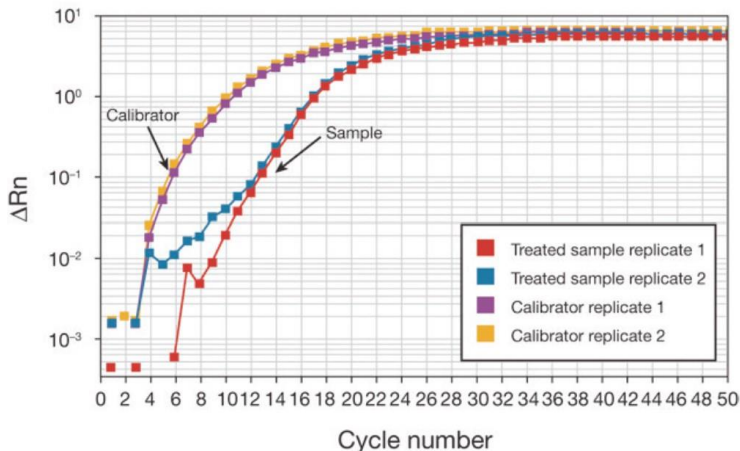
Los exones son la parte del ARN que codifica los aminoácidos de las proteínas.



¿Cómo se mide la expresión de un gen?

Cuantificación relativa

CT, gen de referencia y fold change

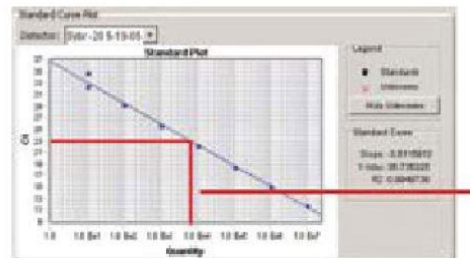
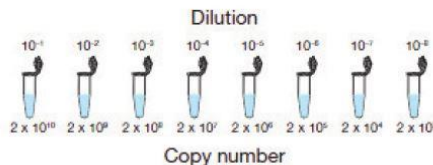


Life Technologies

Cuantificación absoluta

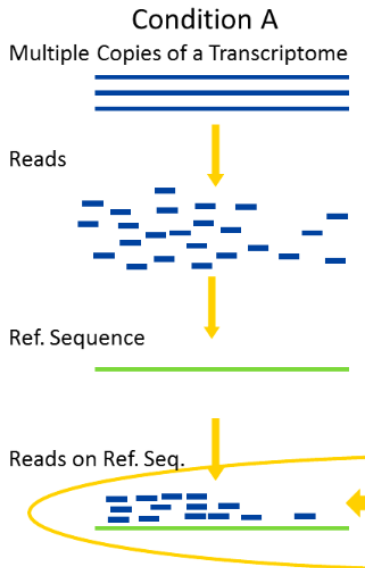
CT, Curva de calibración y fold change

Starting quantity = 2×10^{11} molecules

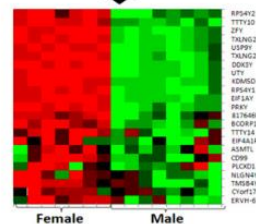
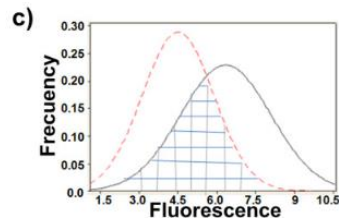
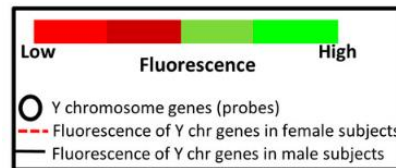


¿Cómo se mide la expresión de miles de genes?

Transcriptómica RNAseq



Microarreglo Thermo - Illumina

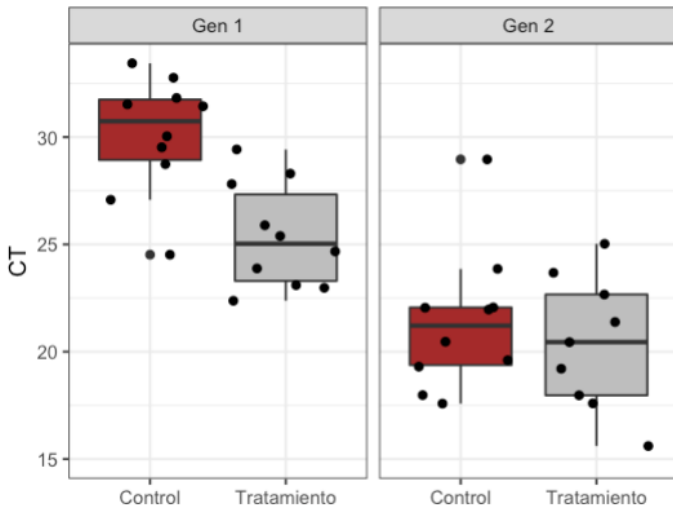


Análisis estadísticos de la expresión diferencial de genes.



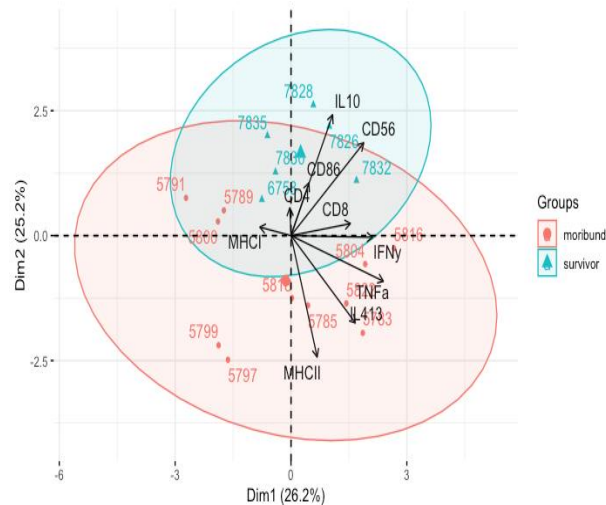
Inferencia estadística

Anova y pruebas no paramétricas

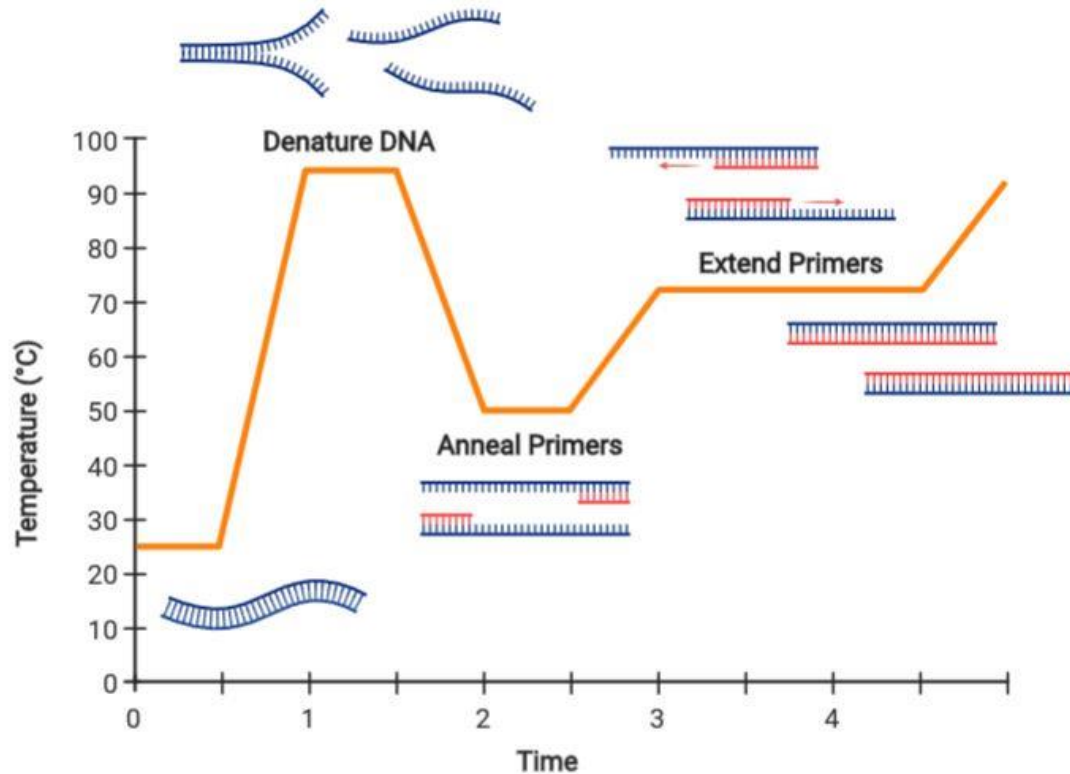


Análisis multivariado

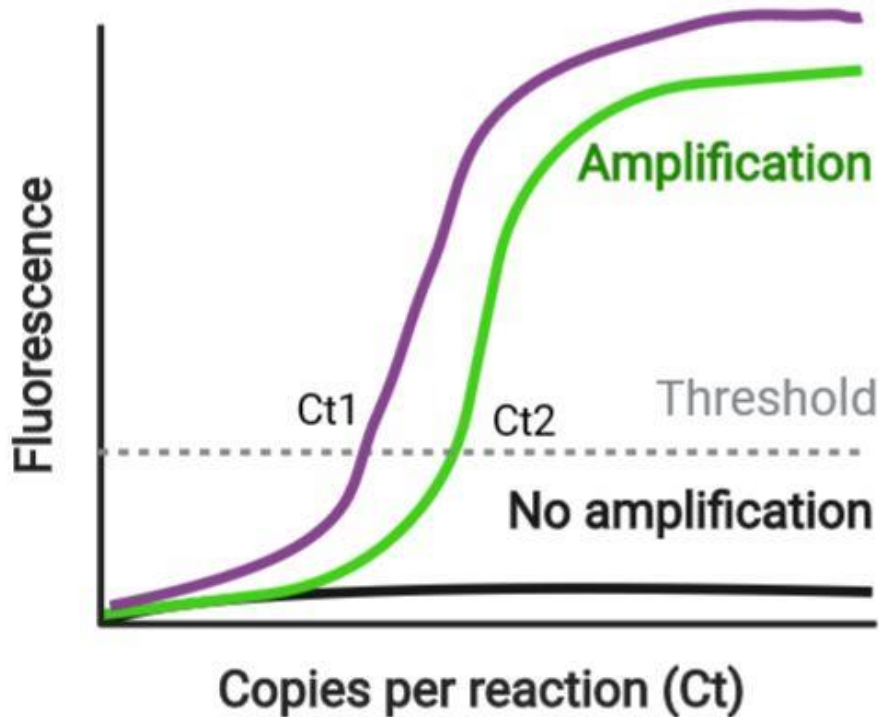
PCA y PERMANOVA



¿Qué es una qPCR?

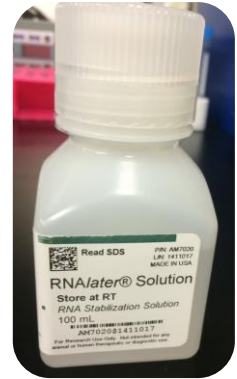


¿Qué es una qPCR?



Recolección de muestras y mantención

- Mantención de muestras en:
 - **RNAlater**
Reactivo acuoso, no tóxico que estabiliza el ARN
 - **Nitrógeno líquido**
Químico a -200°C congela las muestras inmediatamente



Extracción de ARN

Nanopartículas magnéticas



RSC instrument
Maxwell



AutoMate Express Nucleic
Acid Extraction System
ThermoFisher

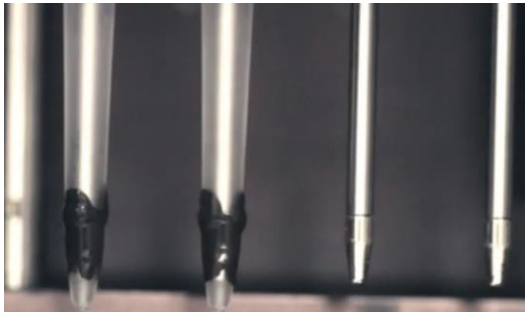
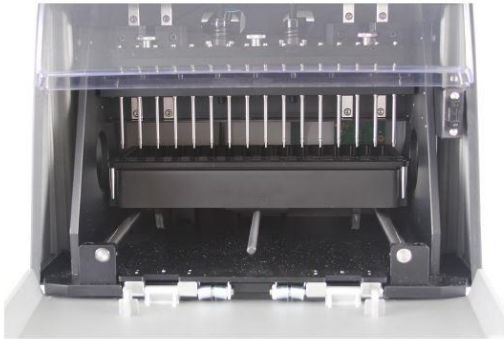
MagNA Pure 24 System
Roche



- Volumen final
- Kit específico para tipo de muestra

¿Cómo funciona?

RSC instrument Maxwell



Berensmeier, 2006. Appl Microbiol Biotechnol.

Columna con membrana de sílice



Aurum Total RNA Mini Kit
BioRad



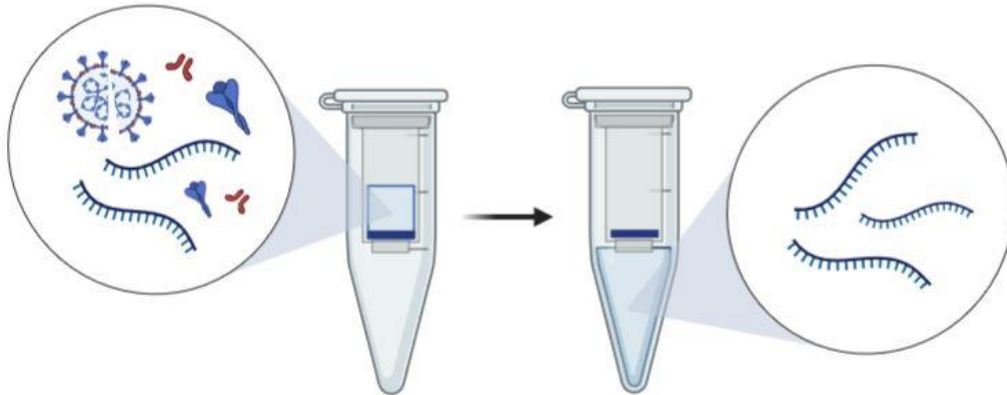
PureLink FFPE RNA Isolation Kit Invitrogen



HigherPurity™ Viral RNA
Extraction Kit
Canvax

¿Cómo funciona?

- Ácido nucleico se une a la fase sólida de sílice
- Las etapas del método son lisar, unir, lavar y eluir



- Volumen final
- Kit específico para tipo de muestra
- Buffer de elución

Ácido de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo



TRIzol Reagent de
Invitrogen



TRI Reagent de
Sigma

- Piotr Chomczynski and Nicoletta Sacchi
- Mayor pureza y la ventaja de una alta recuperación de ARN
- El tiocianato de guanidinio desnaturaliza las proteínas
- Funciona manteniendo la integridad del ARN y descompone las células y los componentes celulares.

Chomczynski & Sacchi. 1987. Anal. Biochem.



Precauciones

- ✓ Campana de extracción de químicos
- ✓ Delantal
- ✓ Antiparras
- ✓ Guantes de nitrilo



¿Cómo funciona?

1. Homogenización:



Homogenizador con
esferas



Homogenizador con
cuchillas

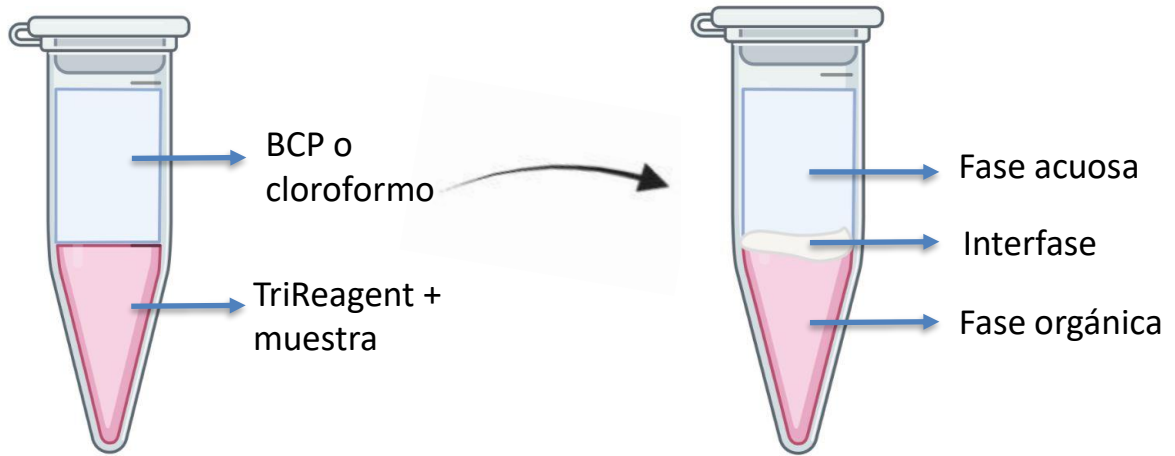


Nitrógeno líquido y
mortero

- ✓ Agregar TriReagent, homogenizar la muestra y almacenar por 5 minutos a temperatura ambiente

- Temperatura muestra
- Limpieza entre muestras

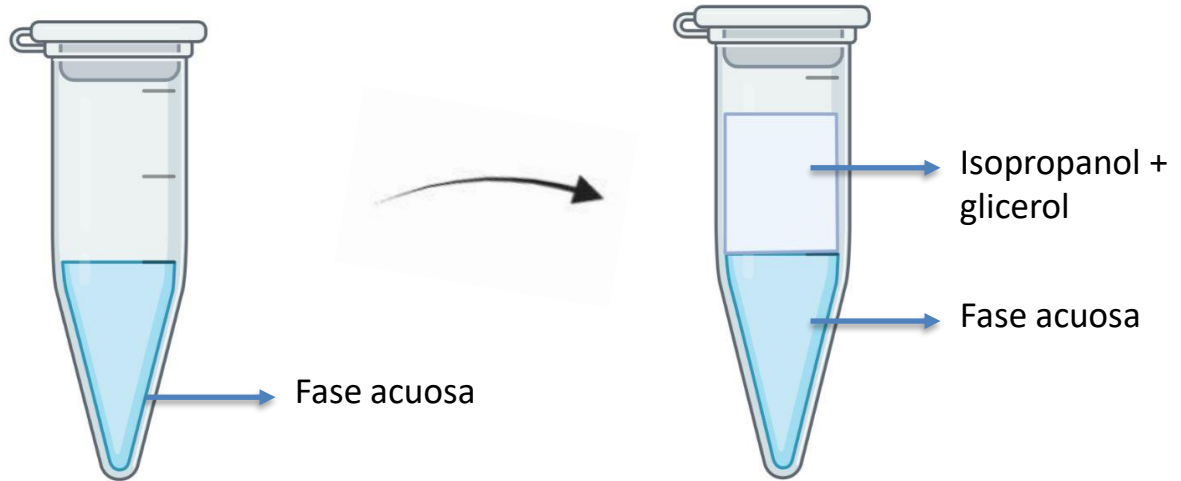
2. Extracción de ARN:



✓ Agitar vigorosamente, incubar 15 minutos en hielo, centrifugar

- No remover interfase y fase orgánica
- Fase acuosa no sea rosada

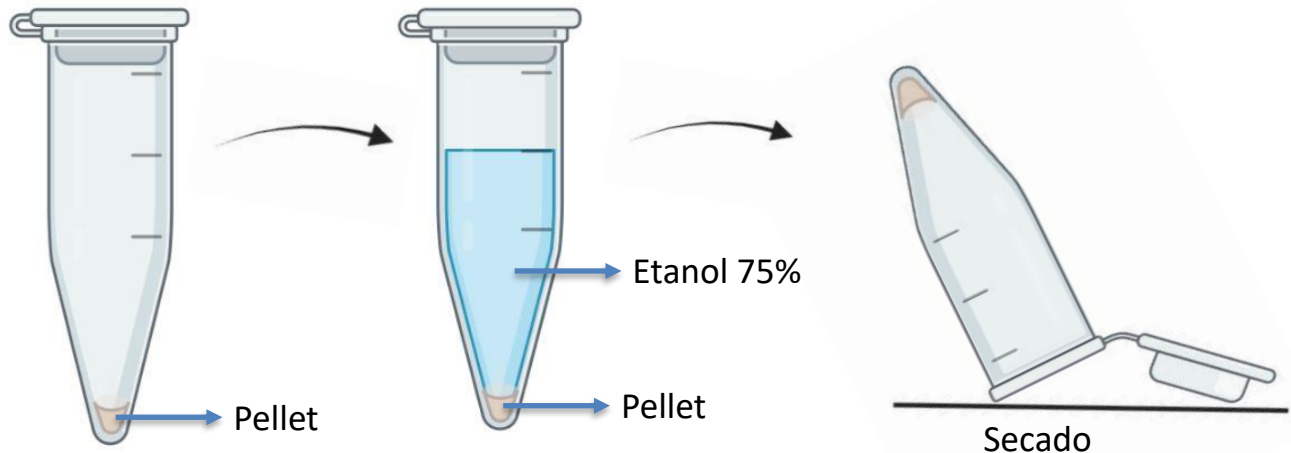
3. Precipitación de ARN:



- ✓ Agregar 250 μl de isopropanol y 0,5 μl de glicerol, congelar a -80°C , posteriormente centrifugar

- Mantener en hielo
- Agitar con delicadeza

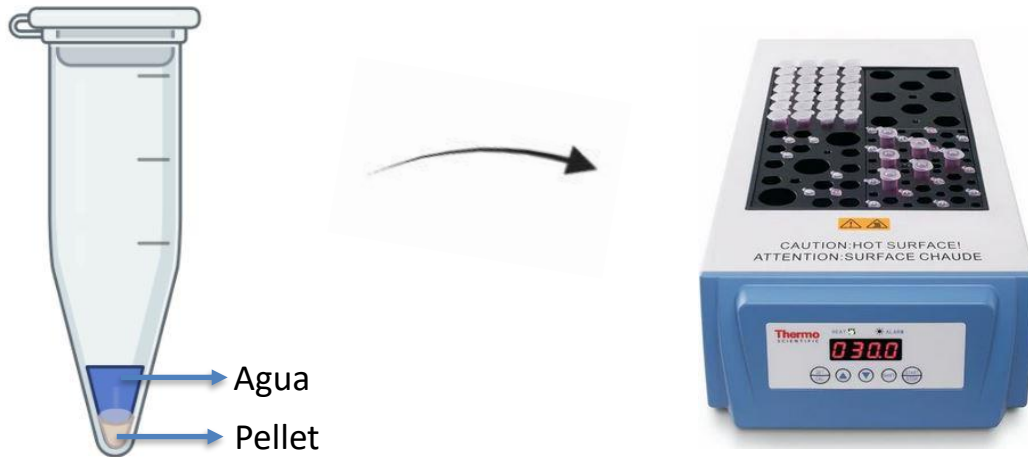
4. Lavado de ARN:



- ✓ Lavar con etanol al 75% y centrifugar, repetir
- ✓ Dejar secar a temperatura ambiente

• No perder el pellet

5. Solubilización:



- ✓ Disolver en agua DEPC, Agua MQ, Agua de nivel molecular en el volumen deseado
- ✓ Incubar a 56°C por 10 min
- ✓ Cuantificar y guardar a -80°C en alicuotas

• Evitar descongelar el ARN

Cuantificación de ARN

Qubit

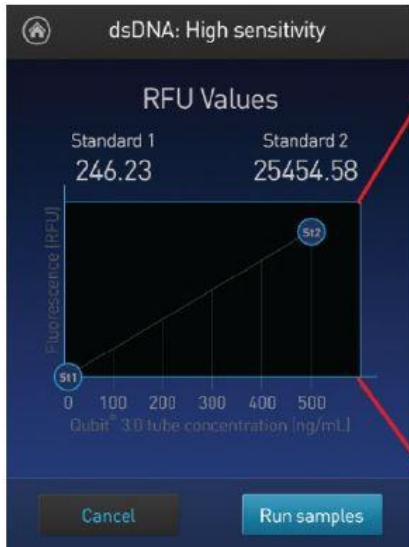
Cuantificación por fluorescencia



Qubit de Invitrogen

- Requiere la unión de una molécula fluorescente a la molécula de interés
- Volúmenes entre 1 y 20 μ l
- Se realiza en tubo o placa
- Configuración del ensayo y curva estándar

Qubit



Qubit de Invitrogen



Results screen for quantitation assays

- Concentración de la muestra

Nanodrop



Nanodrop de Thermo

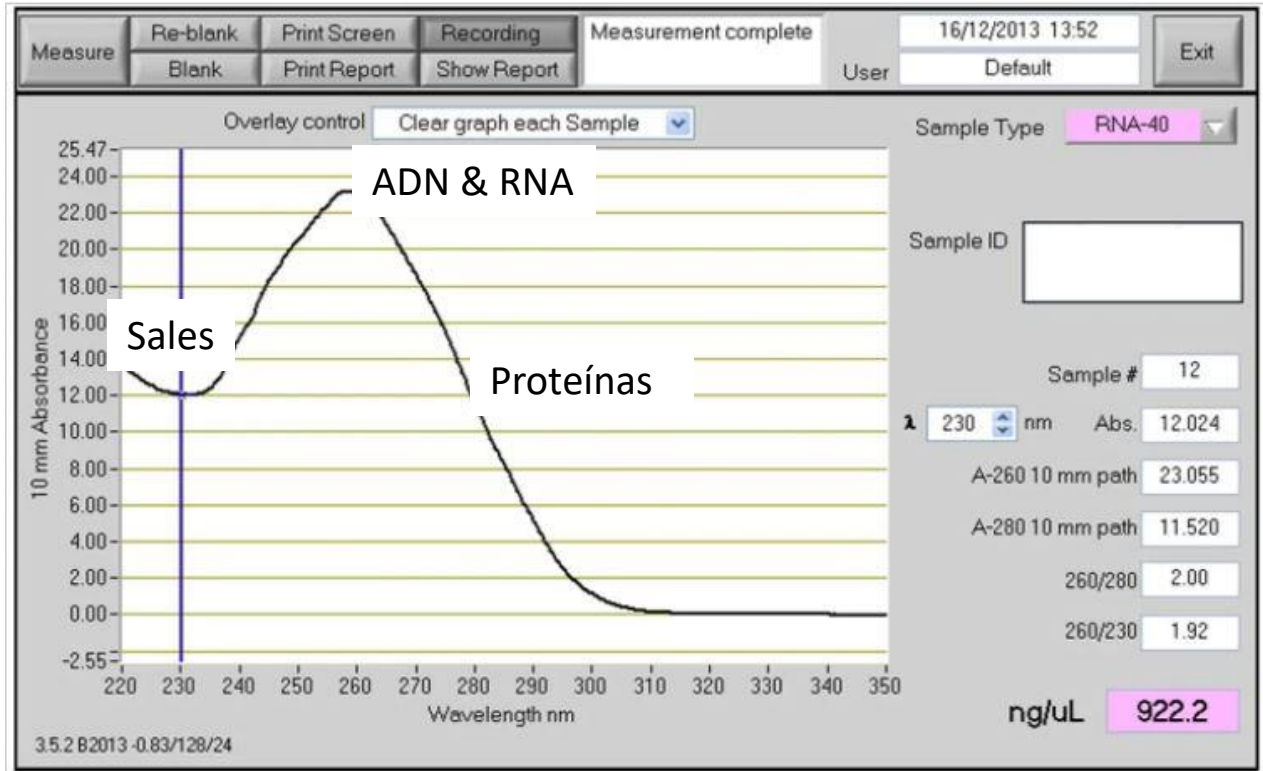
Cuantificación por absorbancia
(espectrofotómetro de UV)

- Usa las características de la muestra
- Pequeños volúmenes de 1 – 2 μ l
- No necesitas otros reactivos
- Rápido y fácil de usar

- Concentración de la muestra ng/ μ l
- Relación de pureza A260/280 (\sim 2.0) Proteína
- Relación de pureza A260/230 (1.8-2.2) Sales

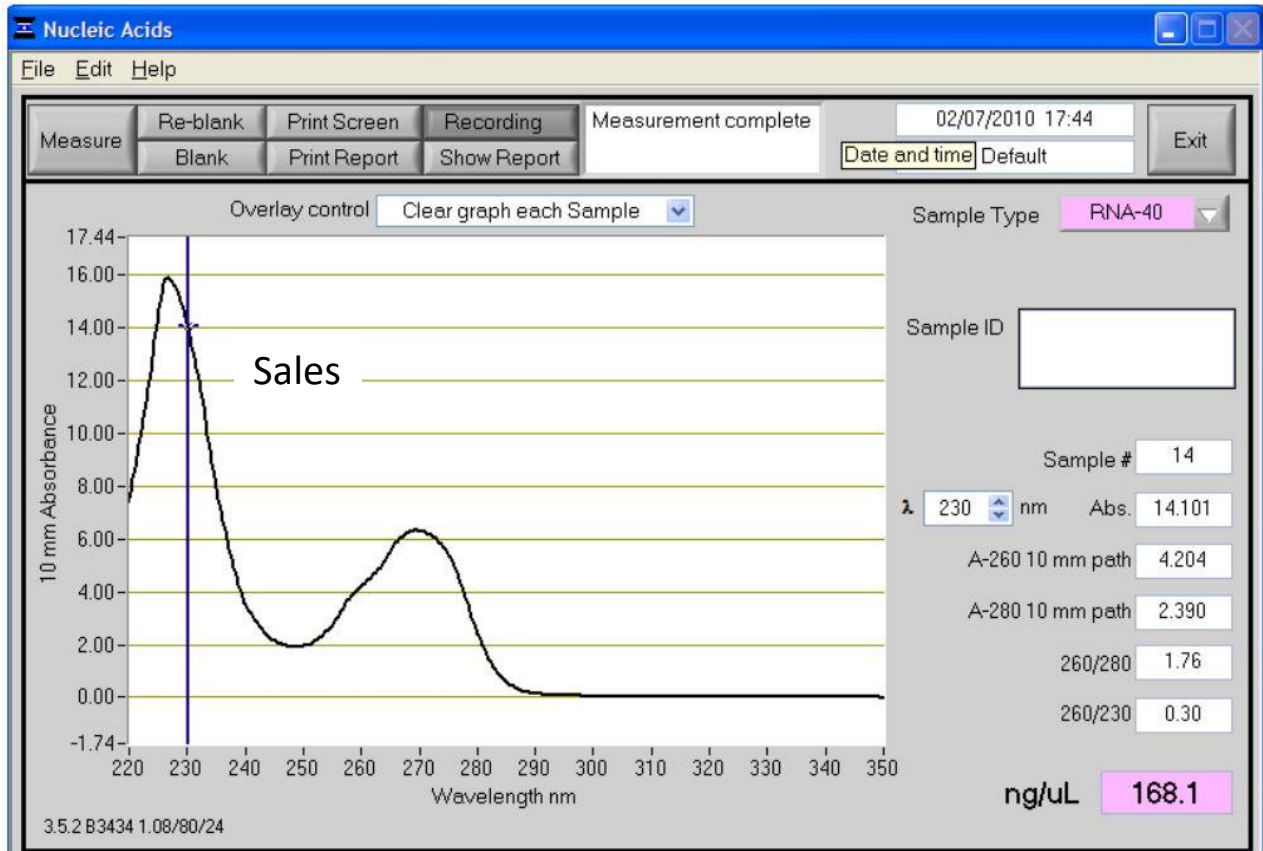
Nanodrop

Nanodrop de Thermo



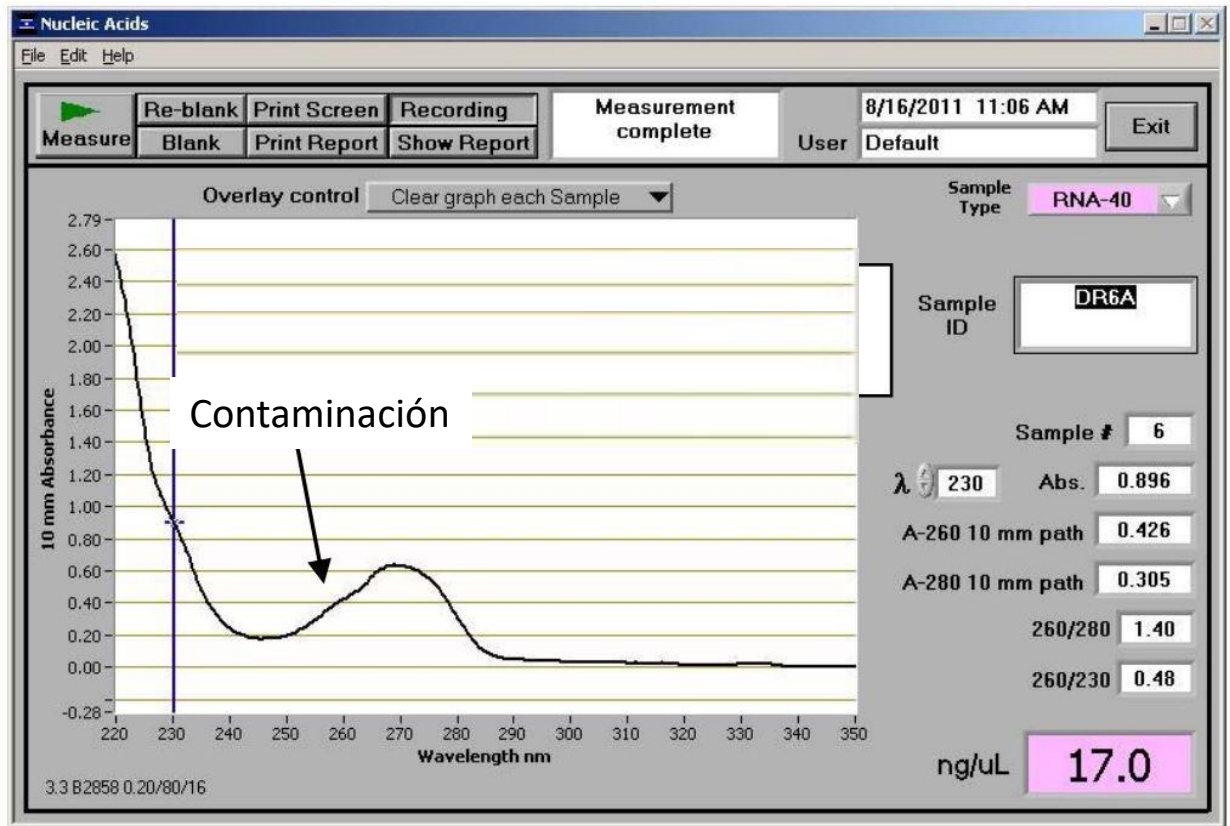
Nanodrop

Nanodrop de Thermo



Nanodrop

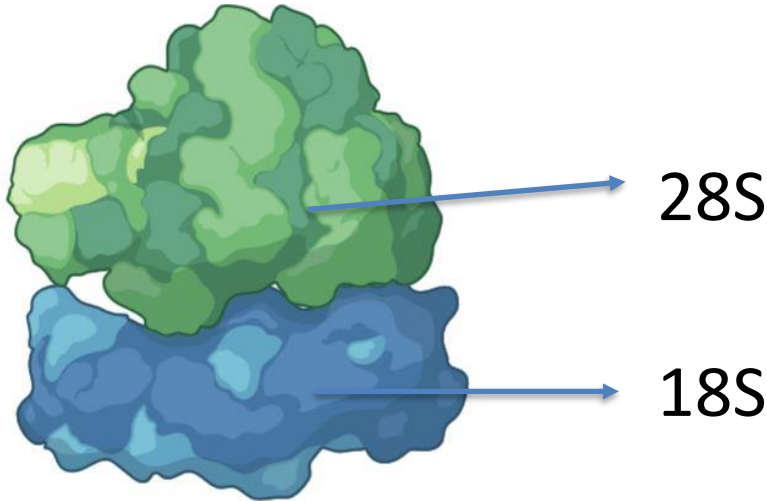
Nanodrop de Thermo



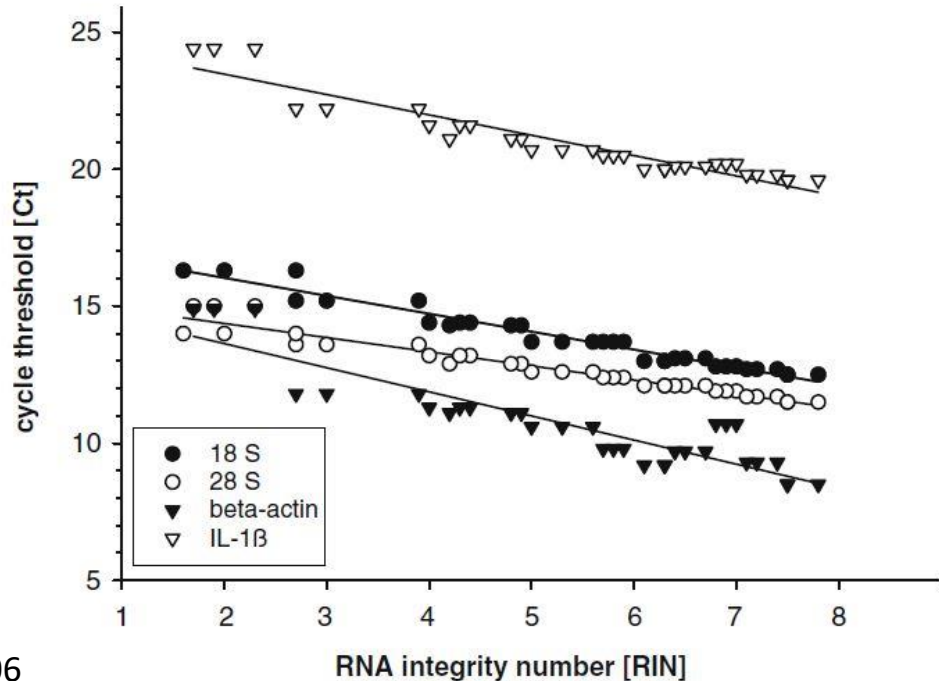
Calidad de ARN

Calidad de ARN

- Número de integridad del ARN (RIN: RNA integrity number)
- El RIN es un algoritmo que asigna un valor de integridad al ARN basándose en la relación de ARNr 28S y 18S

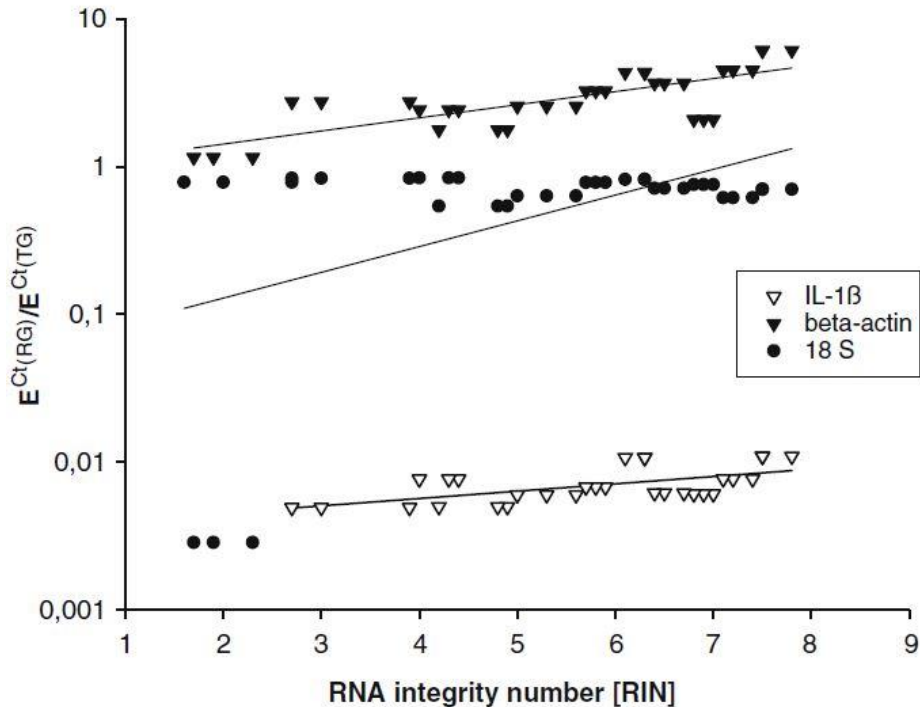


Relevancia de la calidad del ARN



Fleige et al. 2006

Relevancia de la calidad del ARN



Fleige et al. 2006

Bioanalyzer

- Electroforesis capilar basada en un chip
- Doce muestras por chip
- El valor de RIN va del 0 al 10
- 1 μ l de muestra
- Método cuantitativo

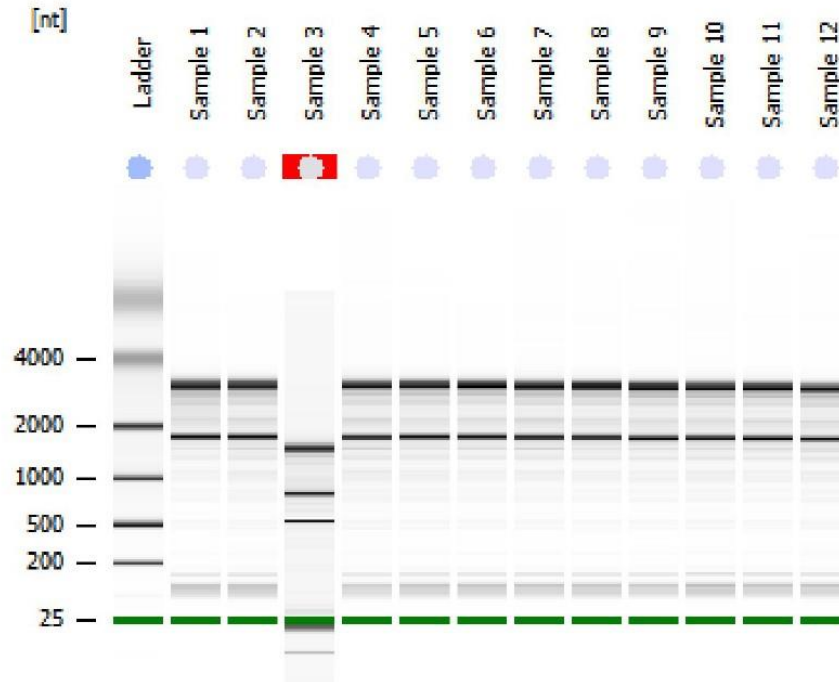


2100 Agilent Bioanalyzer

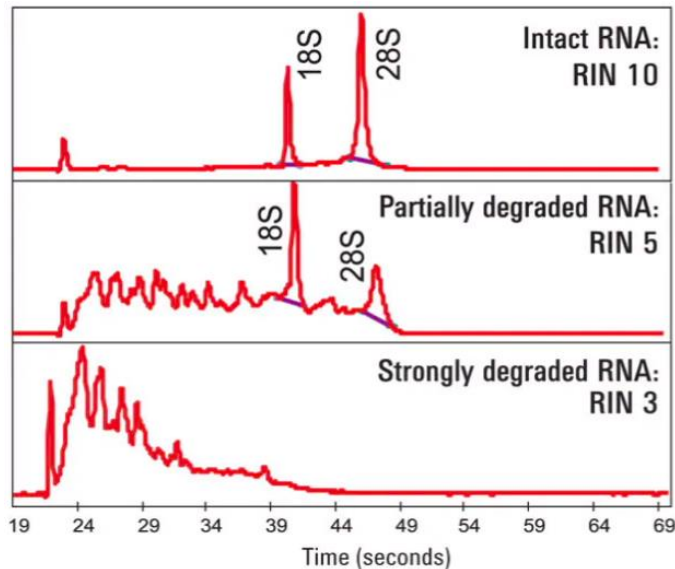
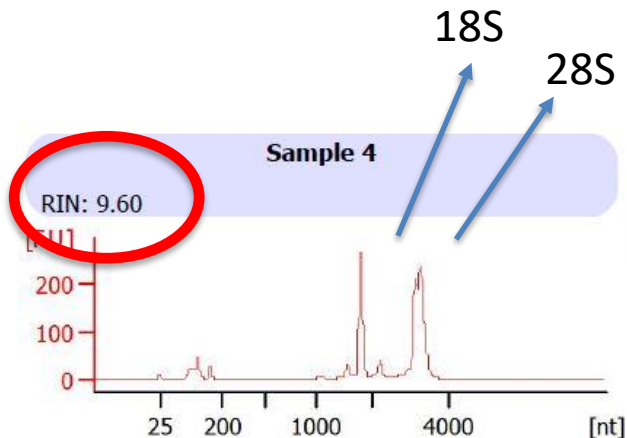


Evaluación de muestras por electroforesis

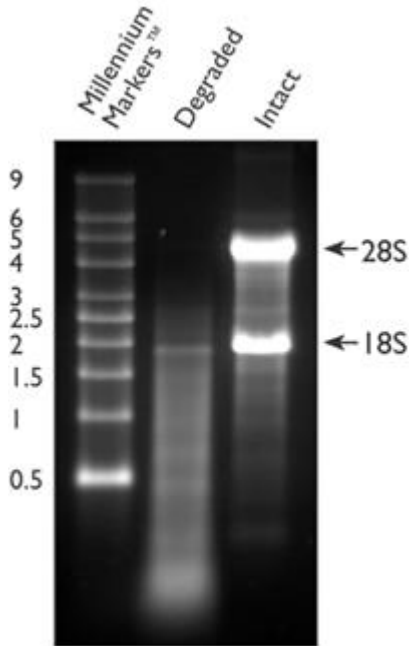
Electrophoresis File Run Summary



Evaluación de muestras por electroferograma



Evaluación por gel de agarosa



Thermo Scientific

- 200 ng de muestra
- geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR safe
- Método semicuantitativo

Actividad de aprendizaje en grupos

Identificar muestras con alta y baja
integridad de ARN (Drive).

Resumen de la clase

- Introducción expresión diferencial de genes
- Revisamos alternativas y cuidados para la recolección y mantención de muestras
- Métodos de extracción de ARN a través de nanopartículas, columnas de sílice y Ácido de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo
- Cuantificación de ARN a través de Qubit y Nanodrop
- Calidad del ARN a través de Bioanalyzer y gel de agarosa

Próxima clase

- Introducción a R y Rstudio



- ¿Qué son los primers?

