

Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) - II



Agenda

Fundamentos de la
PCR, parte I

Fundamentos de biología molecular

Definición de PCR

Las fases de la PCR

Fundamentos de la
PCR, parte II

Definición de PCR en tiempo real

PCR en tiempo real cualitativa

PCR en tiempo real cuantitativa

Fundamentos de la
PCR, parte III

Definición de la temperatura de fusión

Análisis de la curva de melting

PCR en tiempo real



PCR en tiempo real (RT-PCR)

- La PCR en tiempo real es una reacción de PCR regular que utiliza un oligonucleótido adicional marcado con una molécula fluorescente: Se denomina sonda.
- La sonda es un ADN monocatenario, que coincide con la secuencia diana
- La sonda fluorescente emite una señal fluorescente cuando se activa mediante hibridación
- Una copia del ADN diana activa una molécula sonda. Por tanto, la señal de fluorescencia será directamente proporcional al número de copias de ADN diana generadas
- Ejemplos de sondas utilizadas para la PCR en tiempo real: Sondas Taqman, baliza molecular, Scorpion...

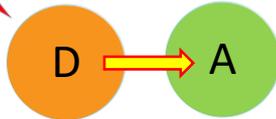


Tecnología de FRET:

- La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) es una interacción dependiente de la distancia entre dos moléculas de tinte.
- La energía de excitación se transfiere de una molécula donante a una molécula aceptadora sin emisión de un fotón.
- La FRET tiene muchas aplicaciones, incluida la PCR.

D=Donante/indicador
A=Aceptadora/extintor

Excitación



Cerca – La fluorescencia se absorbe

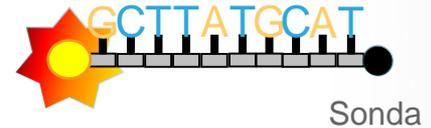
Excitación



Separadas – La fluorescencia se emite

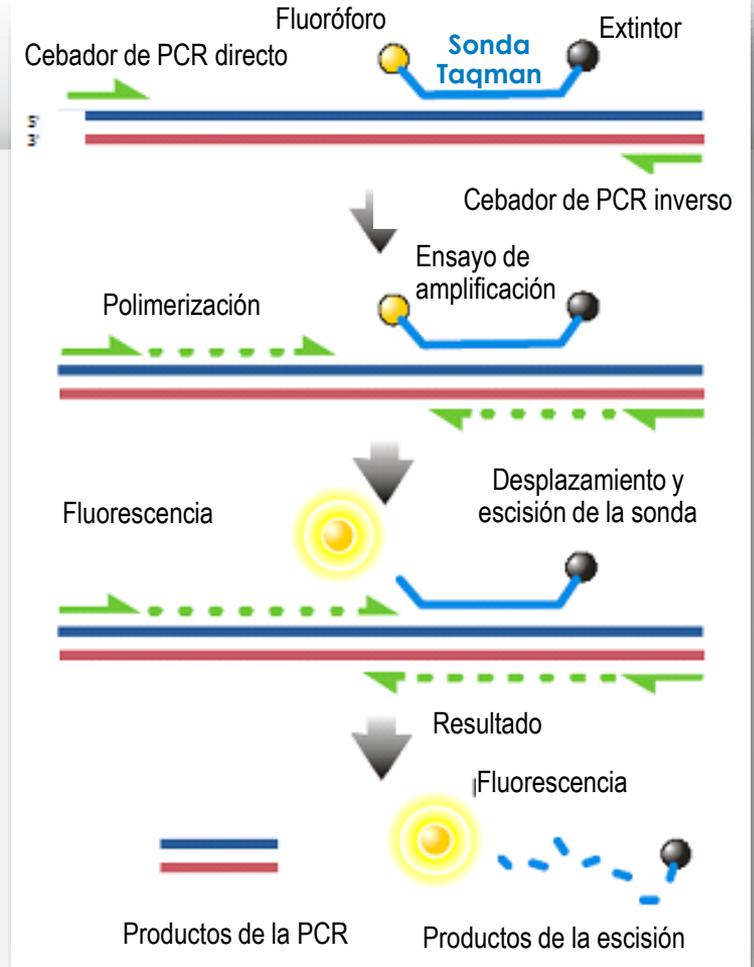
Sonda Taqman

- Una sonda Taqman es un oligonucleótido corto (de 15-30 bases de largo) marcado con un fluoróforo fluorescente en el extremo 5' y un extintor en el extremo 3'.
- Siempre que el indicador y el extintor estén próximos, el extintor absorberá la fluorescencia del indicador
- La sonda se diseña mediante una secuencia de ADN para hibridarse con la diana
- Durante la fase de extensión de la PCR, la Taq polimerasa degradará la sonda
- Esto separará físicamente al indicador y al extintor, permitiendo que se emita y mida la fluorescencia



1 amplicón de
ADN/fluoróforo libre

Sonda Taqman



Sonda Taqman

Indicador

Extintor



Sonda Taqman



Cebador directo



Sonda Taqman

Cebador directo

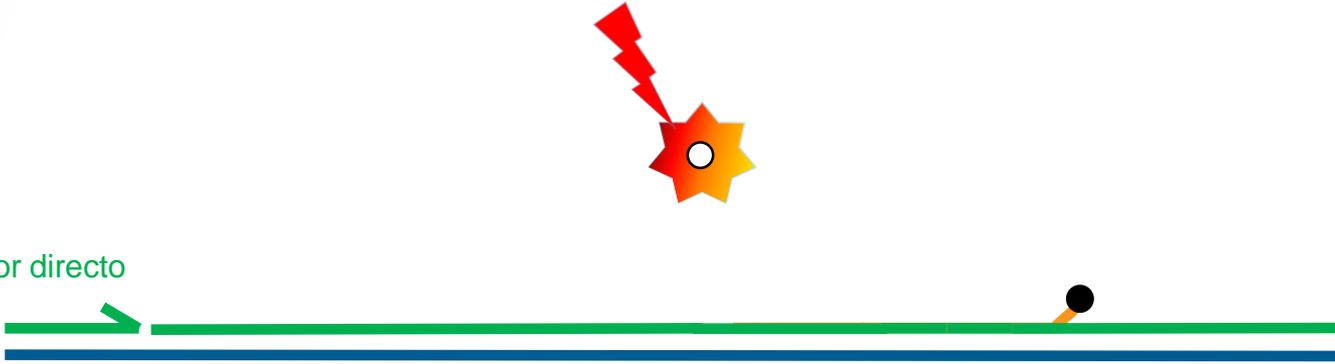
Indicador

Extintor



Sonda Taqman

Cebador directo



Sonda baliza molecular

- Una sonda baliza molecular es una molécula con forma de horquilla que consta de un fluoróforo (indicador) y un extintor
- La secuencia de la sonda tiene unas 17-21 bases de largo. La secuencia matriz debe tener una elevada proporción de GC (>80 % de la secuencia total) para formar un dúplex estable de 5-8 bases de largo.
- Cuando está libre en una solución, las dos extremidades se mantienen próximas, provocando la extinción de la fluorescencia.
- En presencia del ADN diana, la sonda se hibrida con la diana y separa al indicador y el extintor, provocando la emisión de la fluorescencia

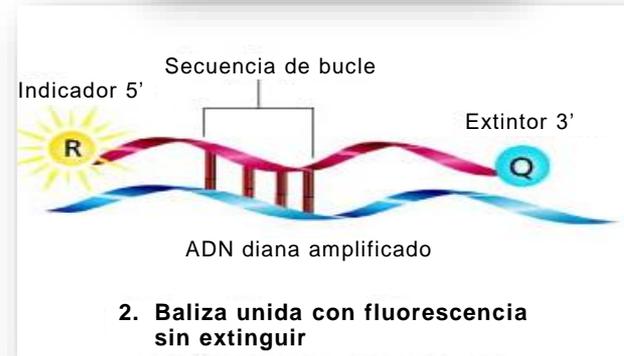


Imagen: Sigma-Aldrich

Sonda baliza molecular



Sonda baliza molecular



Sonda baliza molecular



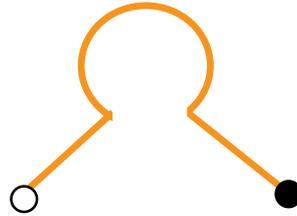
Sonda baliza molecular



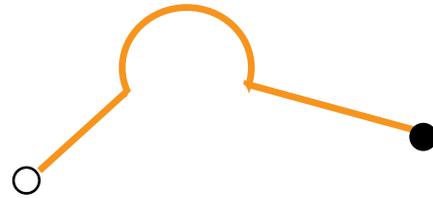
Sonda baliza molecular



Sonda baliza molecular



Sonda baliza molecular



Sonda baliza molecular

Cebador directo



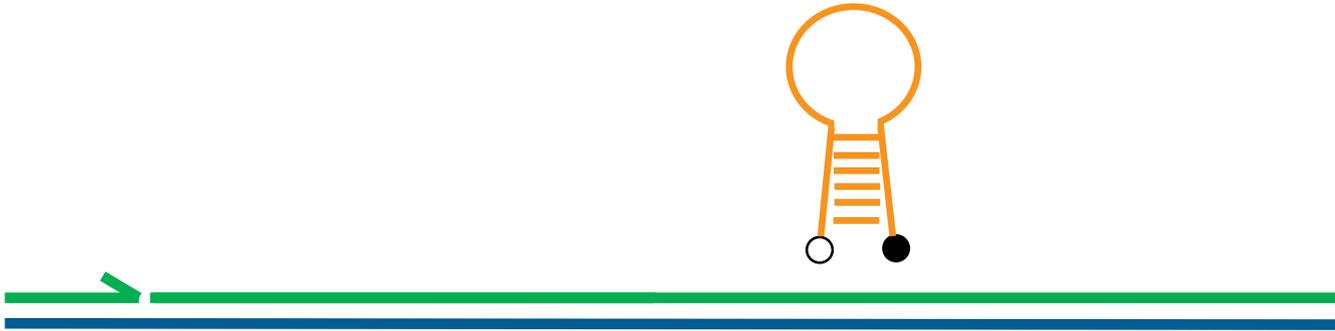
Sonda baliza molecular



Sonda baliza molecular



Sonda baliza molecular

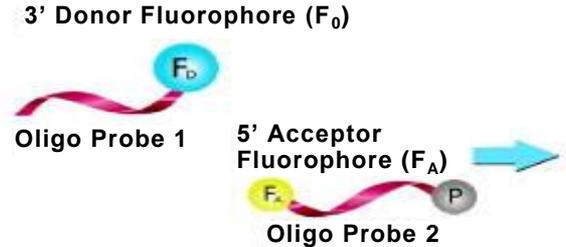


Sonda baliza molecular



Sonda FRET

- Las sondas FRET son un par de oligonucleótidos con un fluoróforo donante y un fluoróforo aceptador
- El donante, al ser excitado mediante el instrumento, excitará al aceptador, que emitirá la fluorescencia. El instrumento detectará esta fluorescencia
- Cuando las sondas estén libres en una solución, este fenómeno no se producirá debido a la falta de proximidad
- Durante la fase de hibridación de la PCR, las sondas se hibridan muy próximas la una de la otra, lo que permite que la energía se transfiera y la fluorescencia se emita y se mida



1. Probes in solution emit low fluorescence

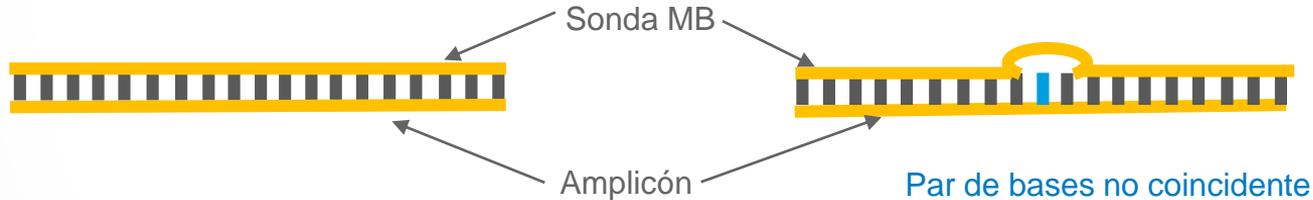


2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

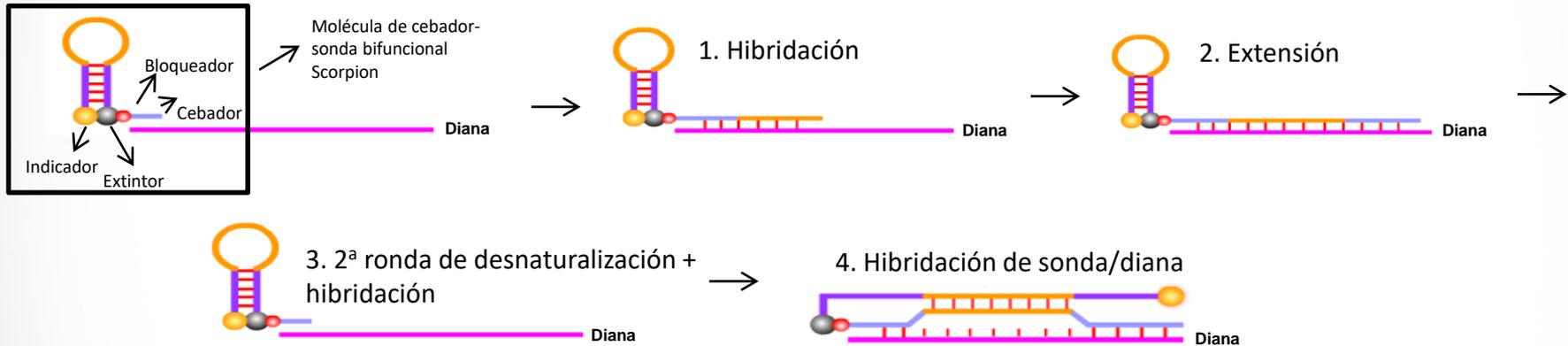
Imagen: Sigma-Aldrich

Baliza molecular divergente

- Las balizas moleculares divergentes («sloppy») poseen secuencias de sonda relativamente largas (de unas 30-40 bases de largo), lo que les permite formar híbridos con amplicones de muchas especies diferentes, pese a la presencia de **pares de bases no coincidentes**.



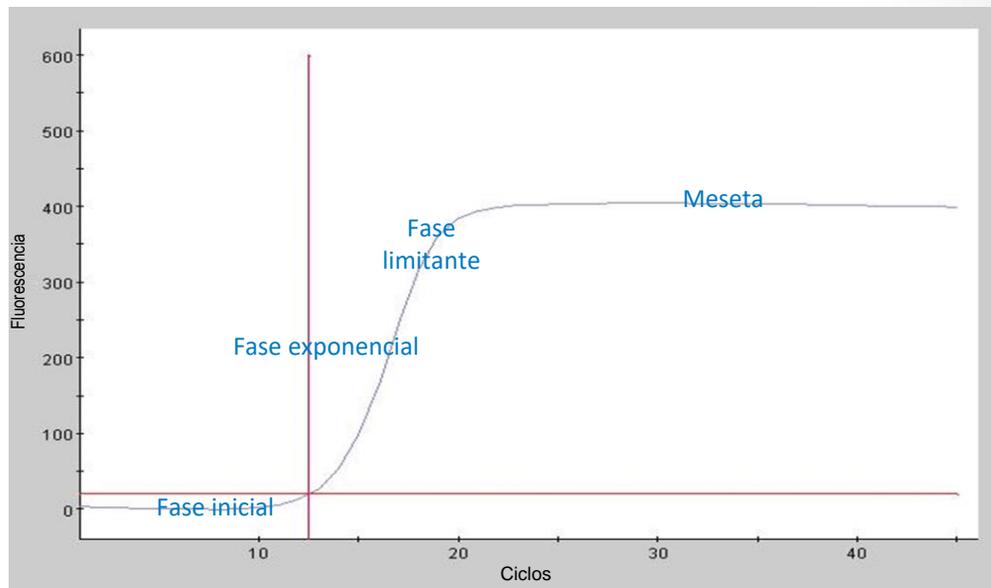
Sonda Scorpion



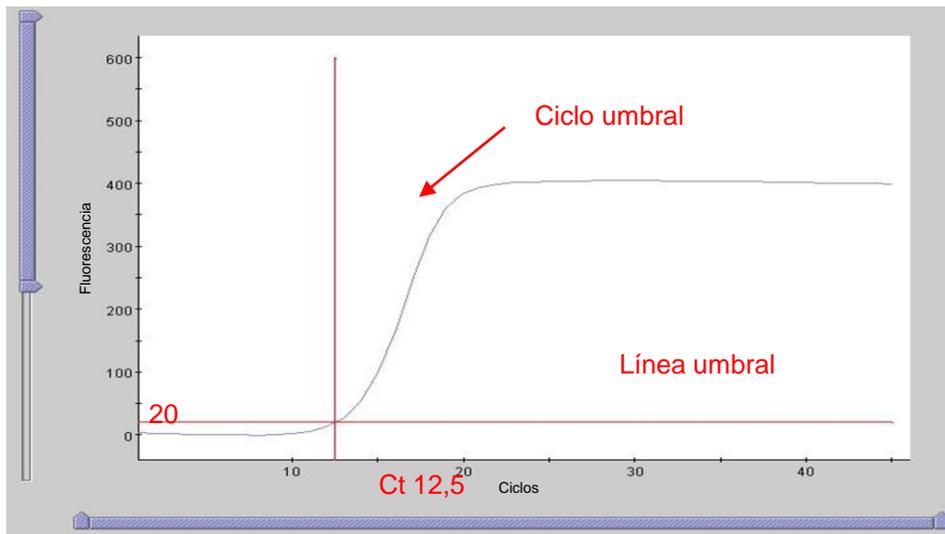
La secuencia de la sonda debe tener 17-27 bases de largo.

Cambios en la fluorescencia durante la PCR

- La curva de amplificación consta de 4 fases:



Definición de ciclo umbral (Ct): basada en el umbral



- Ciclo umbral (Ct): el primer ciclo en el que se cruza un umbral de fluorescencia definido.
- Este valor de ciclo puede ser fraccionario

Criterios de validación de una PCR: Intervalo de Ct y fluorescencia de punto final

- Intervalo de Ct
 - Es el intervalo aceptable de un valor de Ct
 - Está limitado por el $Ct_{\text{mín}}$ y el $Ct_{\text{máx}}$
- Fluorescencia de punto final
 - El valor de fluorescencia al final de la PCR (Meseta)

En el caso de las pruebas Xpert fuera del intervalo, la curva de amplificación no está validada: el resultado no se puede proporcionar

PCR multiplex

- La PCR multiplex es la amplificación simultánea de **múltiples dianas de ADN**
 - Cada diana tiene su propio conjunto de cebadores
 - Cada diana se detecta o cuantifica mediante su propia sonda, se marca con un tinte diferente y se detecta en una longitud de onda de fluorescencia específica
- Al diseñar una PCR multiplex, debe evitarse una competición entre las dianas

DetECCIÓN DE VARIOS FLUOROCROMOS – 6 FLUOROCROMOS HASTA 2020

- Se seleccionan diferentes fluorocromos (indicadores)
- Los fluorocromos se excitan y emiten a distintas longitudes de onda

Analito	Indicador	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Diana 1	Fluorocromo 1	375-405	420-480 
Diana 2	Fluorocromo 2	450-495	510-535 
Diana 3	Fluorocromo 3	500-550	565-590 
Diana 4	Fluorocromo 4	630-650	665-685 
SPC	Fluorocromo 6		>700 
Diana 5	Fluorocromo 5	555-590	606-650 

Detección de varios fluorocromos – 10 fluorocromos en la actualidad

- Se seleccionan diferentes fluorocromos (indicadores)
- Los fluorocromos se excitan y emiten a distintas longitudes de onda

		Detección del iCore			
Canales ópticos del iCore		Azul + IR (420-477 nm + > 700 nm)	Verde + Rojo profundo (510-535 nm + 660-680 nm)	Amarillo (565-585 nm)	Rojo (620-645 nm)
Excitación del iCore	UV (400 nm)	CF1			
	Azul (470 nm)		FAM	CF7 (FAM-CF3)	CF9
	Verde (520 nm)	CF10 (CF3-CF6)		A532 (CF3)	CF8 (CF3-CF4)
	Amarillo (574-584 nm)				TxR (CF4)
	Rojo (635 nm)	CF6	A647 (CF5)		

Cuantificación mediante PCR en tiempo real

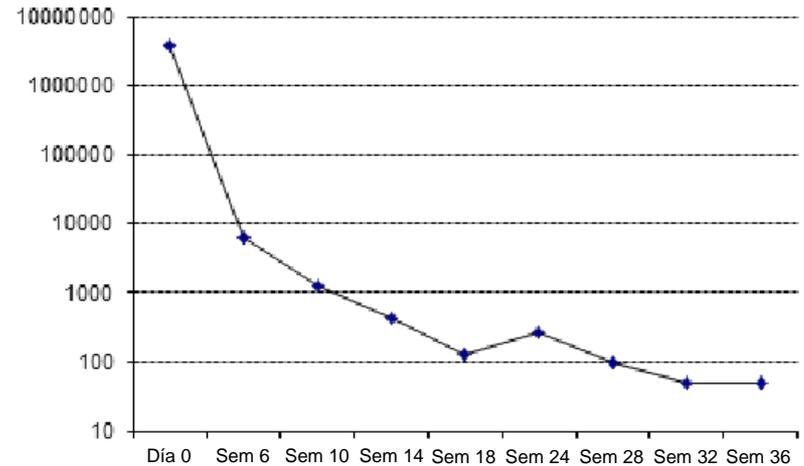


Cuantificación

- Cuantificación absoluta: resultado informado como una concentración (copias/ml, UI/ml, etc...):

Xpert HIV-1 VL y Xpert HCV

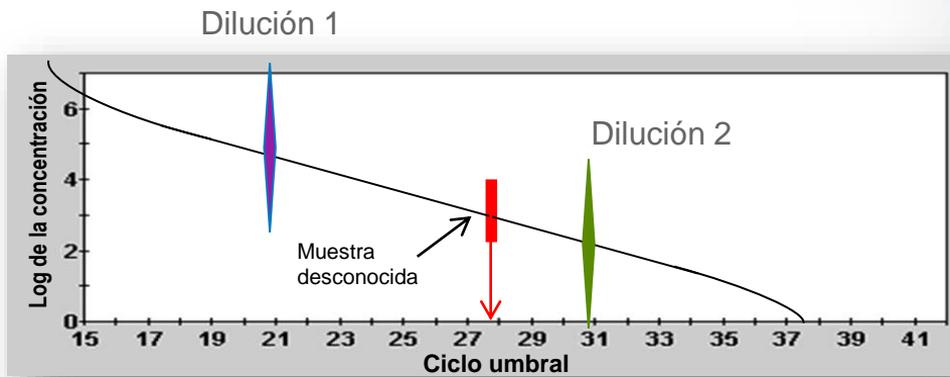
- Cuantificación relativa: resultado informado como una relación: Xpert BCR-ABL



Disminución de la carga viral de HIV-1 VL en ART (otro método distinto del GeneXpert).
Gráfico: hivbook.com

Cuantificación absoluta utilizando patrones externos

1. Prepare diluciones de una muestra que contenga el ADN diana con una concentración conocida.
2. Estas diluciones se analizarán con su muestra desconocida, cada una en tubo separado
3. Para cada dilución, se informa el Ct
4. Se traza la curva estándar: Ct en comparación con la concentración
5. El Ct de la muestra desconocida se usa para extrapolar la concentración de esta muestra a partir de la curva estándar



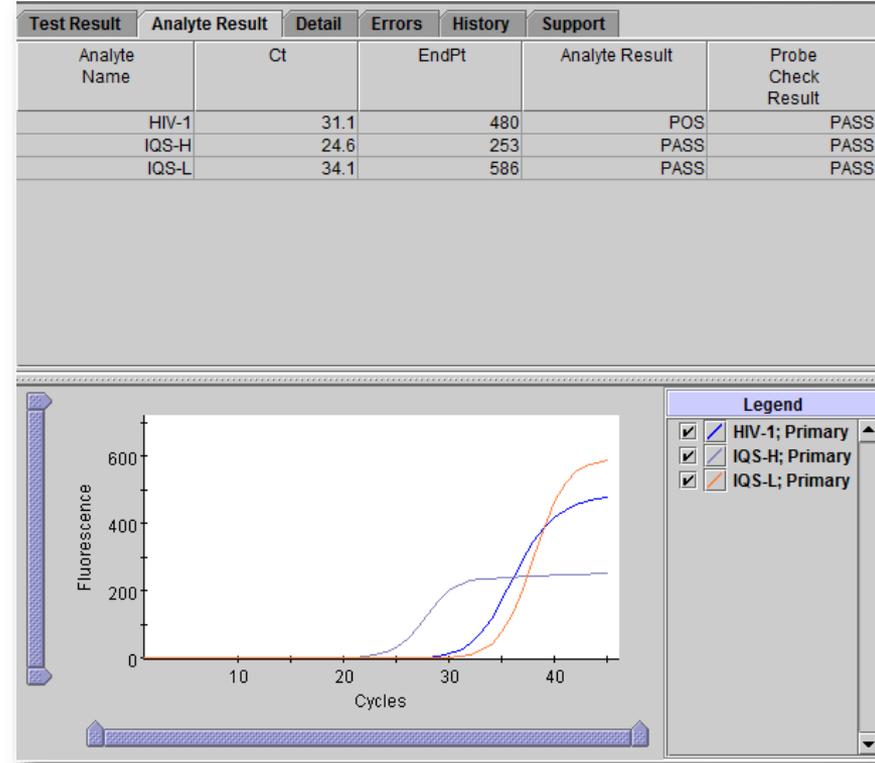
Dentro del rango lineal de concentración, 2 patrones son suficientes

Cuantificación absoluta utilizando patrones internos.

Para Xpert HIV-1 VL:

se usan 2 patrones para calcular la concentración de la muestra:

- 1 patrón alto (IQS-H) = 10^6 copias/ml
- 1 patrón bajo (IQS-L) = 10^3 copias/ml
- Tomando como base los Ct y la concentración conocida de cada patrón y el Ct de la muestra desconocida, el software GeneXpert calculará la concentración de la muestra desconocida.



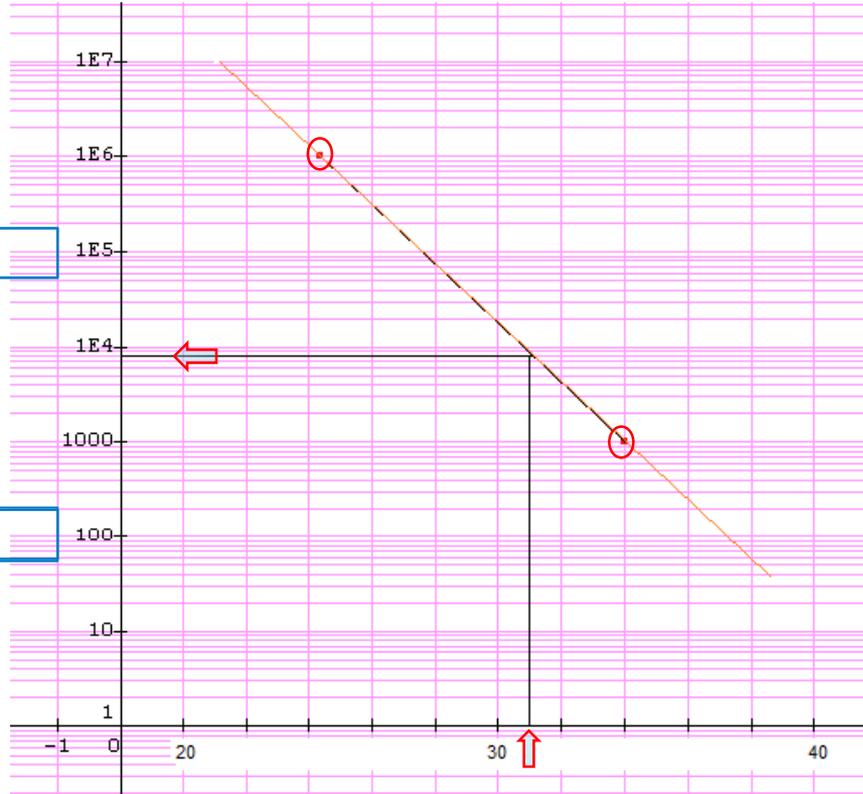
Cálculo de la concentración de la muestra

$y = \text{carga viral}$
(copias/ml)

Analyte Name	Ct
HIV-1	31.1
IQS-H	24.6
IQS-L	34.1

IQS-H

IQS-L



Cuantificación relativa con la PCR en tiempo real

(ej.: Xpert BCR-ABL)

- La cuantificación relativa mide el nivel de una diana y la expresa en relación con el nivel de un control interno (gen de referencia)
- El gen de referencia puede ser endógeno. Como tal, también puede asegurar que se use suficiente muestra en la prueba.
- Debido a su escasa variabilidad, el control endógeno también se puede utilizar para indicar la inhibición de la PCR.



POSITIVO [1,54 % (IS) y MR1,81]

Ejemplo de un resultado de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra

Conclusión

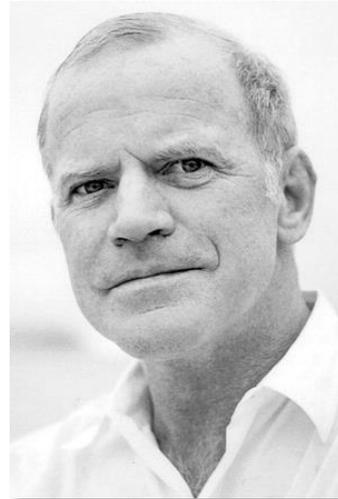
La RT-PCR es:

- Rápida
- Sensible
- Precisa
- Fácil de realizar
- Puede ser cuantitativa

“

La ciencia produce constantemente una nueva cosecha de milagrosas verdades y deslumbrantes productos todos los años.

Kary Mullis





Muchas gracias.

www.Cepheid.com

