



**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**



**ALAG**

ASOCIACIÓN  
LATINOAMERICANA  
DE GENÉTICA



SOCIEDAD  
DE GENÉTICA  
DE CHILE

Doctorado en  
Biotecnología  
PUCV - UTFSM

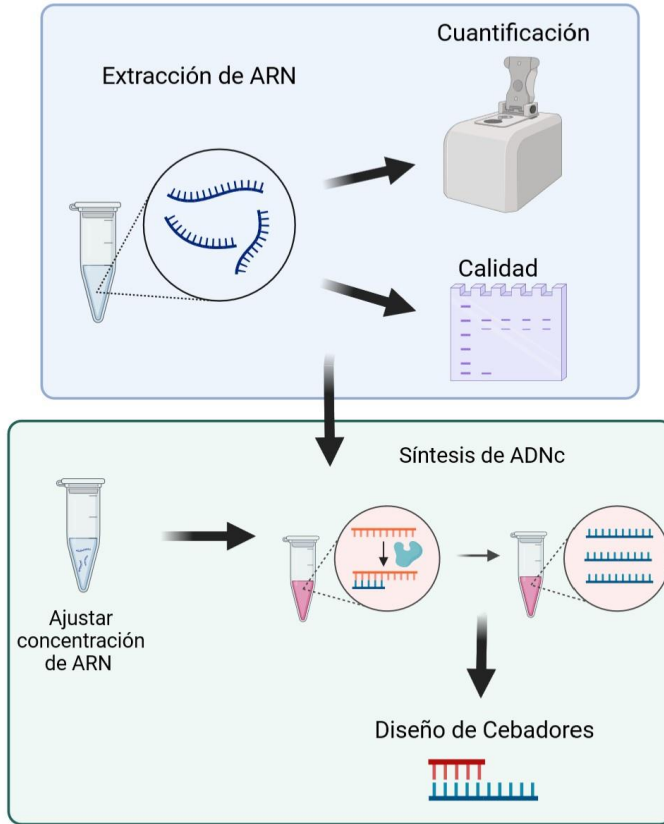
## Clase 4

# Diseño y ejecución de PCR en tiempo real

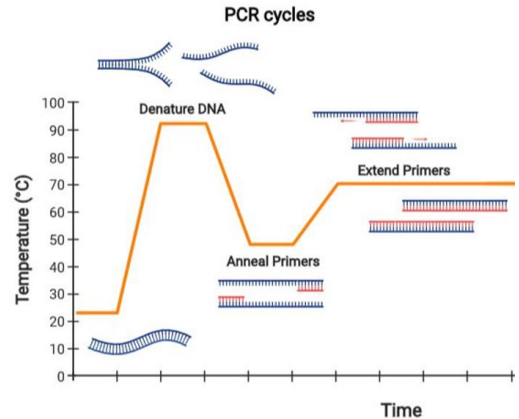
# Plan de la clase

- Selección de química
- ¿Cómo funciona la PCR en tiempo real?
- ¿Qué es el Ct, el Cq y la curva de fusión?
- Replicas biológicas y técnicas
- Preparación de placa y master mix

# Paso a paso



## PCR en tiempo real



# Selección de química

# Basados en sondas

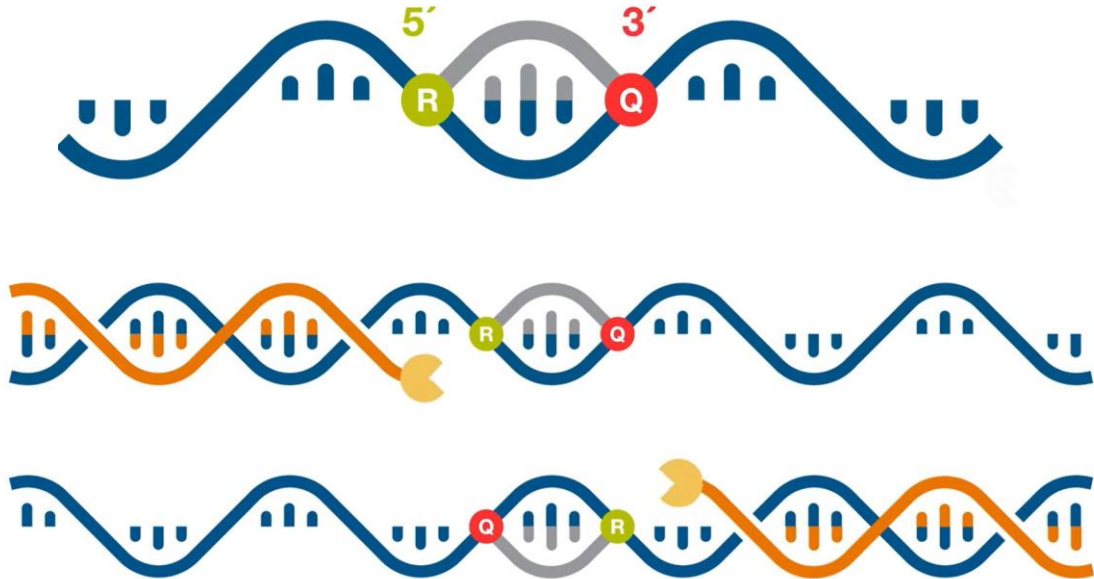
✓ TaqMan



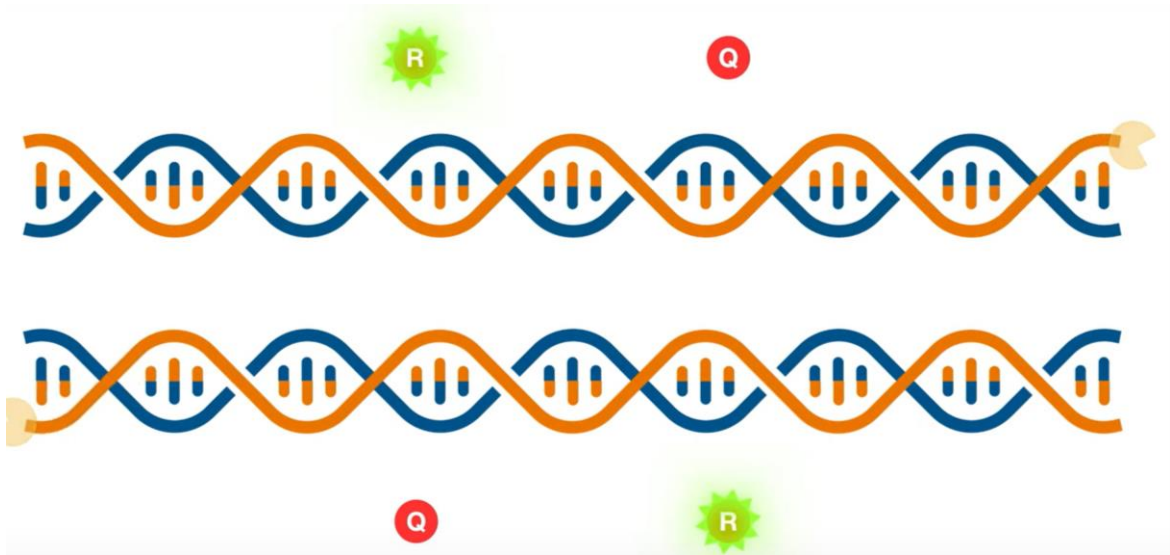
Fluorescence Resonance Energy Transfer



# TaqMan



# TaqMan



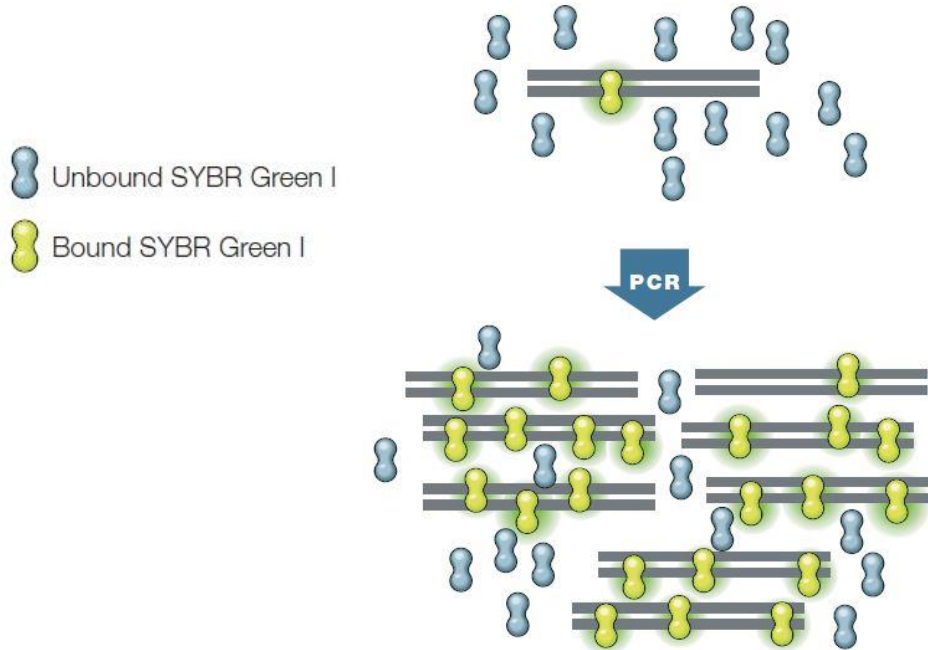


# Colorante de unión al ADN

## ✓ SYBR Green - Colorante intercalado

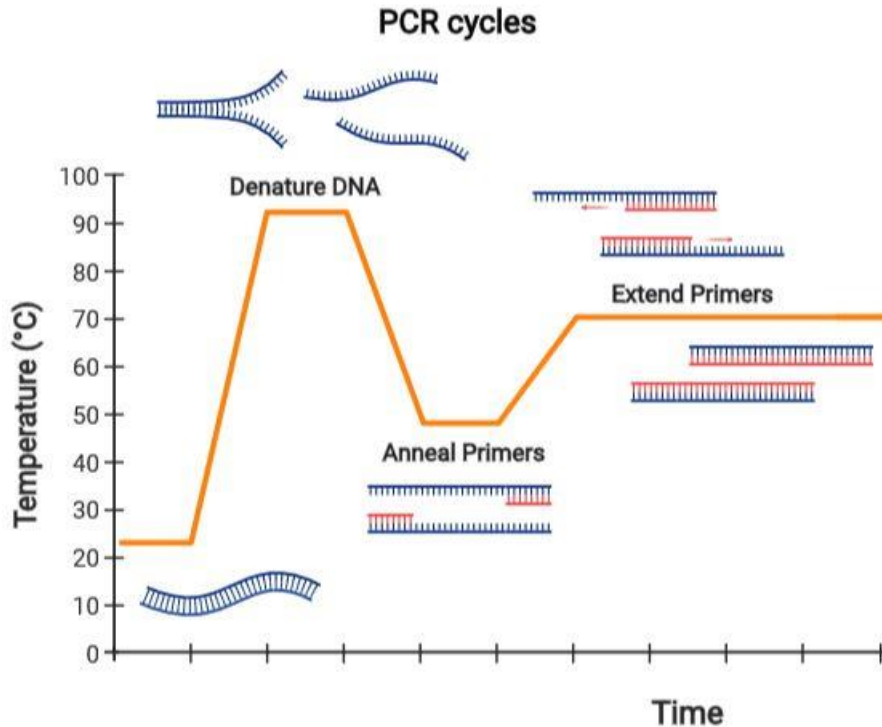
- Se une inespecíficamente a dsDNA
- Su fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de dsDNA presente
- Solo se necesitan dos primers

# SYBR Green

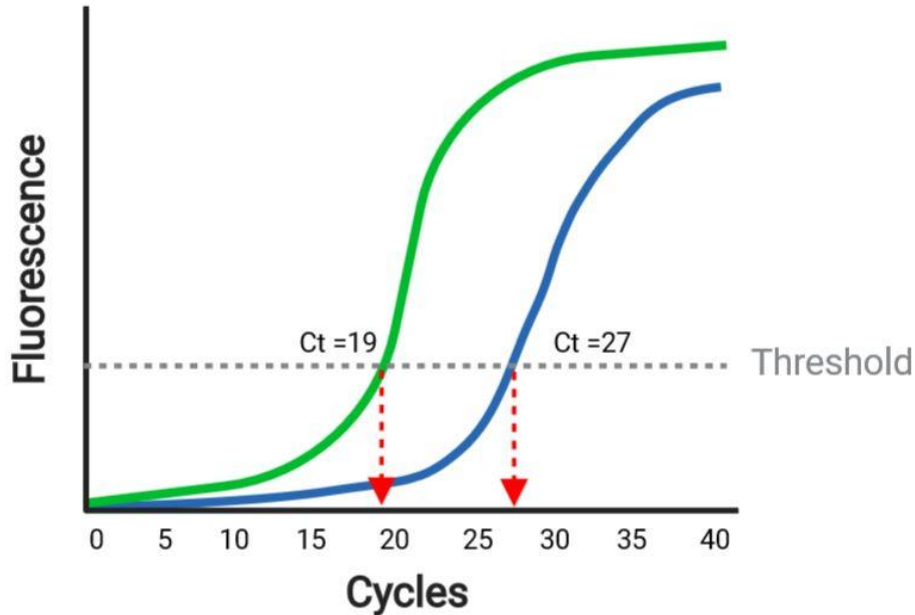


Real-Time PCR. Biorad

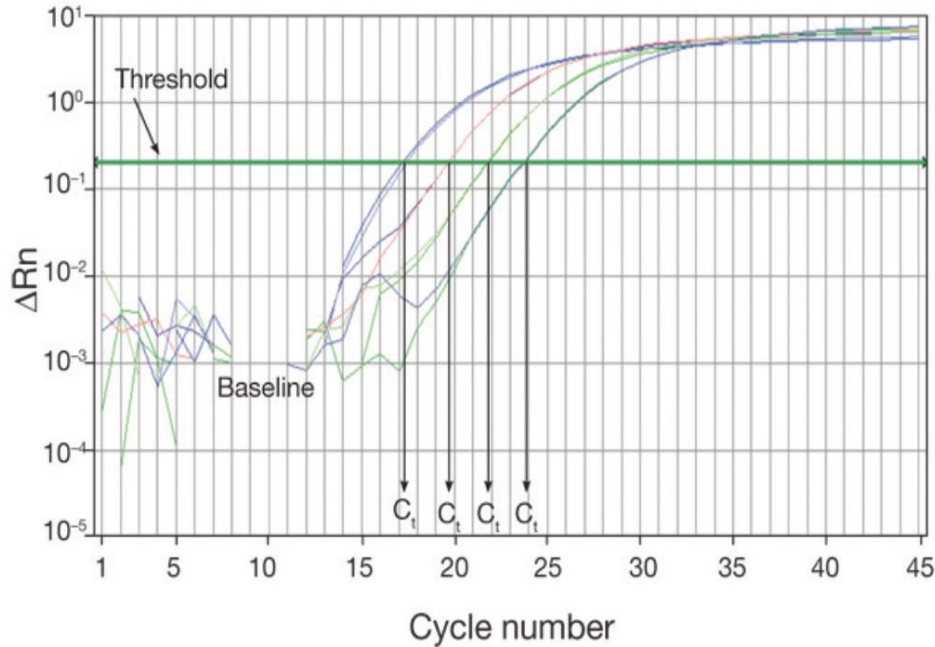
# Pasos de la PCR en tiempo real



# ¿Qué es el valor de Ct?



# Línea base y umbral de la PCR en tiempo real



Valor Rn o valor normalizado

# ¿Qué es el valor de C<sub>q</sub>?

Clinical Chemistry 55:4  
611–622 (2009)

Special Report

## The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

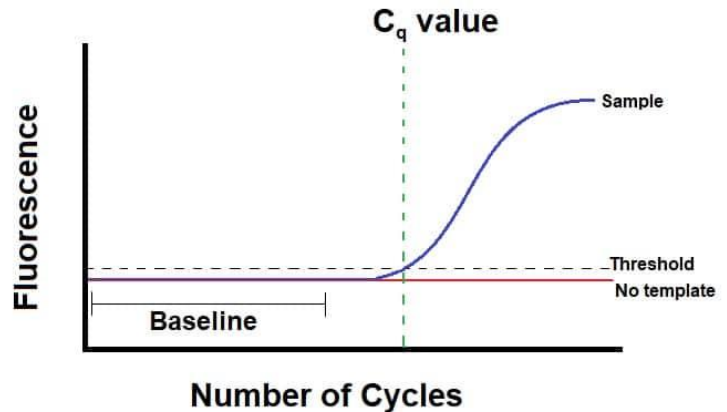
Stephen A. Bustin,<sup>1\*</sup> Vladimir Benes,<sup>2</sup> Jeremy A. Garson,<sup>3,4</sup> Jan Hellemans,<sup>5</sup> Jim Huggett,<sup>6</sup>  
Mikael Kubista,<sup>7,8</sup> Reinhold Mueller,<sup>9</sup> Tania Nolan,<sup>10</sup> Michael W. Pfaffl,<sup>11</sup> Gregory L. Shipley,<sup>12</sup>  
Jo Vandesompele,<sup>5</sup> and Carl T. Wittwer<sup>13,14</sup>

*C<sub>t</sub>: threshold cycle (C<sub>t</sub>)*

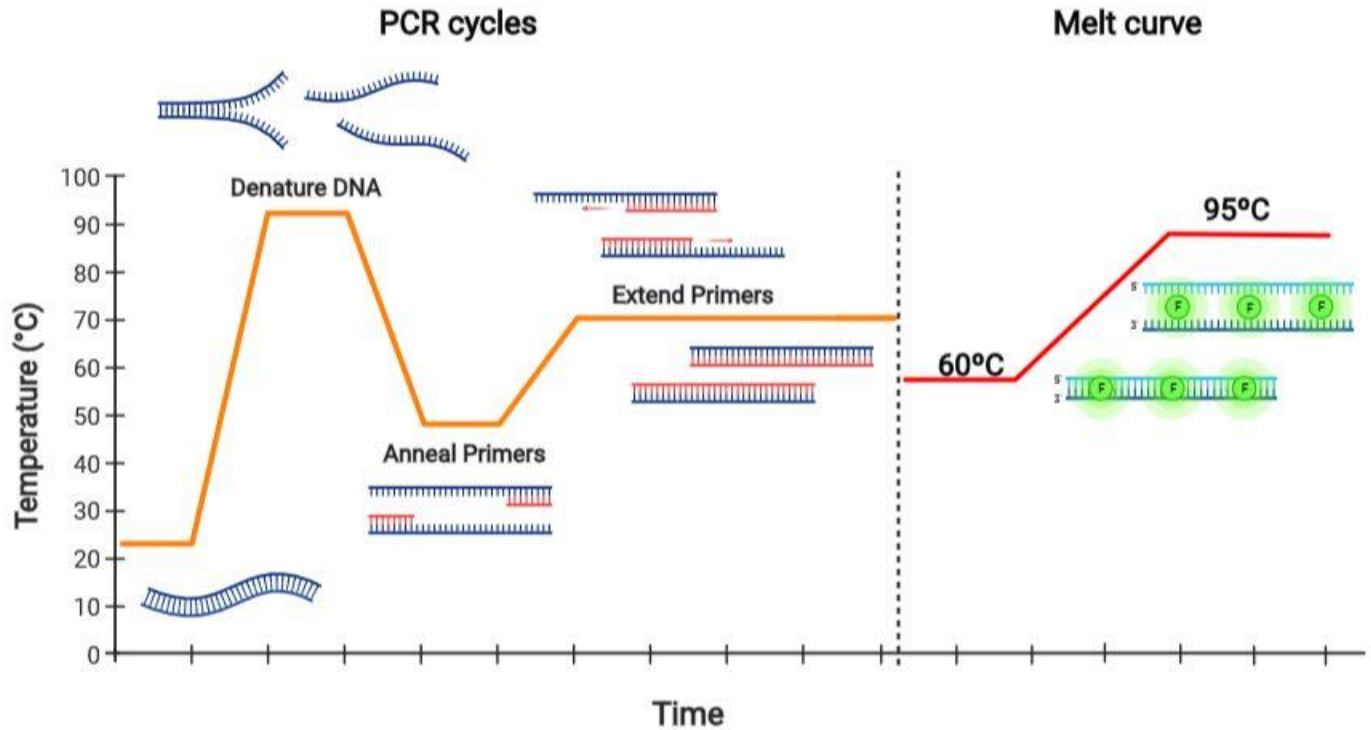
*C<sub>p</sub>: crossing point (C<sub>p</sub>)*

*TOP: take-off point (TOP)*

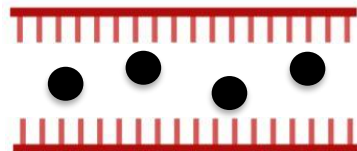
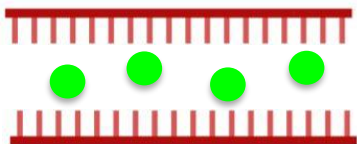
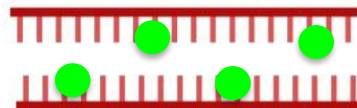
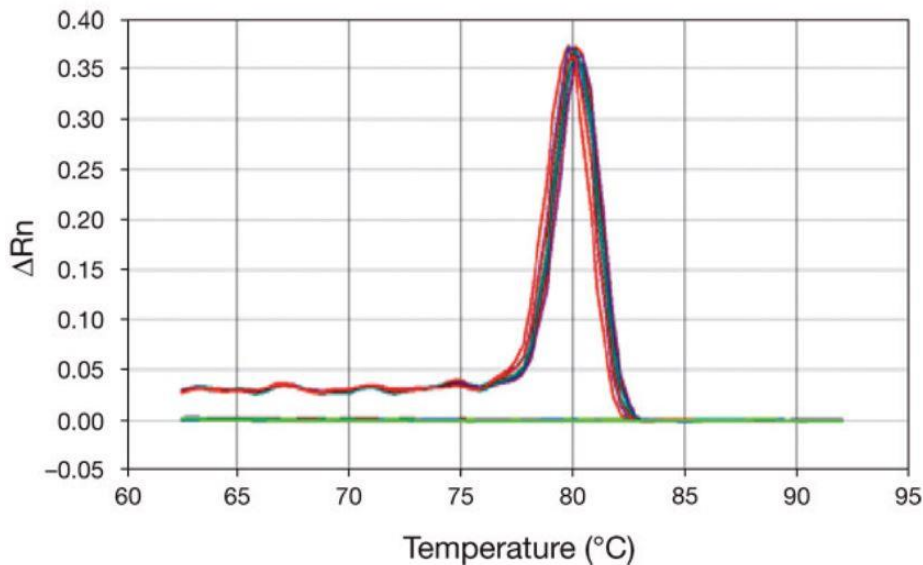
*C<sub>q</sub>: quantification cycle*



# ¿Qué es la curva de fusión (melt curve)?

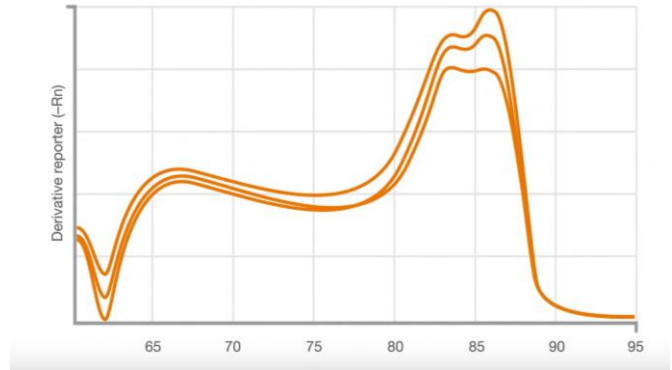
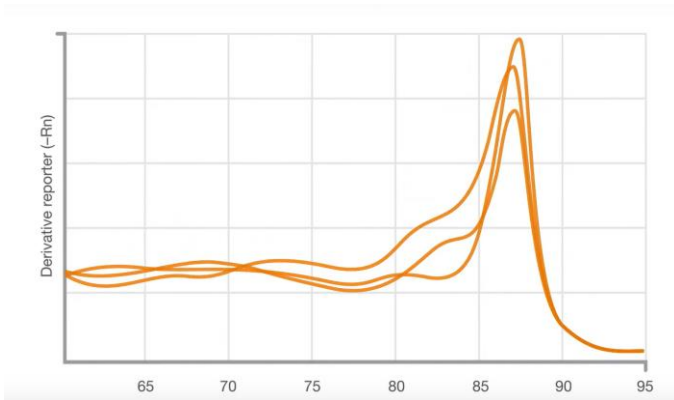


# ¿Qué es el Curva de fusión (melt curve)?





# Melt curves



# Replicas biológicas y técnicas

## Replica biológica

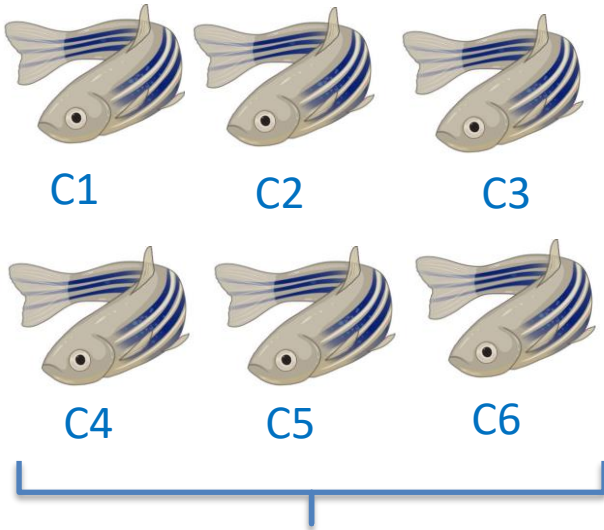
- Replica muestras de prueba del mismo experimento
- Mide la variabilidad entre muestras

## Replica técnica

- Réplicas de la misma muestra de prueba
- Mide la variabilidad de la configuración y el protocolo

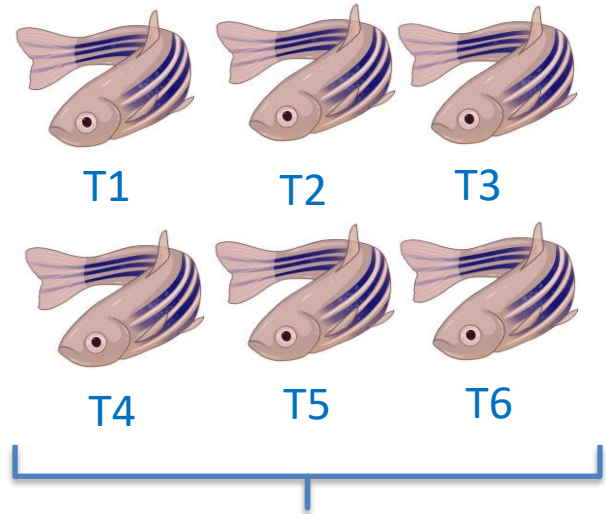
# Replicas biológicas

Control



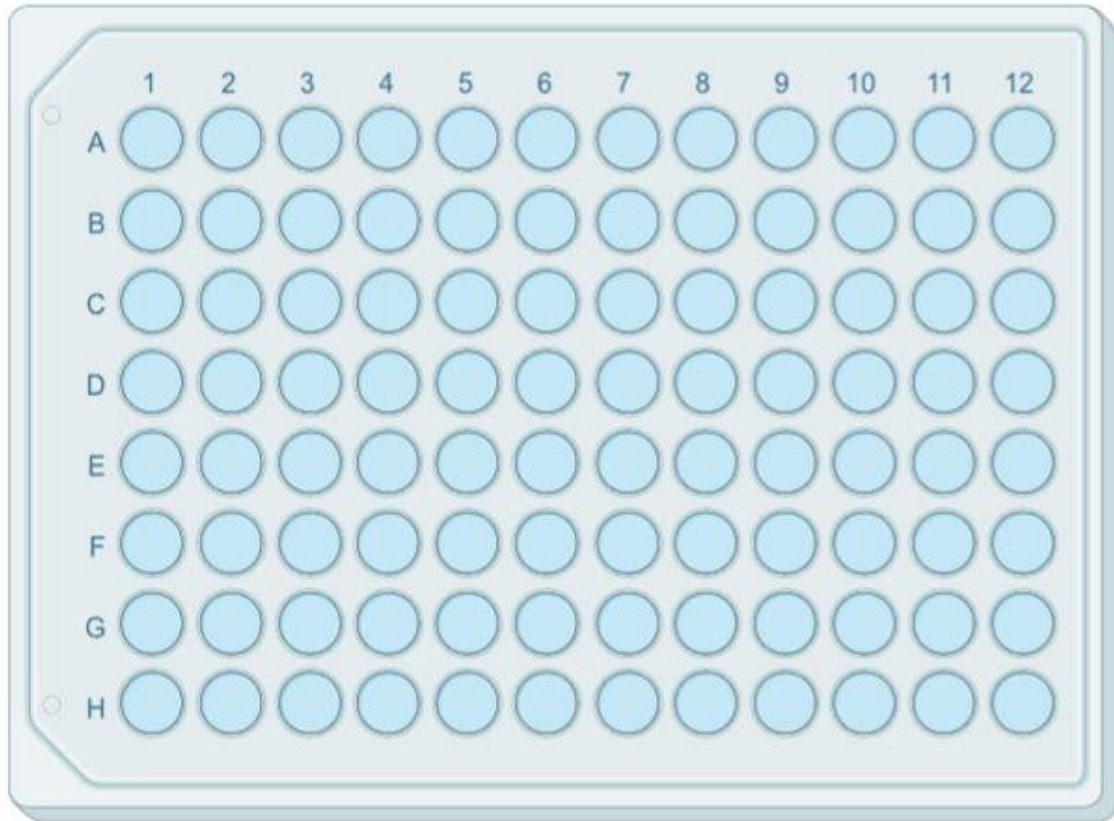
6 replicas biológicas

Tratamiento



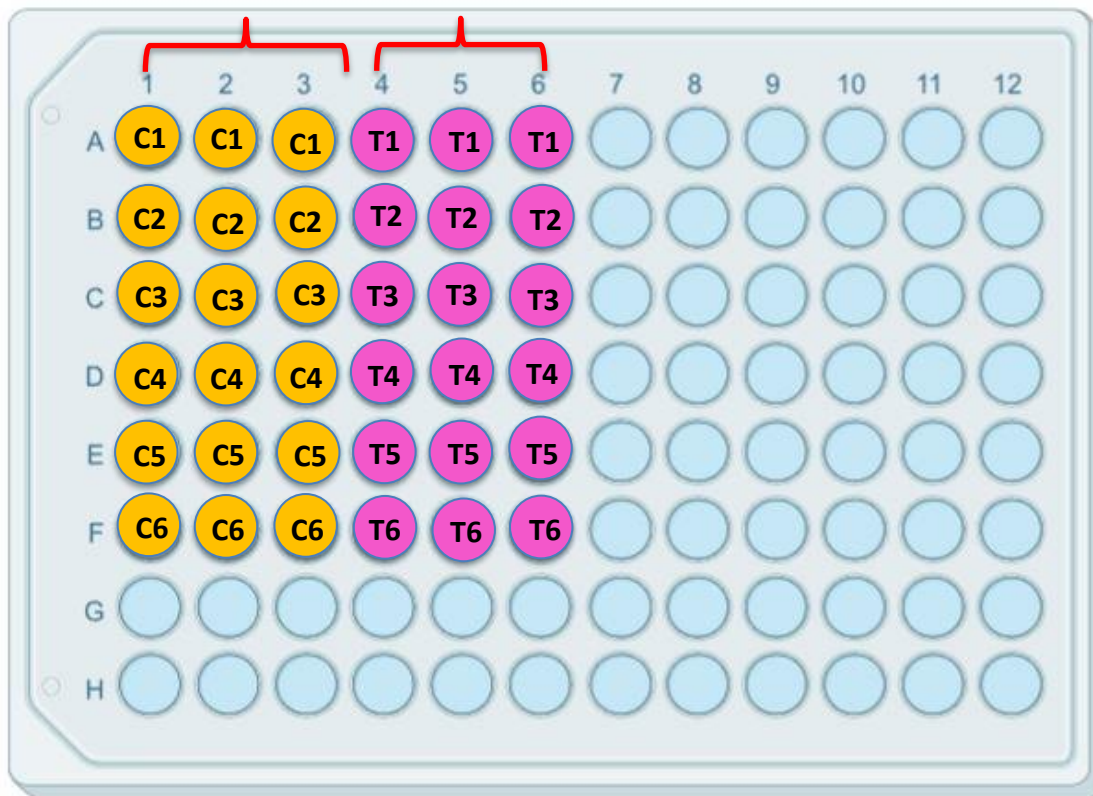
6 replicas biológicas

# Replicas técnicas



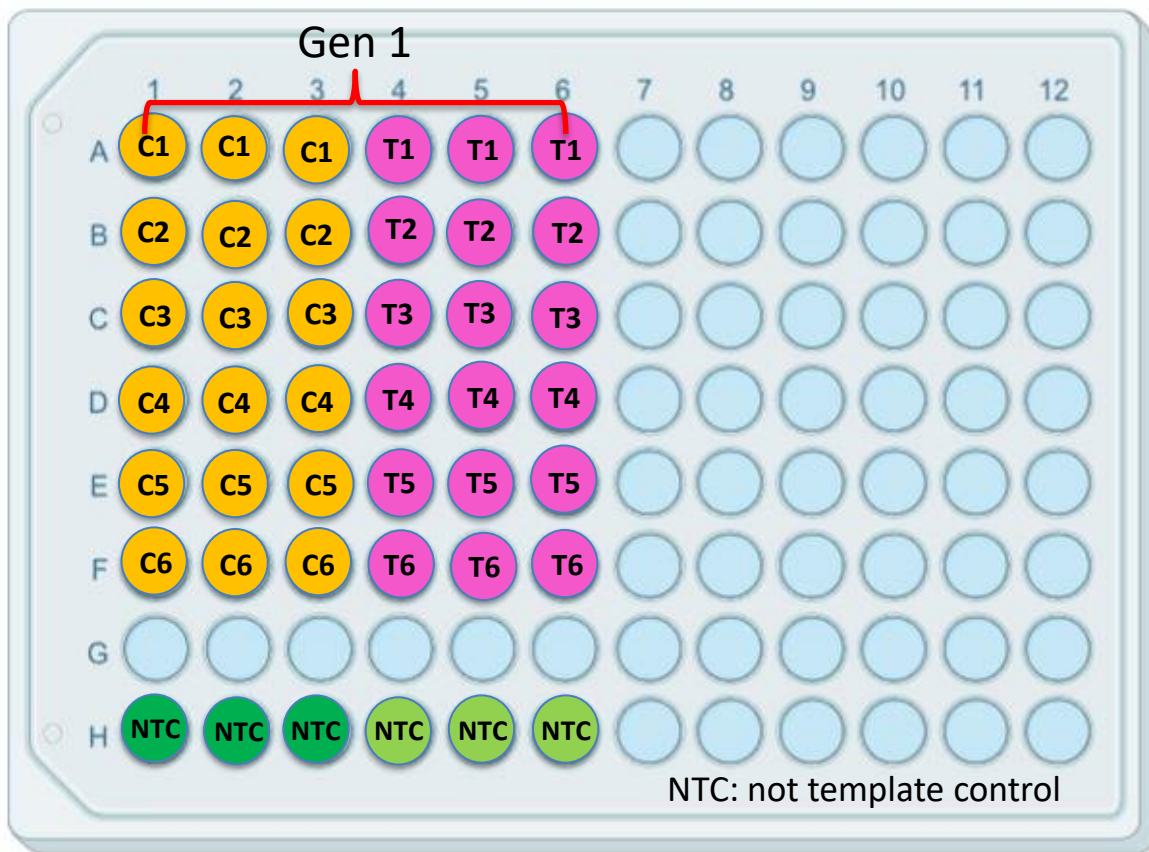
# Replicas técnicas

Replicas técnicas



# Preparación de la placa y Master Mix

# Organización de la placa



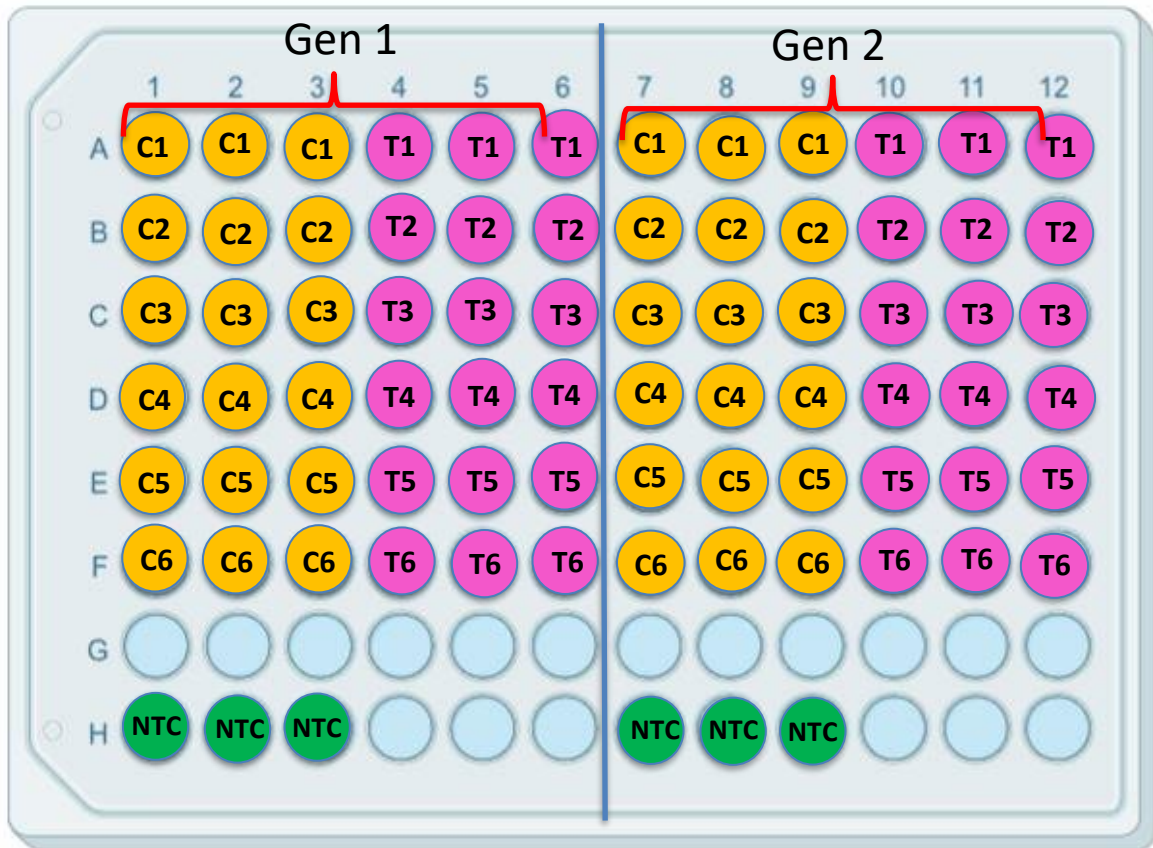
# Plantilla placa de 96

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene



# Organización de la placa



# Recomendaciones Generales

- Limpiar las estaciones de trabajo
- Preparar las muestras en una sala limpia
- Usar pipetas con puntas con barrera contra aerosoles
- Limpiar las pipetas
- Usar agua de grado PCR y reactivos exclusivos para PCR
- Preparar un control sin muestra



# Preparación de Mater Mix

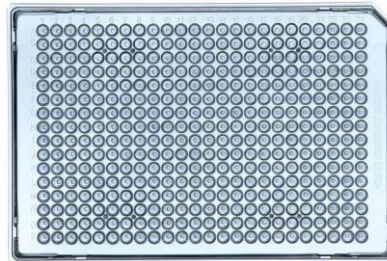
- n= 42 preparado una Master mix para 47 muestras

Master Mix	Volumen	X 47
SYBR green	10 µl	470 µl
Primer Fw (10µM)	1 µl	47 µl
Primer Rv (10µM)	1 µl	47 µl
Agua	5 µl	141 µl
Volumen final	20 µl	

- SYBR green protegido de la luz
- Usar tubos y puntas DNA-free

# Herramientas útiles para cargar una placa

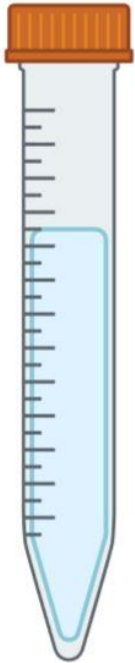
- ✓ Pipetas de repetición digitales
- ✓ Trackman
- ✓ Robot para cargar placas



Placa de 384-well

# Carga de la placa

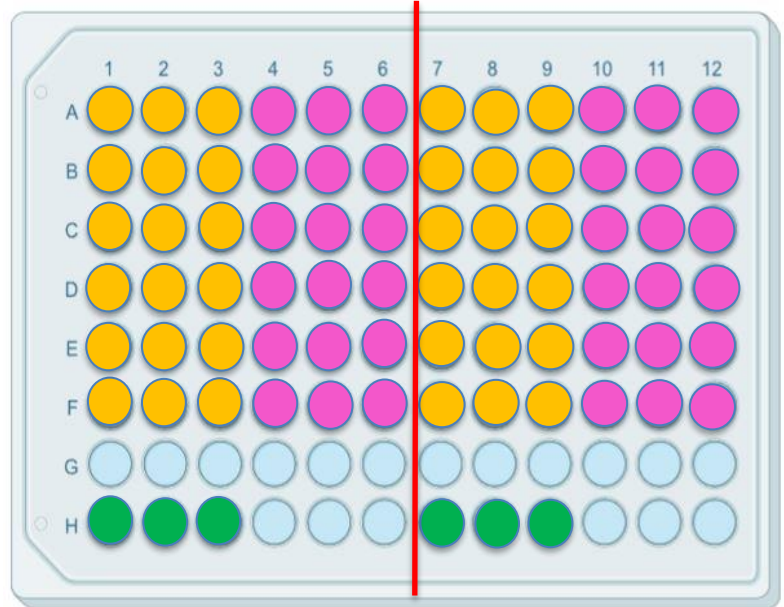
Maxter Mix  
Gen 1



17  $\mu$ l

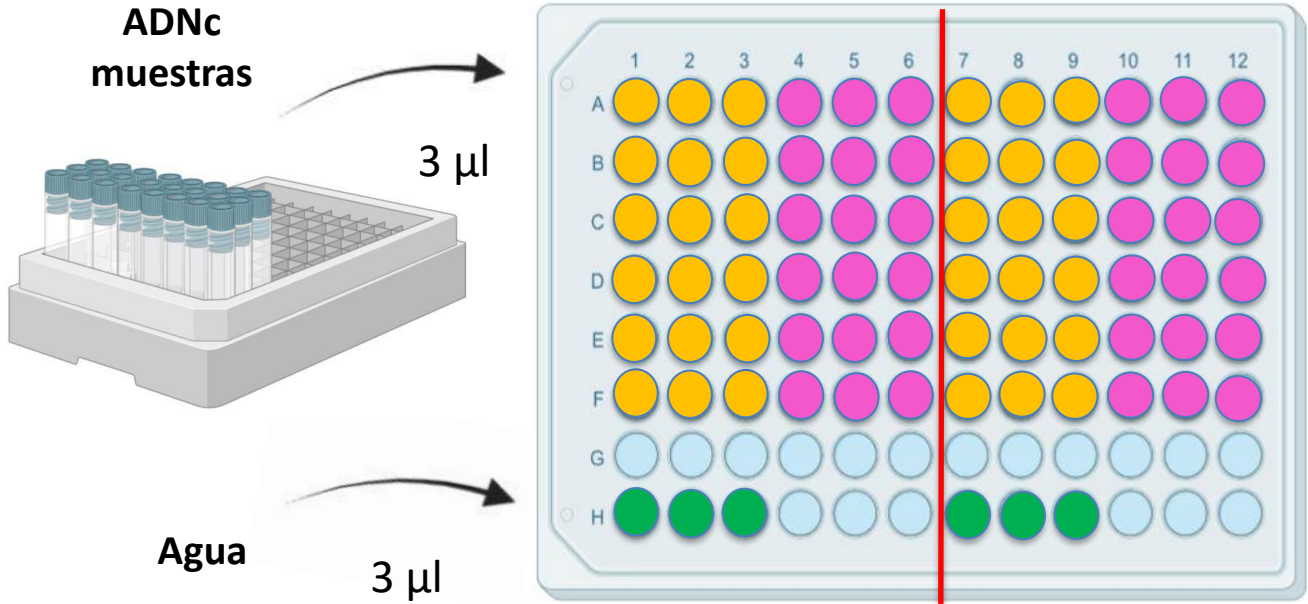
Gen 1

Gen 2



- Cebadores con misma Tm

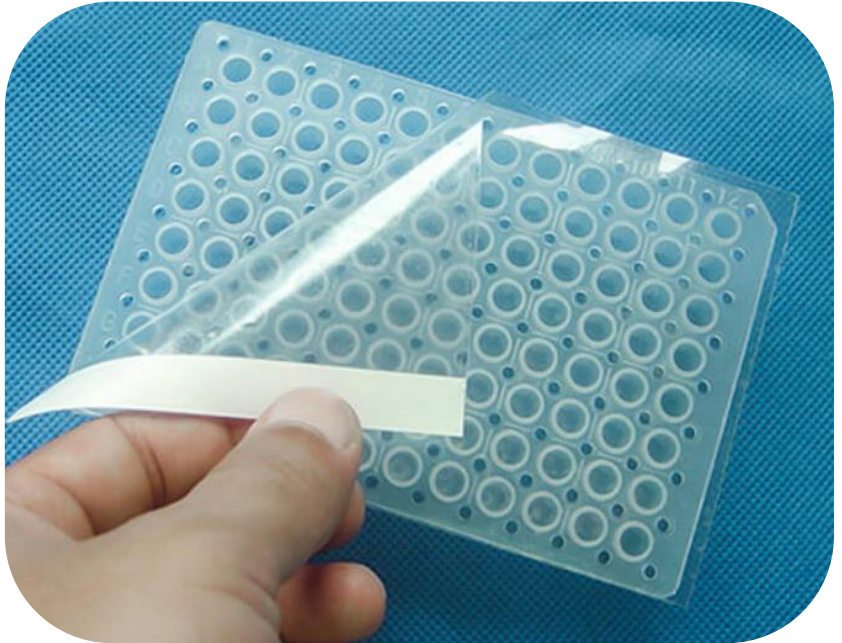
# Carga de la placa



- Mantener muestras en hielo
- Vortear muestras
- Puntas con filtro cambiar entre cada muestra

# Carga de la placa

- Sellar con film
- Centrifugar
- Proteger de la luz
- Guardar a 4°C



# Resumen de la clase

- Como funciona el Sybr green y TaqMan
- Etapas de la PCR en tiempo real
- Aprendimos que es Ct, el Cq y la curva de fusión
- Diferenciar las replicas biológicas y técnicas
- Como preparar la placa y master mix
- Analizamos gráficas de amplificación, línea base, curva de fusión de PRC en tiempo real.



# Próximas clases

- Clase 5: Programación con R: Visualización y manipulación de datos con ggplot2 y dplyr



- Clase 6: Eficiencia de cebadores

