



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 6

Eficiencia de los cebadores

PUCV



Dra. Débora Torrealba – <https://genomics.pucv.cl>

Plan de la clase

- Preparación de los cebadores
- Optimización de la temperatura de hibridación
- Optimización de la concentración de los cebadores
- ¿Qué es la eficiencia de los cebadores?
- Otras consideraciones para optimizar la reacción
- Calculo de eficiencia de cebadores con R

Preparación de los cebadores

Nomenclatura de los cebadores

Nombre de los cebadores:

Indicar especie:

Homo sapiens hs

Salmo salar ss

Gallus gallus gg

hs_il12_Fw

hs_il12_Rv

ss_hep_Fw

ss_hep_Rv

Nombre del gen

Interleukin 12 il-12

Hepcidin hep

Archivo con los datos de
diseño de los primers

Tipo de cebador

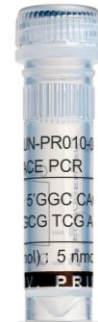
Forward Fw

Reverse Rv

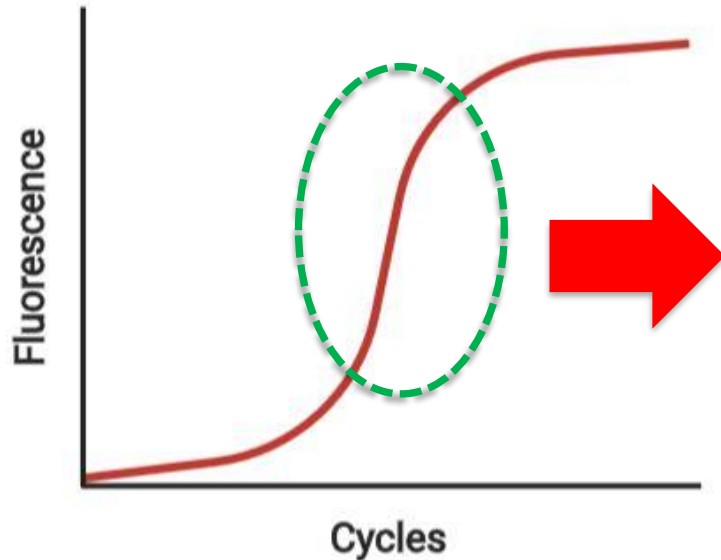
Preparación de los cebadores

- Centrifugar el tubo
- Resuspender con agua MQ o agua libre de nucleasas
- 100 μ M solución de reserva
- 10 μ M solución de trabajo
- Guardar a -20°C

Sequence 1-P1for			
5'- GAA TTC GCG GCC GCT TCT AGA GAA TTT T -3'			
Properties		Amount Of Oligo	
<i>T_m</i> (50mM NaCl) 61.1 °C		11.5 =	43.5 = 0.37
GC Content 65.4%		OD 260	nMoles mg
Molecular Weight 8,594.6			
nmoles/OD260 0.8			
μ g/OD260 32.6			
Ext. Coefficient 263,800 L/(mole·cm)			
Secondary Structure Calculations			
Lowest folding free energy (kcal/mole) 0.93 at 25 °C			
Strongest Folding T _m 65.7 °C			

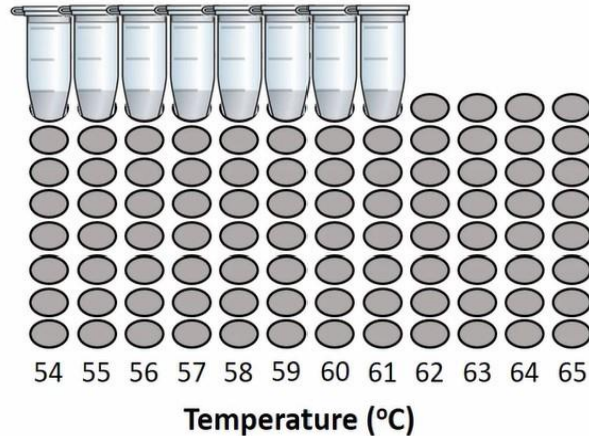
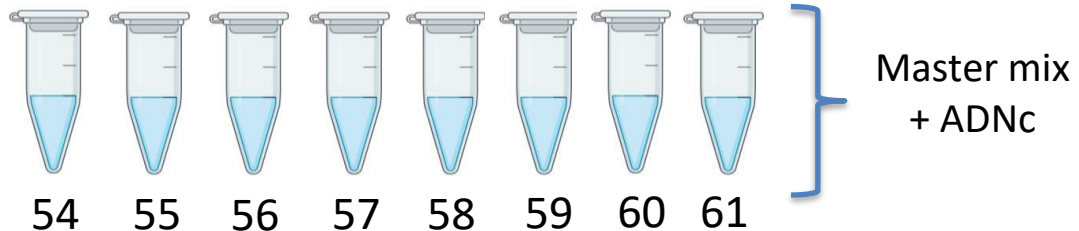


¿Qué es la eficiencia de los cebadores?

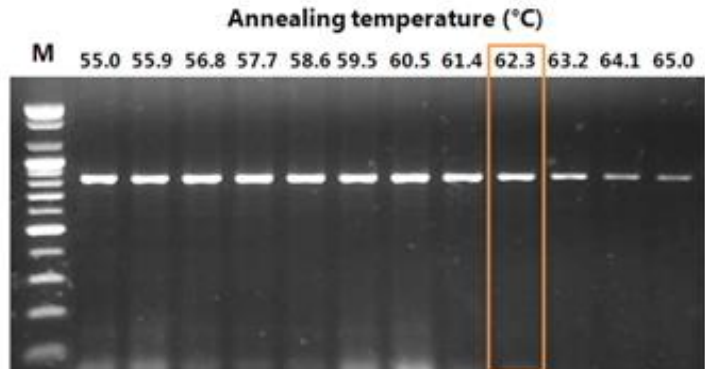
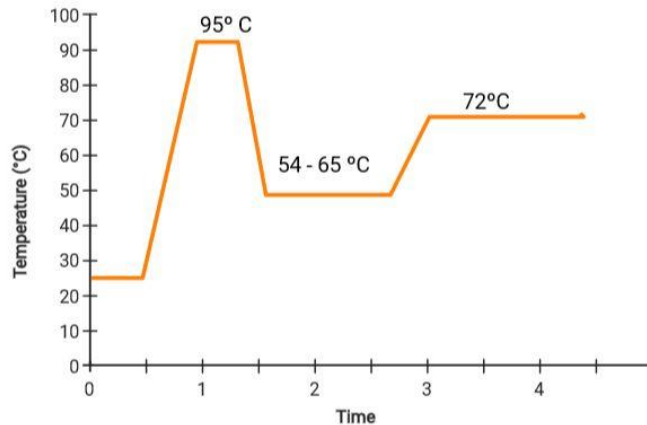


100% eficiencia de
los cebadores =
Producto de PCR se
duplica

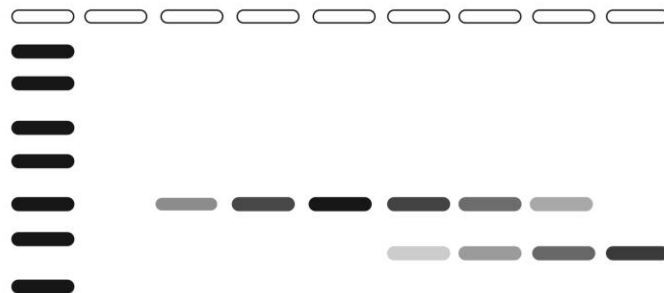
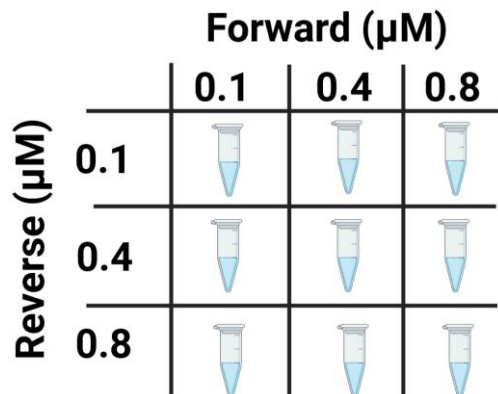
Optimización temperatura de hibridación



Optimización temperatura de hibridación



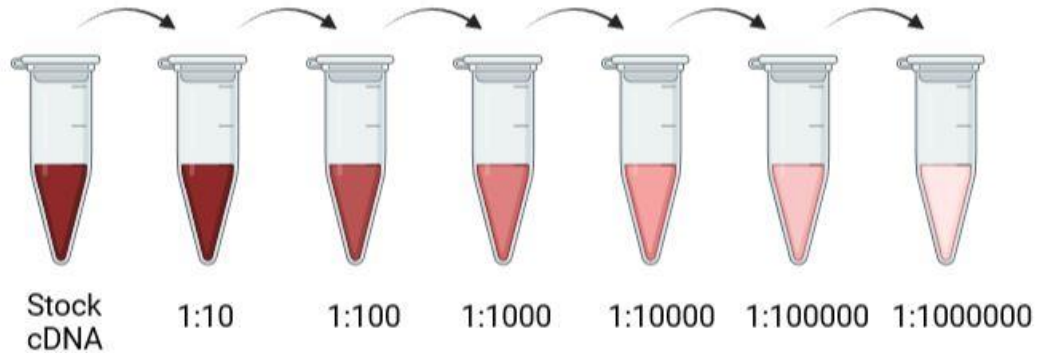
Optimización de la concentración de cebadores



Concentración no mayor a $1\mu\text{M}$

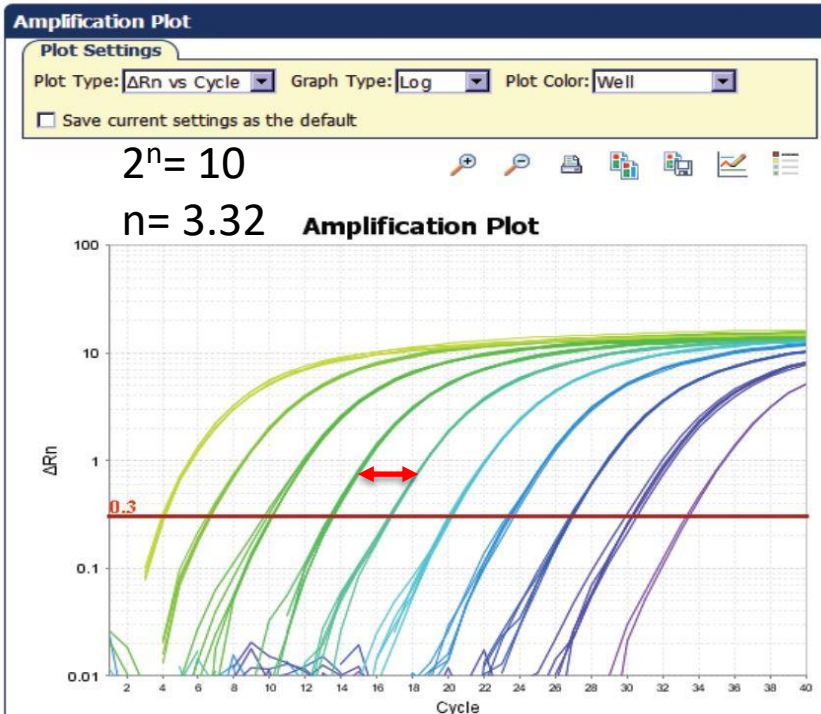
Evaluación de la eficiencia de los cebadores

Dilución seriada



- Mínimo 5 puntos

Eficiencia de los cebadores

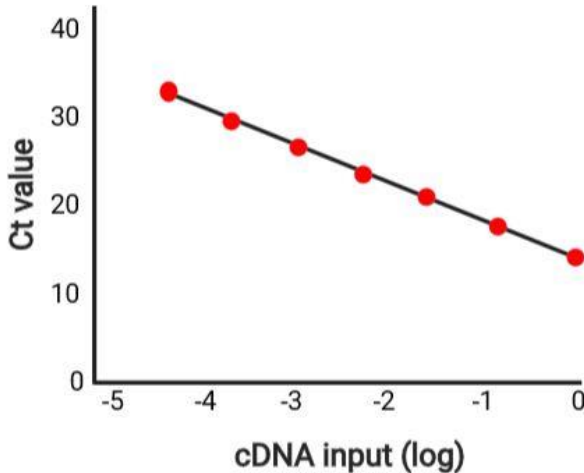


Los valores de C_T
deberían estar
separados por 3.32
ciclos

>3.32 ciclos $<100\%$
 <3.32 ciclos $>100\%$

Real-Time PCR. Life Technologies

Eficiencia de los cebadores



Coeficiente de correlación= 1,
Pendiente= -3.436,
Intercepto= 40.055

$$Y = -3.436 X + 40.055$$

La eficiencia de amplificación, E, se calcula a partir de la pendiente:

$$\text{Factor de amplificación (E)} = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

$$E = 10^{-(1/-3.436)} = 1.94$$

Eficiencia de los cebadores

Porcentaje de eficiencia = $(1.94 - 1) \times 100 = 95.4 \%$

Eficiencia de cebadores= **95.4 %**

- Eficiencia de primer debe estar entre un 90% al 110%.
- Menor a un 90%: diseño subóptimo de los cebadores, condiciones incorrectas para los cebadores.
- Mayor al un 110%: Dímeros de cebadores, inhibidores de PCR, error de pipeteo.

Eficiencia de cebadores



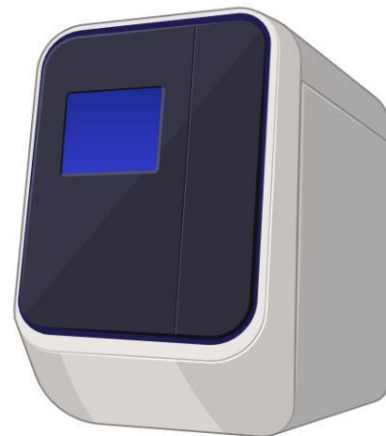
Optimización de otras condiciones

- Cambiar la velocidad de rampa (rápida o estándar)
- Cambiar el tiempo de los ciclos de la PCR

Cycles	Temp.	Time	Notes
1	*95 °C	*2 min	Polymerase activation
40	95 °C 60-65 °C 72 °C	5 s 10 s **5-20 s	Denaturation Annealing Extension (acquire at end of step)

*2 min for cDNA, 3 min for genomic DNA

** Not recommended to extend beyond 20 seconds



Otras consideraciones

- Modificar la concentración de Mg. Mg^{2+} afecta varios aspectos de la reacción de PCR y Taq requiere de Mg^{2+} libre para trabajar.
- Cantidades mayores a 50mM de KCl o NaCl inhibe la Taq
- Concentración de nucleótidos no debe ser mayor a 50 μ M de cada uno, aunque productos largos pueden necesitar más.

Calculo de eficiencia de cebadores con R

Resumen de la clase

- Como preparar los cebadores al recibirlos
- Optimizar la temperatura de hibridación a través de una PCR en gradiente
- Optimización de la concentración de los cebadores
- Comprender que es la eficiencia de los cebadores
- Optimizar la reacción a través de la concentración de Mg y condiciones del termociclador
- Calcular de eficiencia de cebadores con programación en R

Próxima clase

- Clase 7: Genes de referencia

NormFinder software