

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS EN LA TÉCNICA DE LA qRT-PCR (quantitative Real Time-Polymerasa Chain Reaction).

El DOGMA central de la biología molecular establece que la información fluye desde el DNA al mRNA y de ahí a la proteína. El flujo de información desde DNA a RNA constituye lo que se denomina expresión génica. Los cambios de expresión génica en la célula se dan constantemente y son un mecanismo fino de regulación en muchos procesos que se produce como respuesta a cambios en el ambiente o a cambios internos.

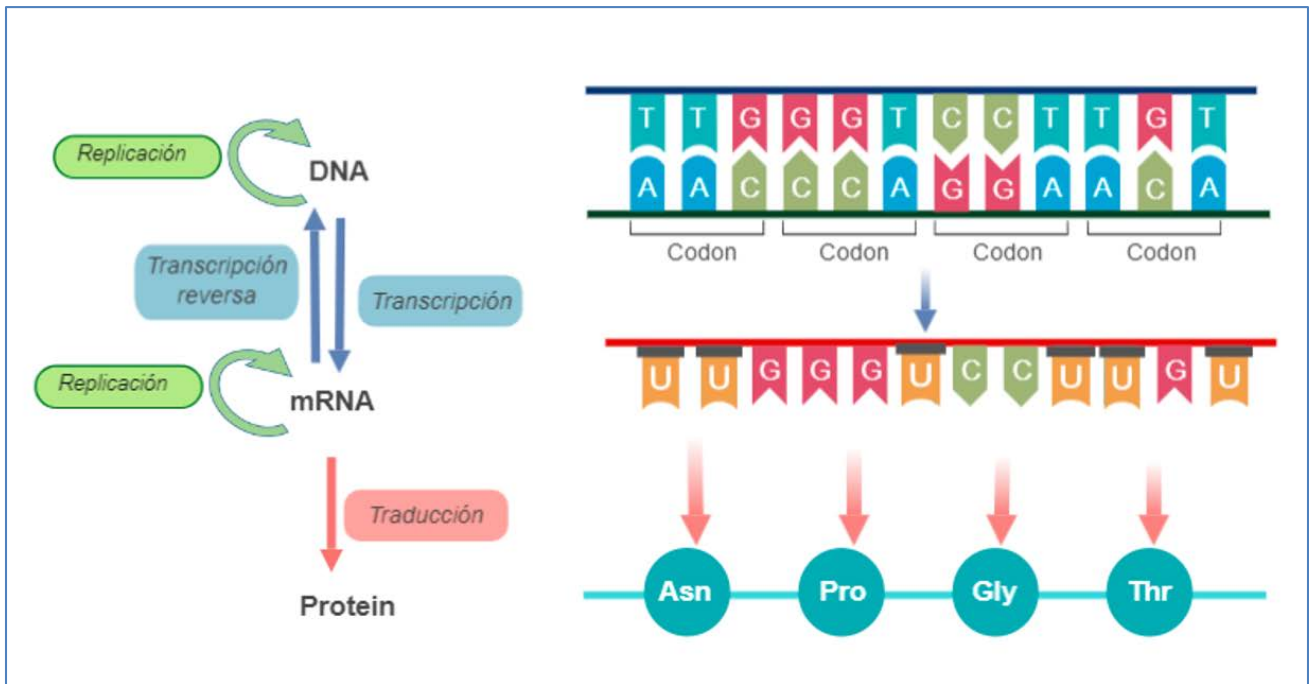


Figura 1: Dogma central de la biología molecular

No solo el DNA, sino también el RNA puede ser portador de información genética, es decir, el propio RNA puede actuar como plantilla para ser copiada y generar nuevas moléculas de ácidos nucleicos. El paso de información de RNA a DNA puede ser posible a la acción de un enzima particular denominada transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. La principal función de este enzima es sintetizar DNA (al que se le denomina DNA complementario (**cdNA**)), a partir de una plantilla de RNA. En la célula este proceso puede ser responsable, por ejemplo, de la inserción de retrotransposones en el genoma.

La técnica de la qRT-PCR permite analizar la expresión génica y compararla en distintas condiciones.

FUNDAMENTO METODOLÓGICO

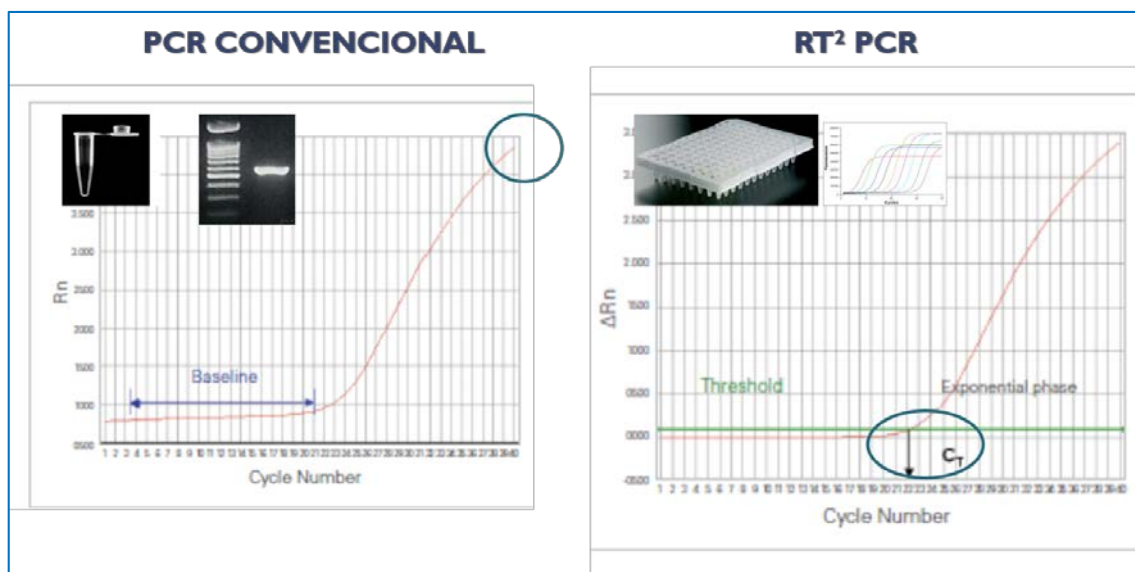
La qRT-PCR- implica varias etapas:

- **1ª ETAPA: OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL mRNA** contenido en la célula, mediante extracción con solventes orgánicos (por ejemplo, derivados del fenol).
- **2ª ETAPA: RETROTRANSCRIPCIÓN.** El mRNA servirá como plantilla para la acción de la retrotranscriptasa, que sintetizará moléculas de cdNA.

- **3ª ETAPA: AMPLIFICACIÓN DEL cDNA:** mediante la utilización de oligonucleótidos específicos (PRIMERS FORWARD Y REVERSE) que actuarán como cebadores de la acción de la polimerasa, se amplificará el cDNA de aquellos genes cuya expresión nos interese analizar.

Esta amplificación puede llevarse a cabo con fines *cualitativos* (PCR convencional) o con fines *cuantitativos* (qRT-PCR).

La qRT-PCR se diferencia de la PCR convencional en varios puntos. El más importante es que mediante la amplificación con PCR sólo podemos observar el punto final. Es decir, podemos observar si hay o no expresión del gen de interés (CUALITATIVA). La qRT-PCR nos permite saber cuánto hay de cada gen estudiado (CUANTITATIVO).



Supuesto experimental

El tratamiento con un determinado inmunosupresor en pacientes trasplantados de riñón para evitar el rechazo del órgano nuevo, se ha asociado a la aparición de una diabetes reversible en un 10-12% de estos pacientes. Se ha diseñado un experimento para tratar de ver la influencia sobre la expresión de los genes de insulina de un tratamiento continuado con este fármaco en ratas de laboratorio.

1ª ETAPA: OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL mRNA

A. Obtención del RNA

Para comenzar el experimento contamos con muestras de RNA purificado por TRIZOL (un derivado comercial del fenol). La concentración y la pureza del RNA se han obtenido midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

Tenemos las siguientes muestras (islotos de Langerhans aislados):

- 6 individuos controles (Individuos c1 al c6))
- 6 individuos tratados durante 7 días (individuos fk1 al fk6)),

Las medidas de concentración y pureza del RNA obtenido están relegadas en la tabla 1.

B. Eliminación de DNA genómico

Frecuentemente, durante el proceso de extracción de RNA, también se extrae DNA genómico (gDNA). Esto supone un problema, porque el gDNA es susceptible de amplificarse durante la PCR posterior, pudiendo falsear así nuestros resultados. Por eso, es necesario llevar a cabo una eliminación de gDNA, previa a la retrotranscripción del mRNA. Para ello, se comercializan kits que se aprovechan de la diferente composición en nucleótidos que tienen las moléculas de DNA y de RNA (Timina, en vez de Uracilo).

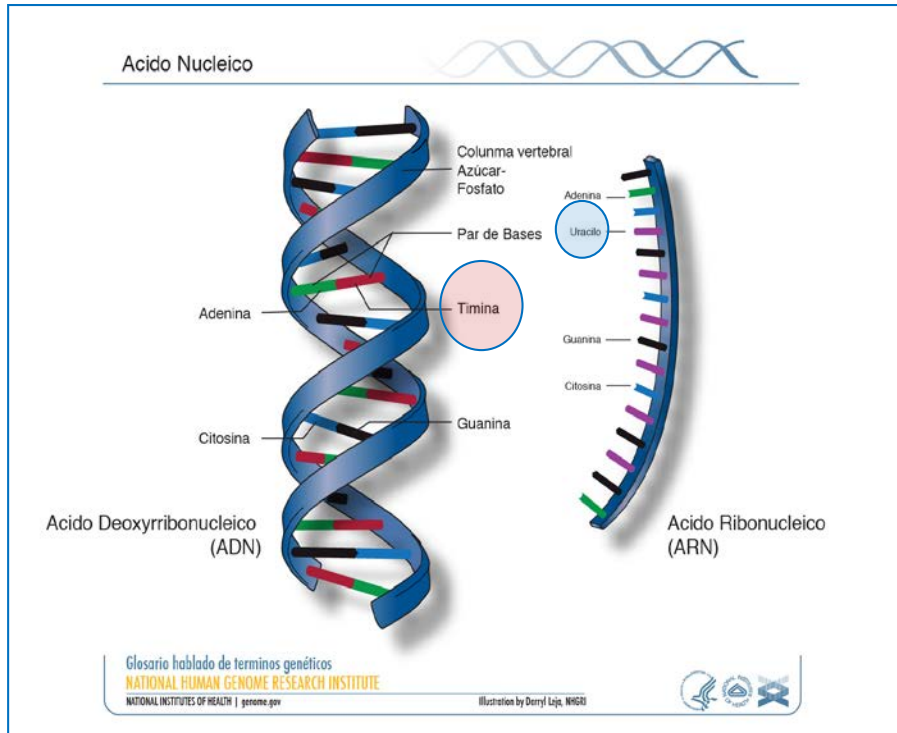


Figura 2: Estructuras DNA y RNA. Diferente composición de bases nitrogenadas. (Adaptación de una imagen de <https://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=140>)

C. Protocolo. En el laboratorio

El protocolo para realizar este paso se detalla a continuación:

Componente	Volumen de reacción
gDNA wipeout Buffer 7x	2 µl
Muestra de RNA	Variable según su concentración. MÁXIMO 1 µg de ácidos nucleicos.
Agua libre de RNAsas	Variable en función del volumen de muestra añadido en el paso anterior
Volumen total	14 µl

ACTIVIDAD 1

- En una hoja Excel calcular el volumen que hay que añadir de cada muestra para preceder a la ELIMINACIÓN DE gDNA, Teniendo en cuenta que hay que añadir 1 µg de ácidos nucleicos.
- En la siguiente tabla se resume el grado de pureza de RNA y su concentración en cada muestra.
- Hacer los cálculos necesarios.
(IMPORTANTE: volumen final de reacción: 14 µl, de los que 2µl se corresponden al enzima gDNA Wipeout → Volumen restante: 12 µl)

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	CONCENTR. µg/ml	µL muestra	µL agua
c1	0,015	0,007	2,09	31		
c2	0,038	0,019	2,03	78		
c3	0,019	0,008	2,3	39		
c4	0,078	0,040	1,96	160		
c5	0,029	0,014	2,12	59		
c6	0,109	0,059	1,85	221		
Fk1	0,198	0,109	1,90	404		
Fk2	0,284	0,174	1,64	580		
Fk3	0,716	0,423	1,69	482		
Fk4	0,199	0,111	1,79	406		
Fk5	0,039	0,02	1,93	79		
Fk6	0,112	0,059	1,90	150		

Tabla 1. Medidas de concentración y pureza de las muestras

- Pipetear los volúmenes correspondientes en tubos libres de RNAsas, siguiendo estrictamente las normas para no contaminar las muestras
- Incubar 3 minutos a 42°C
- Pasar inmediatamente a hielo

2ª ETAPA: RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción (reacción RT) es un proceso por el que una hebra de RNA se *retrotranscribe* en una cadena complementaria, que llamamos cDNA. Para ello se necesita un enzima retrotranscriptasa, dNTPs (mezcla de nucleótidos), un buffer de trabajo y un cebador, un oligonucleótido complementario a la secuencia de RNA, que se une a esta molécula y que sirve para que el enzima empiece su acción retrotranscriptora.

La elección de este cebador dependerá de lo que queramos estudiar. Existen tres tipos de primers para la reacción RT y todos tienen sus pros y sus contras:

- Primer oligo(dT):** Este cebador se une a la cola de poliA característica del mRNA, de manera que la retrotranscripción se inicia siempre por el extremo 3' del mRNA.
- Primers específicos (SSPs, Sample Specific Primers):** se unen de manera específica al mRNA en aquella zona de su secuencia donde esté el gen que queremos estudiar.
- Random primers:** Es un cocktail de oligonucleótidos (generalmente, de 6 nt) de secuencia variada que se unen de manera aleatoria a lo largo de la secuencia de RNA.

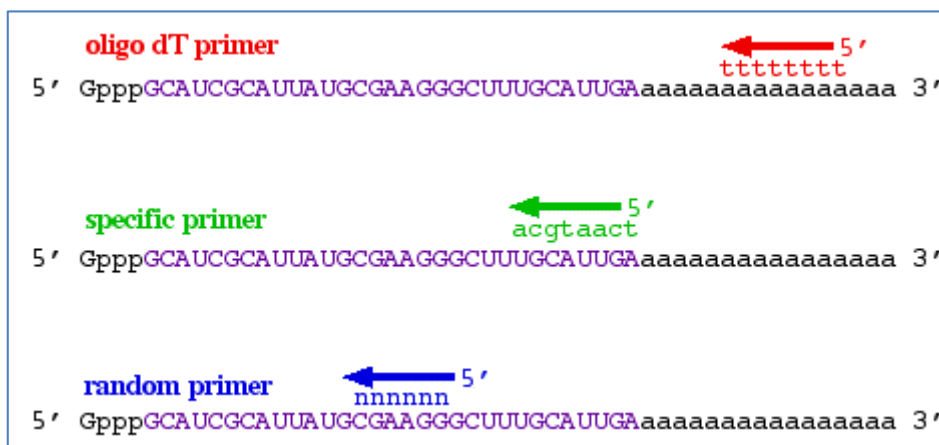


Figura 3: Tres tipos de primers para la reacción RT (<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/cdnaproduction.html>)

TIPO DE PRIMER	PROS	CONTRAS
OLIGO(dT)	<ul style="list-style-type: none"> - reacción muy específica del mRNA 	<ul style="list-style-type: none"> - reacción muy específica del mRNA (no se puede usar 18S) - No siempre se alcanza el extremo 5' en la retrotranscripción
SSPs	<ul style="list-style-type: none"> - Alta especificidad para un determinado gen 	<ul style="list-style-type: none"> - Necesitamos una reacción RT diferente para cada uno de los genes en estudio - Se gasta mucha muestra
RANDOM PRIMERS	<ul style="list-style-type: none"> - Se unen en cualquier punto de la secuencia de RNA (mRNA, tRNA,...) - Aumenta la probabilidad de que se retrotranscriba toda la molécula de mRNA - Se puede usar el 18S como ref. activa - Al generarse fragmentos cortos de cDNA se mejora la posterior qRT-PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se pierde la especificidad por el mRNA. - No se producen fragmentos de cDNA demasiado largos y puede que afecte a alguno de los genes que queremos estudiar

PROTOCOLO

- Se parte de, máximo, 1 µg de RNA. En el paso anterior partíamos de un 1 µg de ácidos nucleicos. Así que asumimos que la eliminación de gDNA no ha afectado a esta cantidad. De esta manera, estamos seguros de no sobrepasar la cantidad máxima en este paso.
- Se añaden, a cada muestra, las cantidades necesarias de enzima RT y de buffer RT (contiene random primers, cofactores, dNTPs)
- Preparamos uno de los controles necesarios para la qRT-PCR: **control RT**. Este control llevará muestra y buffer RT, pero no llevará el enzima RT. lo que queremos es comprobar que la digestión previa del gDNA ha funcionado. Si es así, no habrá ninguna molécula de DNA que pueda ser amplificada en la PCR. (La polimerasa no replica RNA, que es lo único que debería quedar en el control RT). Es necesario hacer un control RT⁻ para cada muestra
- Incubar TODAS las muestras y sus controles 15 minutos a 42°C (elongación del cDNA)
- Inactivar el enzima: 3 minutos a 95°C
- Guardar en hielo o almacenar a -20°C hasta la realización de la qRT-PCR.

3ª ETAPA: AMPLIFICACIÓN DEL cDNA (qRT-PCR)

Una vez que tenemos el cDNA, queremos amplificar el gen objeto de estudio mediante una PCR cuantitativa. El número de copias que se está obteniendo en cada uno de los ciclos de la PCR puede ser observado y detectado a tiempo real. Esto es gracias al uso de materiales fluorescentes que nos indican la cantidad de copias de DNA que tenemos.

Al igual que en una PCR convencional, hacen falta primers (Forward y Reverse), un buffer de trabajo con los cofactores necesarios y dNTPs en exceso, una Taq DNA polimerasa y, generalmente, una sonda específica (TaqMan-MGB) que es la que aporta el componente fluorescente.

Las sondas Taqman-MGB son pequeños oligonucleótidos complementarios a la secuencia comprendida entre los dos primers (AMPLICÓN), y que llevan unidos dos moléculas químicas. Cada una, en uno de sus dos extremos. En el extremo 5', se sitúa un fluoróforo (*Reporter, R*) (FAM es uno de los más frecuentes) y en el extremo 3' de la misma sonda, un apagador de esa fluorescencia (*Quencher, Q*). En la hebra intacta, la distancia entre estas dos moléculas es tal que el *quencher* apaga la fluorescencia del *reporter*. Sin embargo, cuando esta sonda está rota (cosa que ocurre por la acción 5'-exonucleasa de la polimerasa), se separan y el *reporter* emite fluorescencia.

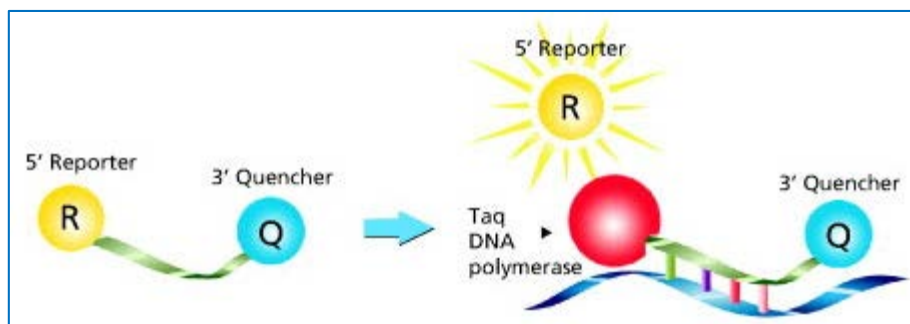


Figura 5: Sonda Taqman intacta y rota por la acción de la DNA polimerasa. Adaptación de una imagen de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/dual-labeled-probes.html>

Al igual que ocurre en la PCR convencional, esta qRT-PCR se puede dividir en distintas fases:

- **Fase de desnaturalización del cDNA:** se separan las dos hebras del cDNA
- **Fase de annealing** de los *primers* y de la sonda (que está intacta y no emite fluorescencia)
- **Fase de elongación:** La Taq polimerasa se une al extremo 3' del *primer* unido a la hebra de cDNA y empieza a elongar la nueva hebra complementaria, hasta que se encuentra con la sonda TaqMan también unida al cDNA molde. La Taq polimerasa además de replicar, también tiene la función 5'exonucleasa, lo que le permite degradar la sonda, liberando el *reporter* y produciéndose la emisión fluorescente. El equipo de Real Time PCR tiene un sistema de detección de fluorescencia que registra la emisión de luz en esta fase.

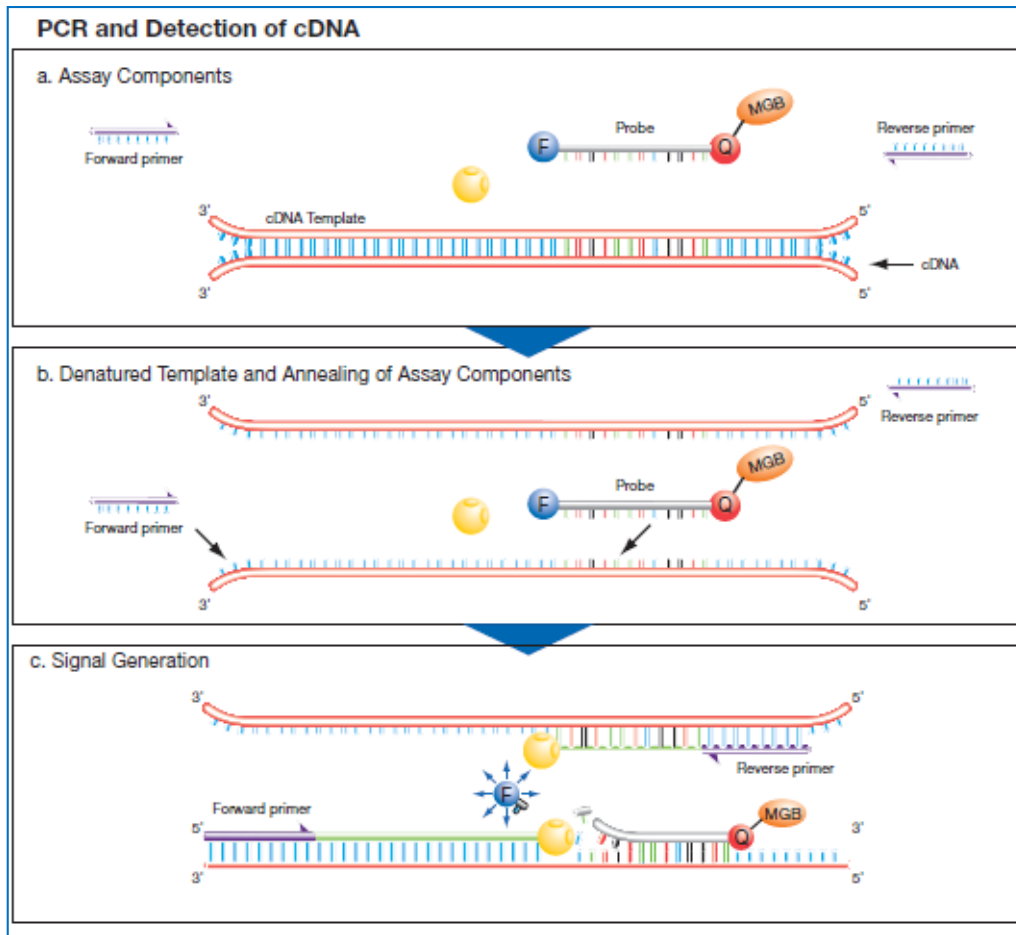


Figura 6: Fases de la qRT-PCR. Durante la elongación, se produce la liberación de la molécula fluorescente de la sonda TaqMan

DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Cuando se estudia la expresión génica es fundamental un buen diseño del experimento. Y eso incluye la introducción de una serie de controles del complejo proceso que se lleva a cabo. Por eso es importante introducir varios conceptos:

• REFERENCIA ACTIVA

Al tratarse de un proceso semicuantitativo, siempre trabajaremos con cuantificaciones relativas. Por eso, es necesario tener un referente frente al que cuantificar. Este referente debe ser un gen que se mantenga constante a pesar de las condiciones de nuestro experimento y que nos servirá para normalizar nuestro gen problema. Existen varias opciones (GAPDH, β -actina, 18S, ...), pero siempre se debe consultar la bibliografía existente para elegir el más adecuado para nuestras condiciones experimentales.

• REFERENCIA PASIVA

Se trata de introducir un fluoróforo (ROX) que normalice las variaciones de fluorescencia que NO se deben al experimento en sí, sino que se deben a las condiciones particulares de cada pipeteo de la muestra. De manera que es un fluoróforo que siempre está presente a lo largo del proceso de PCR, que siempre emite lo mismo y que no aporta información.

El equipo es capaz de medir estos dos fluoróforos de cada pocillo (ROX y FAM) y de calcular la fluorescencia normalizada (Rn) (ver figura).

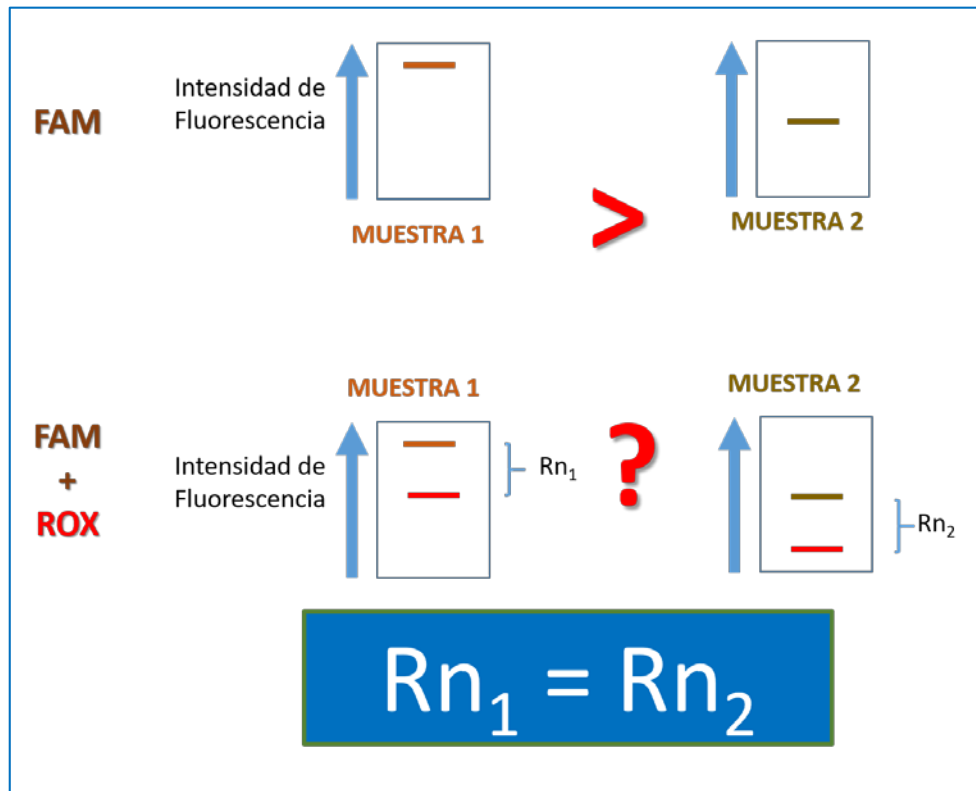


Figura 7: Cómo se calcula Rn. Para qué sirve la referencia pasiva

- **CONTROL RT⁻**

De cada muestra, es necesario tener su control RT⁻. Aquel al que no se le ha añadido retrotranscriptasa durante el proceso de retrotranscripción. Me da información sobre la presencia o no de gDNA.

- **CONTROL NTC (Non-template control)**

Es aquel control en el que se ponen todos los reactivos necesarios para la amplificación por PCR, MENOS el cDNA. Se pone agua en su lugar.

Nos da información sobre contaminación de los reactivos usados o sobre la inestabilidad de la sonda empleada (a veces, no aguantan los 40 ciclos de subidas y bajadas de temperaturas)

- **CALIBRADOR**

En el diseño inicial de nuestro experimento siempre hay que tener en cuenta una situación basal frente a la que referiremos nuestros resultados (paciente sano, cultivo celular sin fármaco, animal Wild Type, ...) (ver figura).

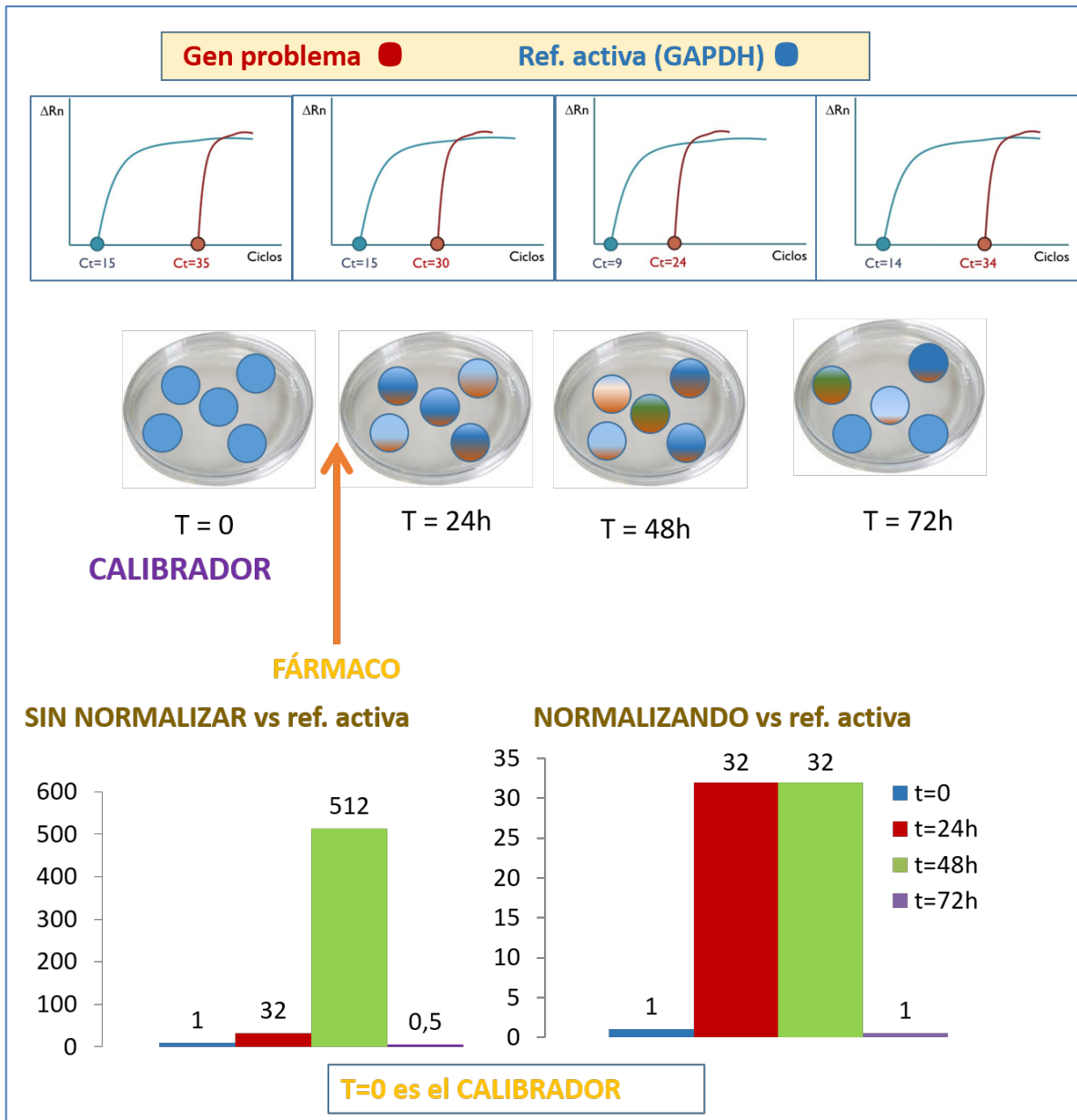


Figura 8: Para qué sirve el calibrador. Esquema explicativo del planteamiento de un experimento. Cálculo de la expresión en número de copias respecto a la situación basal (t=0), con o sin referencia activa (GAPDH), aplicando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

ACTIVIDAD 2

Diseño de placa e inicio de la programación

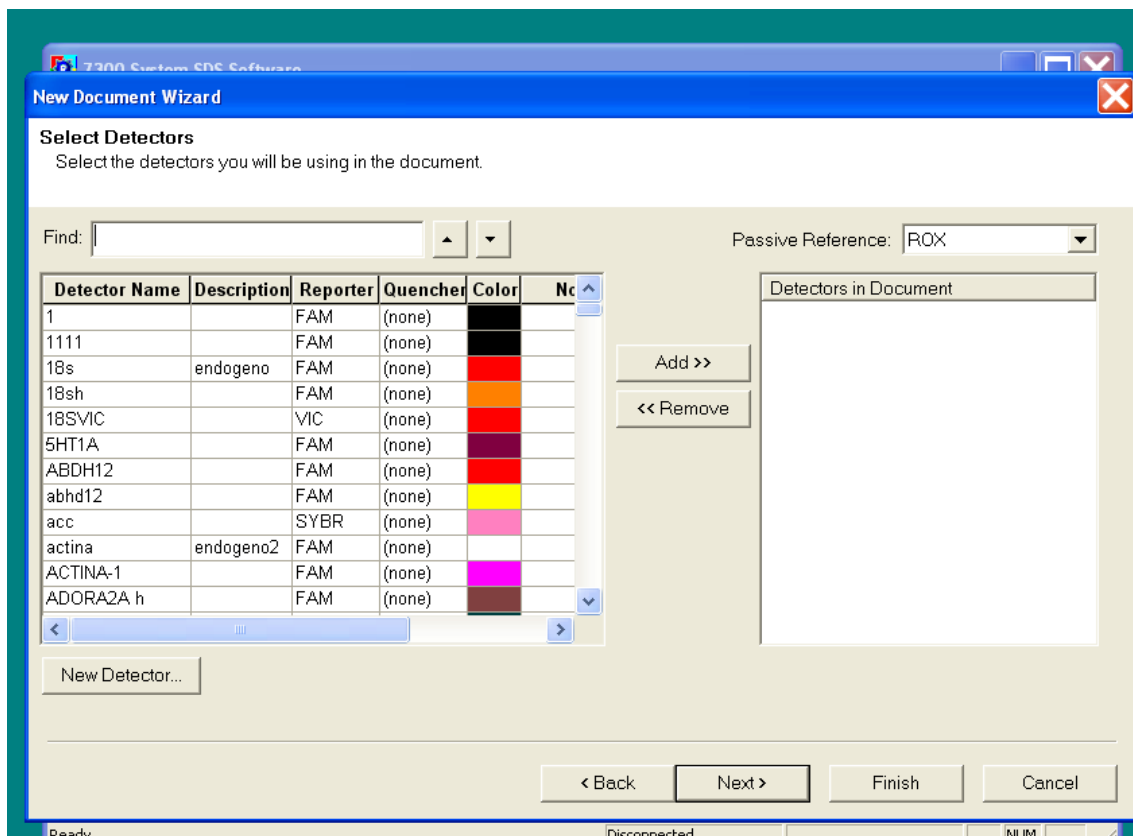
- ✓ El soporte donde se lleva a cabo la reacción es una placa de 96 pocillos.
- ✓ En nuestro caso, nuestra referencia activa será el gen que codifica el enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).
- ✓ Añadir los controles RT⁻ y NTC
- ✓ Teniendo en cuenta que cada muestra y su control deben probarse por duplicado, diseñar las placas que nos permita en análisis de los genes INS1, INS2 y GADPH.

✓ Una vez diseñada la placa, en cada pocillo, se pipetearán los volúmenes correspondientes para obtener un volumen final de 20 μ l, que incluya los siguientes componentes:

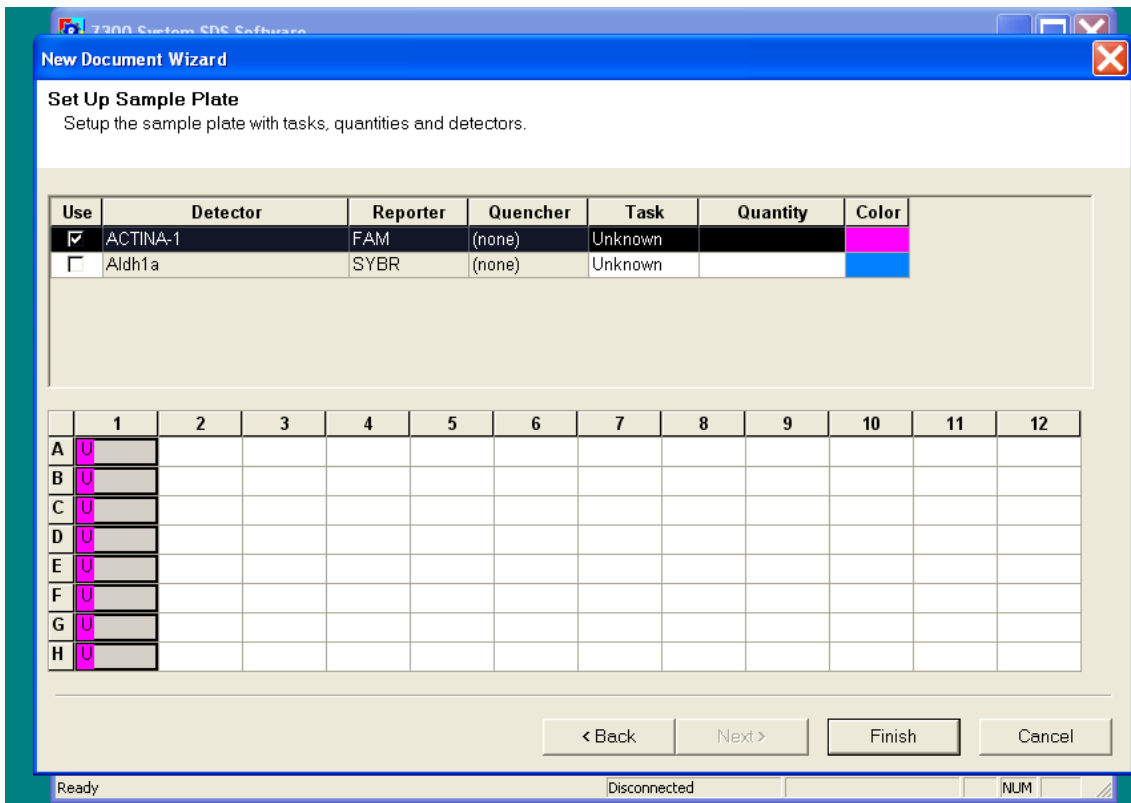
- Mix (DNA polimerasa, dNTPs, cofactores,) \rightarrow 10 μ l
- Sonda TaqMan específica para cada uno de los tres genes junto a su pareja de primers correspondiente (comercial) \rightarrow 1 μ l
- H₂O \rightarrow 5 μ l
- Muestra de cDNA o su correspondiente control RT⁻ o Agua (NTC): 4 μ l.

➤ **A continuación, se irá realizando el diseño y ajuste de los parámetros en el programa correspondiente teniendo en cuenta que ha sido programado previamente**

1. Seleccionar los genes que vamos a estudiar de la lista existente:



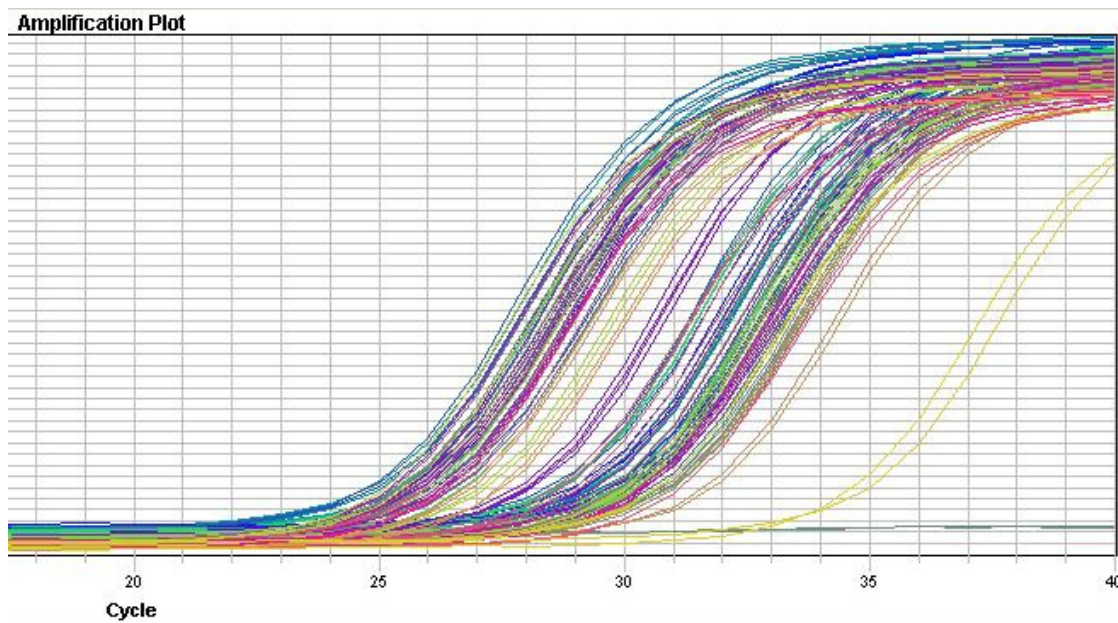
2. Identificar en cada pocillo, qué gen es el que vamos a estudiar, y de qué paciente se trata. Colocar también los controles NTC y RT⁻



ACTIVIDAD 3

A. Visualización de los resultados

Los resultados obtenidos tras la amplificación se reflejan como sigue en la siguiente figura:



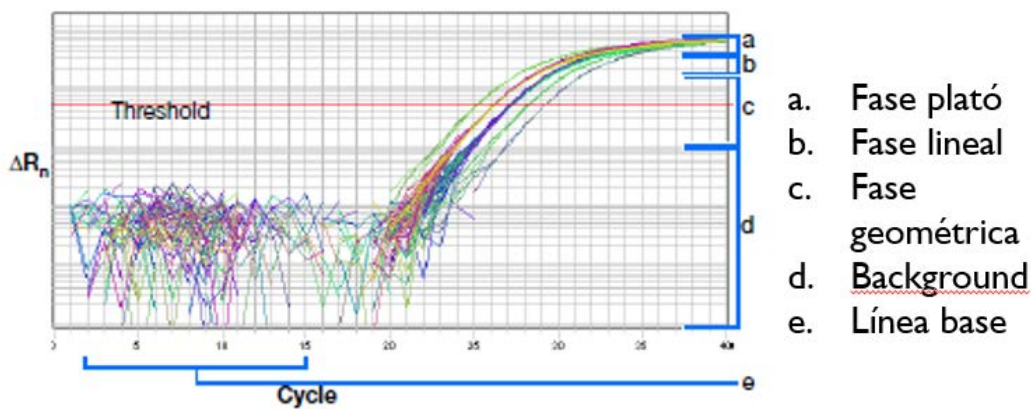
En ordenadas se refleja la intensidad de fluorescencia normalizada (ΔR_n) de todos los pocillos y en abscisas el número de ciclo de la PCR

$$\Delta R_n = R_n_{\text{ciclo } x} - \text{línea base}$$

$$R_n = FI_{\text{reporter}} / FI_{\text{ROX}}$$

Nos interesa la **fase exponencial** de la curva de amplificación. Es en esa pequeña zona en la que el número de copias generadas de nuestro cDNA molde ha unido el número de sondas suficiente para que, cuando son hidrolizadas, liberen la cantidad de *reporter* mínima para ser detectada por el aparato. Nos interesa encontrar ese mismo punto en todas las muestras, con un criterio común (*Threshold*, umbral).

Pero para el análisis de esta fase, es mejor que sea representada de forma lineal. Para ello, se representa ΔCt en escala logarítmica, generándose una nueva representación:



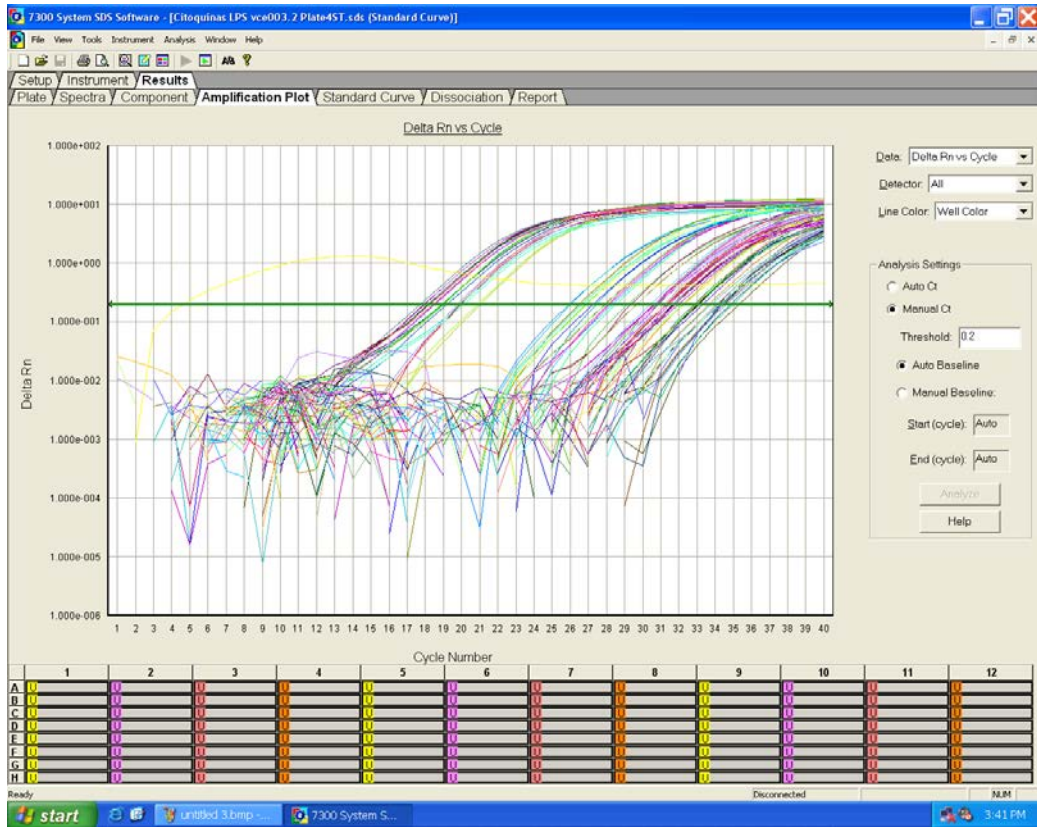
- a. Fase plató
- b. Fase lineal
- c. Fase geométrica
- d. Background
- e. Línea base

B. Análisis de los resultados

1. Eliminar los pocillos cuya medida se observe alterada
2. Ajustar el umbral de detección determinado automáticamente por el software, situándolo en la zona lineal, en dos puntos diferentes y observar los cambios en los Ct (*Cycle at Threshold*, ciclo en el umbral)

El **umbral** (*Threshold*) nos ayuda a que el análisis de los datos sea uniforme para un mismo gen, dentro de un grupo experimental. Es decir, es el parámetro que establecemos como punto de referencia para que el Ct que se asocia a cada muestra esté calculado bajo los mismos parámetros. Esto es lo que nos permite un análisis posterior. Sin "homogenización", los resultados no serían comparables.

Cada gen debe ser analizado por separado y en conjunto para todas las muestras del experimento que estamos llevando a cabo. Es decir, habrá que establecer un umbral único para INS1 en TODAS las muestras (no para NTC ni para RT⁻). Otro distinto para INS2 y otro distinto para GAPDH.



Observar estos cambios en el display de los datos "Plate" (Cts de cada uno de los pocillos).

The screenshot shows the 'Plate' data table in the 7300 System SDS Software. The table displays cycle numbers for each well (A-H) from 1 to 12. The data is as follows:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	U 18.14	U 30.68	U 31.66	U 33.06	U 18.15	U 34.27	U 34.13	U 34.37	U 18.92	U 31.30	U 29.14	U 34.18
B	U 18.20	U 31.24	U 31.60	U 33.04	U 18.14	U 35.24	U 34.80	U 33.03	U 18.88	U 31.22	U 29.26	U 34.41
C	U 19.15	U 33.25	U 32.96	U 34.97	U 20.00	U 27.89	U 27.35	U 31.96	U 19.01	U 33.08	U 31.40	U 33.57
D	U 19.71	U 32.87	U 32.16	U 34.25	U 19.09	U 27.92	U 27.21	U 31.68	U 18.99	U 34.07	U 31.70	U 34.11
E	U 17.69	U 30.55	U 29.57	U 32.79	U 17.96	U 26.42	U 25.94	U 31.13	U 20.87	U 28.43	U 28.06	U 32.19
F	U 18.09	U 30.72	U 29.61	U 33.71	U 17.92	U 26.46	U 26.04	U 31.75	U 21.04	U 28.26	U 28.14	U 32.22
G	U 19.94	U 30.63	U Undet.	U 34.54	U 18.47	U 26.81	U 26.69	U 31.24	U 18.35	U 30.33	U 30.54	U 32.90
H	U 20.10	U 31.30	U 31.12	U 34.22	U 18.42	U 26.94	U 26.57	U 30.81	U 4.61	U 30.86	U 31.19	U 34.18

ACTIVIDAD 4

A. Cuantificación relativa. Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Los datos que nos ofrece el programa son los Cts, es decir, el ciclo en el umbral.

- En la plantilla de Excel “hoja de análisis de resultados” calcular el incremento de Ct (ΔCt). Para ello, se resta a la media de los Cts del gen a evaluar (INS1 e INS2) la media de los Cts del gen control (GAPDH) en cada muestra.
- Representar las gráficas de los valores de ΔCt por un lado, y de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$

MÉTODO DEL $2^{-\Delta\Delta Ct}$

PASO 1: normalizar vs ref. activa (gen endógeno)
 $Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen endógeno} = \Delta Ct$

PASO 2: Normalizar respecto al CALIBRADOR
 $\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador} = \Delta\Delta Ct$

PASO 3: Cálculo de los niveles de expresión

$2^{-\Delta\Delta Ct}$

- Interpretar los resultados obtenidos.
- ¿En qué se diferencian las gráficas de los Cts con respecto a las gráficas de los $2^{-\Delta\Delta Ct}$?