



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Real-time polymerase chain reaction.

Rodríguez Rodríguez, Gabriela^{1*}; Acono Rodríguez, Miguel Ángel² y Zarain Herzberg, Ángel Alfonso¹.

1. Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, UNAM.
2. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

*Correspondencia. Torre de Investigación, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, Coyoacan, CDMX, México.
CP. 04510 Tel. +52 (55) 56 23 22 58, grodrig@unam.mx

Resumen

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), realizada por Kary B. Mullis en 1983, revolucionó la biología molecular. Es una técnica para amplificar ácidos nucleicos, utilizando cebadores y una polimerasa termoestable. Este descubrimiento, acoplado a la química fluorescente y con el uso de la transcripción reversa, sentaron las bases para el desarrollo de la qPCR. El objetivo de la PCR en tiempo real es distinguir y cuantificar con precisión secuencias de ácidos nucleicos específicas en una muestra, monitoreando su amplificación a través de la detección de fluorescencia, ya que el aumento en la fluorescencia es proporcional a la acumulación del producto. Esta técnica tiene diversos campos de aplicación (ciencias básicas, biotecnología, medicina, etc.).

Palabras claves: PCR Tiempo Real; RT-qPCR.

Abstract

The development of the Polymerase Chain Reaction (PCR), carried out by Kary B. Mullis in 1983, revolutionized molecular biology. It is a simple technique consisting on the amplification of nucleic acids, using primers and a thermostable polymerase. This discovery, coupled with fluorescent chemistry and the use of reverse transcription, laid the foundations for the development of qPCR. The main goal of RT-PCR is to accurately distinguish and measure specific sequences of nucleic acids present in a sample, monitoring their amplification via fluorescence detection, the increase in fluorescence is proportional to the accumulation of the product. The qPCR technique can be applied in many fields (basic sciences, biotechnology, medicine, etc.).

Keywords: Real-Time PCR; RT-qPCR.

Antecedentes

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), realizada por Kary B. Mullis y colaboradores en 1983 [1], revolucionó la biología molecular. La PCR es una técnica rápida, sensible y bastante simple para amplificar el DNA, utilizando oligonucleótidos como cebadores, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y una DNA Taq polimerasa

termoestable [2]. Para 1993, los primeros que incursionaron en el desarrollo de la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores de Roche Molecular Systems y Chiron Corporation, quienes lograron la primera demostración en tiempo real de la PCR al incluir una molécula fluorescente, el bromuro de etidio (EtBr). Al colocar la reacción bajo luz ultravioleta (UV), la cual ocasiona que el EtBr emita fluorescencia, registraron la acumulación de DNA con una cámara de video [3]. Esta investigación condujo

al descubrimiento de que la PCR se puede monitorear utilizando sondas fluorescentes, lo que llevó al desarrollo de la PCR cuantitativa o de tiempo real (qPCR). El uso de esta técnica cuantitativa, junto con la transcripción reversa, descubierta en 1970 [4], sentaron las bases para el desarrollo de la qPCR con transcripción reversa (RT-qPCR) utilizada en la clonación molecular y que permite el análisis de la expresión génica mediante la cuantificación del RNA mensajero (RNA_m). Estas técnicas y sus aplicaciones comenzaron a transformar la investigación en las ciencias de la vida y el diagnóstico clínico.

Las aplicaciones de la PCR en tiempo real han aumentado exponencialmente desde su descripción por Higuchi [5], por lo que en 2009 un equipo de investigación internacional publicó las directrices *MIQE* (Información mínima para la publicación de experimentos cuantitativos de PCR en tiempo real), donde consideraron importante eliminar la idea errónea de que la RT-PCR, qPCR y RT-qPCR eran sinónimos, idea concebida por las similitudes entre estas técnicas estrechamente relacionadas [6].

Propusieron una estandarización de abreviaturas:

- **PCR**: describe la reacción en cadena de la polimerasa convencional o punto final.
- **qPCR**: es referente a la reacción de PCR cuantitativa o de tiempo real, que utiliza química fluorescente.
- **RT-PCR**: es la reacción de transcripción reversa, técnica que a partir de ARN genera ADNc, acoplada a PCR de punto final.
- **RT-qPCR**: describe la reacción de PCR cuantitativa con transcripción reversa.

PCR vs qPCR

En la técnica de la PCR, el producto de amplificación sólo se resuelve en un gel de agarosa por electroforesis, y se tiñe para evaluar la presencia o ausencia de producto, mientras que la qPCR permite detectar y cuantificar la acumulación del producto amplificado (amplicón) a medida que avanza la reacción, es decir, en tiempo real. La detección es posible al incluir en la reacción una molécula fluorescente cuya señal aumenta proporcionalmente al

incremento del DNA de la reacción; esa detección hace que la qPCR además de cualitativa sea cuantitativa, rápida, sensible y de uso muy versátil.

Tanto la amplificación como la detección de ácidos nucleicos se encuentran entre las prioridades en la investigación biológica. Estos procedimientos son de mucha utilidad en ciencias básicas, en la biotecnología, la medicina, las ciencias forenses, de diagnóstico etc.; para estudios relevantes en el análisis de expresión génica, discriminación alélica, detección de organismos genéticamente modificados (OGM), detección de parásitos, enfermedades virales, cáncer; y otros como la determinación de paternidad e identificación de personas, en controles de calidad en la industria alimentaria etc. Para algunas aplicaciones, la detección cualitativa de ácidos nucleicos es suficiente, sin embargo, muchas aplicaciones exigen más información, es decir, un análisis cuantitativo, por lo que la qPCR es la técnica ideal para ello. Adicionalmente, se ha podido adaptar a muchas otras áreas del conocimiento [7].

qPCR

El objetivo de la qPCR es distinguir y cuantificar con precisión secuencias de ácidos nucleicos específicas en una muestra, ya que el progreso de la amplificación es monitoreado usando tecnología fluorescente. La rapidez con la que la señal fluorescente alcanza un umbral es indicativa de la cantidad inicial del fragmento de amplificación, lo que permite su cuantificación. En ocasiones, el producto se puede caracterizar sometándolo a temperaturas crecientes para determinar el punto en que se desnaturaliza la doble cadena, propiedad única del amplicón que depende de su longitud y composición de nucleótidos. Esta técnica requiere de equipo especializado, un termociclador de ciclaje de temperaturas, un sistema óptico para la excitación de moléculas y detección de la emisión fluorescente, una computadora y software; además del diseño de cebadores y sondas con las marcas fluorescentes, base de la cuantificación [6,8].

Flujo de trabajo para qPCR

Por su versatilidad en diferentes áreas, la técnica de qPCR no tiene un protocolo único de trabajo, pero sí se puede establecer un flujo de trabajo general, lo cual es básico para obtener resultados óptimos [6].



Diagrama de flujo para qPCR y/o RT-qPCR

1. Diseño experimental.

Aquí se establecen objetivos o preguntas a responder, decidir el mejor tipo de ensayo para el o los experimentos de interés, tomando en cuenta aspectos como el tipo de muestras a trabajar (cultivo, tejido, células, etc.), si son abundantes o no, si se trabaja DNA o RNA y el tipo de química fluorescente según el equipo con que se cuente (Rotor Gen, LightCycler, ABi Prism, CFX96, QTOWER, QUANTSTUDIO) [6,7,8].

Hay dos tipos de ensayos que se pueden realizar: el *singleplex* y *multiplex*. El primero es un ensayo diseñado para amplificar y analizar una sola secuencia

genética con un solo fluorocromo; mientras que, en el ensayo *multiplex*, el principal desafío es la extracción de la máxima información de una sola muestra mediante la amplificación simultánea de varios genes de interés (GOI) en un mismo tubo, y por consiguiente el análisis simultáneo, de actualmente hasta cinco diferentes fluorocromos (según el equipo). Las ventajas y desventajas de cada una son presentadas en la Figura 1 [9,10,11].

Otro punto importante en la qPCR, es el diseño de los cebadores (oligonucleótidos que flanquean la región del amplicón), los cuales deben cumplir ciertas características (Figura 2); así como las moléculas fluorescentes o fluorocromos.

Tipo de reacción	Ventajas	Desventajas
Singleplex	Fácil diseño, uso en casi todos los termocicladores para tiempo real, se obtiene curva Melt, es de bajo costo. Se utiliza en ensayo de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP), diagnóstico y expresión genética asociados a enfermedades como cáncer etc.	uso de mayor cantidad de muestra, requiere mas tiempo según la cantidad de amplificaciones de genes de interés. Puede haber falsos negativos mayor riesgo de contaminación de muestras.
Multiplex	Requiere poca muestra, se analizan varios genes en un mismo tubo , por lo que puede reducir falsos negativos y contaminación de muestra; se obtiene mayor información en menos tiempo.	Son de muy alto costo, requiere equipo más especializado (más canales), un riguroso diseño de sondas, su planeación no es nada trivial.

Figura 1. Tipos de reacciones para qPCR.

Longitud de cebadores	8 a 30 bases
Contenido de GC	Ideal 40-60%
Temperatura de Melting	55° a 60°C
Extremo 3'	Con 1-2 G o C para > estabilidad
Su concentración	150-200nM
Producto	150 a 200pb
Evitar estructuras secundarias y secuencias repetitivas o palindrómicas	

Figura 2. Características para el diseño de cebadores.

Adicionalmente, existen varios tipos de fluorocromos: a) Intercalantes, b) de hidrólisis y c) de hibridación; los cuales difieren en su mecanismo de acción. A continuación se enlistan algunos ejemplos.

a) *Intercalantes*. El SYBR Green es una de las moléculas intercalantes más utilizadas (Figura 3). Al unirse al DNA de doble cadena (DNAdc), emite 1000 veces más fluorescencia que estando libre en

solución, por lo que se utiliza en ensayos de *singleplex*; sólo requiere un par de cebadores y se puede realizar un análisis de curva de desnaturalización (curva de Melt), sin embargo, es inespecífica ya que se une a todo el DNAdc [10,11,12].

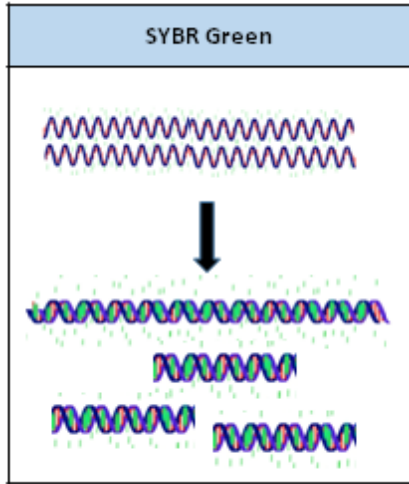


Figura 3. SYBR Green.

5'-3', hidroliza el extremo 5' de la sonda liberando al reportero que emite entonces la fluorescencia, que es captada por el detector [12,13]. Es altamente específica, ofrece más precisión que el SYBR Green, se puede usar en singleplex y multiplex, es acoplable a casi todos los equipos de tiempo real, y también requiere de cebadores pero el diseño de la sonda es crítico cuando se trabaja en multiplex, y no se obtiene curva de desnaturalización (curva de Melt).

b) *Hidrólisis*. TaqMan es un sistema de sonda de hidrólisis (figura 4), que es específica para el gen de interés (GOI), -de aproximadamente 20 bases-, que consta de un reportero fluorescente en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitada, y un apagador en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia del reportero. Durante la amplificación, la sonda se une al templado dentro de la secuencia del GOI, y la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*), con actividad exonucleasa

c) *Hibridación*. Las sondas de hibridación como *Molecular Beacons*, *Scorpions primer*, *sondas FRET*, *Hybeacons*, *Light up* y *Eclipse* (Figura 4); tienen diseños y formas estructurales diferentes, funcionan como sonda y/o cebador con secuencia específica para el DNA blanco y forman parte del amplicón. En general se basan en el principio de FRET (Flouescence Resonance Energy Transfer), es decir, la transferencia de energía entre dos fluoróforos, un donador (reportero, R) y un aceptor (apagador, Q), los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y apagador están próximos, este último absorbe la fluorescencia del primero y, al separarse el reportero, este emite la fluorescencia que es registrada por el fotodetector [5,12,13]. Su planeación no es nada trivial y de ella depende el resultado final.

Molecular Beacons	Scorpions	Amplifluor
De hibridación	De hidrólisis (TaqMan)	Eclipse

Figura 4. Sondas fluorescentes.

2. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra depende del material que se trabaja, DNA o RNA, para su extracción se pueden utilizar métodos convencionales, uso de soluciones de lisis (TRIzol etc.), o los "kits" comerciales que garantizan ser específicos y con una excelente optimización de extracción [6, 8,11].

3. Transcripción reversa (RT-qPCR)

El siguiente paso en el flujo de trabajo ocurre sólo si nuestro material de inicio es RNA, entonces se realiza la transcripción reversa (RT) del RNAm para la síntesis de DNA complementario (cDNA), que se utilizará para el siguiente paso en el flujo de trabajo que es la qPCR. Todo este proceso de RT-qPCR se puede realizar en un solo paso o en dos (Figura 5).

Protocolo 1: RT-qPCR de dos pasos**Paso 1.**

RT (transcripción reversa)

- 1.- Extracción de RNA total por el método orgánico de Trizol (Invitrogen 15596-018), según hoja técnica a 3 cultivos confluentes de líneas celulares: MCF-10, MCF-7 y MDA-MB-231.
- 2.- Cuantificación de RNA por espectrofotometría (absorbancia 280/260nm, con valores mayor a 1.8 se considera RNA optimo) y visualización de calidad por electroforesis.
- 3.- Reacción de transcripción reversa, utilizando la enzima M-MLV (reverse transcriptase, Invitrogen 28025-013) o Kit para RT.

Preparar 2 mezclas de reacción A y B

Mezcla de reacción A

Reactivo	Vol (µL)	Concentración final
H ₂ O (DEPC)	1.7	
Mix dNTP's 10mM	1	10nM
Random Primer+Oligo (dt)20	1.3	200ng 10ng
Volumen final	4	-

Mezcla de reacción B

Reactivo	Vol (µL)	Concentración final
Buffer First Strand 5X	4	[5X]
DTT 0.1M	2	1.2 µM
Volumen final	6	-

- 4.- Agregar 8µl de RNA (1µg) de las líneas celulares: MCF-10, MCF-7, MDA-MB-231 y Control solo agua (DEPC), un tubo por muestra.
 - Agregarles 4µl de la **mezcla de reacción A**, a cada tubo y colocar en el termociclador
 - Programar:
 - 65°C por 5min. y enfriar a 4°C por 2 min.
 - Agregar 6µl de la **mezcla de reacción B** a cada tubo y mezclar
 - 37°C por 2 min.
 - Agregar 2µl de la enzima M-MLV RT [0.25X(100U)], punta por tubo
 - 25°C por 10 min.
 - 37°C por 50 min.
 - 70°C por 15 min. para inactivar la enzima, volumen final de reacción 20µl
 - Agregar a cada tubo 52µl de agua, para tener VF de 72µl de cDNA
 - Etiquetar y almacenar a -20°C el cDNA o seguir con la qPCR
 - Se usa 1µl de reacción (rxn) de RT (diluida son 4.6µl) para cada rxn de qPCR
 - Se corre un PCR para ver calidad y amplificación del cDNA a la vez del funcionamiento de los primers a usar

Paso 2.

qPCR (SYBR Green, Master Mix Invitrogen 11760)

- 1.- Etiquetar 3 tubos, uno para cada par de primers para los 3 genes: **Actina** (RG), **ATP2A2** y **ATP2A3** (GOI). Para 9.2 muestras por gen:
- 2.- Preparar una mezcla de reacción como se especifica en la siguiente tabla:

Reactivo	P/tubo (µl)	Actina (µl)	ATP2A2 (µl)	ATP2A3 (µl)
Mix 2X	5	46	46	46
Primer forward 10mM	0.2	9.2	9.2	9.2
Primer Reverse 10mM	0.2	9.2	9.2	9.2
cDNA	4.6	****	****	****
Volumen final	10	64.4	64.4	64.4

- Acomodar los tubos en la placa fría, no etiquetar, uso de guantes y pinzas para no tocar pared de los tubos.
- Pipetear por triplicado 4.6µl de cada muestra para cada gen, y adicionar 5.4µl de la mezcla de reacción para cada muestra según corresponda el gen y cerrar los tubos.
- Configurar el termociclador (Rotor Gen para tubos de 0.1ml).
- Programar:
 - Configuración a dos pasos, (la enzima del kit lo permite).
 - Marcar:
 - o Optimización de la ganancia antes de la primera adquisición.
 - o 95°C por 10 min.
 - o Ciclos: 40
 - o 95°C 10 seg
 - o 60°C 45 seg, puede ser entre 45 a 60 seg
 - o Melt: 50°C a 99°C
- Colocar las muestras en el rotor y dejar correr el ensayo de qPCR.

Laboratorio Biología Molecular (Dr. Angel Zarain)

Protocolo 2. RT-qPCR de un paso**Paso 1.**

Extracción y preparación de reactivos

- 1.- Extracción de RNA total: a) Método orgánico de Trizol (Invitrogen 15596-018), b) Kit de extracción manual (magnetic Viral RNA Extracción Kit), o c) Método automatizado (Perkin Elmer Chemagic™ 360 y Abbott m2000sp).
- 2.- Cuantificación de RNA (absorbancia 280/260nm, con valor mayor a 1.8 se considera RNA óptimo).
- 3.- RT-qPCR. Dependiendo del kit se utilizan, por muestra, las siguientes cantidades para las mezclas de reacción:

Enzima SuperScript III Platinum

Mezcla de reacción

Reactivo	Vol. (µL)	Concentración final
H ₂ O (RNAse free)	2.1	-
2x Reaction Mix	12.5	-
MgSO ₄ (50 mM)	0.4	20 mM
Primer RdRp_SARSr_F2	1.5	15 µM
Primer RdRp_SARSr_R1	1.5	20 µM
Probe RdRp_SARSr_P2	0.5	5 µM
Probe RdRp_SARSr_P1	0.5	5 µM
SSIII Taq Enzyme Mix	1	
RNA	5	5 µM

Enzima AgPath-ID One-Step RT-PCR

Mezcla de reacción

Reactivo	Vol. (µL)	Concentración final
H ₂ O (Nuclease free)	3.5	
2x RT-PCR Buffer	12.5	-
Primer RdRp_SARSr_F2	1.0	15 µM
Primer RdRp_SARSr_R1	1.0	20 µM
Probe RdRp_SARSr_P2	0.5	5 µM
Probe RdRp_SARSr_P1	0.5	5 µM
25x RT-PCR Enzyme Mix	1	-
RNA	5	-

Se agrega por tubo o pozo 5µL de la muestra más 20µL de mezcla de reacción

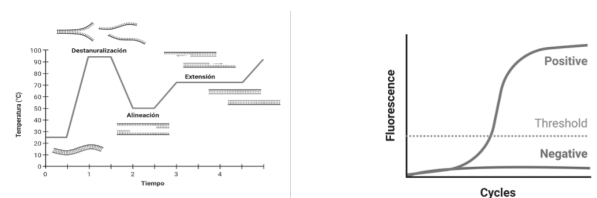
Paso 2.:

RT-qPCR:

- 1.- Se programa la termo-ciclación en el equipo, con una duración aproximada de 60 a 90 minutos.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Espera o hold 1	55	10 min
Espera o hold 2	94	3 min
45x	94	15 s
	58	30 s

- 2.- Realizar la lectura de resultados. La metodología solo proporciona resultados cualitativos, por lo que una curva de amplificación hasta con un Ct ≤36.4 es suficiente para interpretar un resultado como detectado.



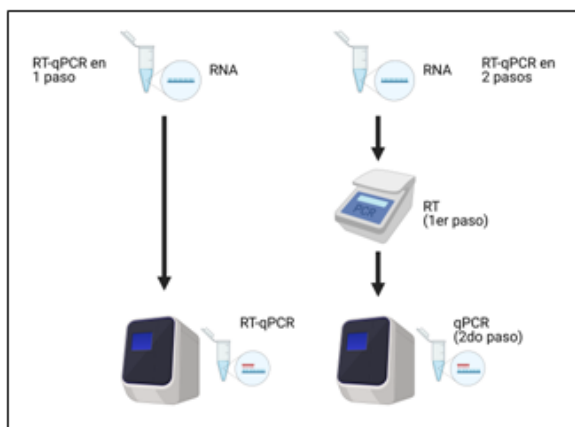


Figura 5. RT-qPCR de uno y dos pasos.

En el primer paso del Protocolo 1, se explica el proceso y requerimientos de la RT para la obtención del cDNA, y en el segundo paso, la parte correspondiente a la qPCR.

En el Protocolo 2 se describe la RT-qPCR de un solo paso; en esta, los reactivos para la reacción de RT van junto con los de la qPCR, descrita con TaqMan, se programa un tiempo de 10 minutos a 55°C previo al ciclaje de la qPCR para la reacción de RT y se continúa con el termo-ciclaje de la qPCR.

4. qPCR

Para la qPCR se utiliza DNA (genómico, cDNA, de plásmido etc.), el tipo de extracción determinará la calidad de este y, por ende, el resultado cuantitativo en conjunto con el diseño de las sondas fluorescentes y los cebadores. Los reactivos para la RT-qPCR y qPCR están disponibles en una gran variedad de "kits" que se ajustan a todos los requerimientos. En la reacción, durante la amplificación, se tienen por lo general dos pasos: 1) la desnaturalización a 94°C y 2) la alineación de sondas y cebadores junto con la extensión, a una temperatura de 60°C, punto en el cual se cuantifica la fluorescencia (toma de la adquisición). Los tiempos pueden variar según la Taq polimerasa del kit y otros factores operacionales.

La RT-qPCR, es muy utilizada para el análisis de la expresión génica. Un ejemplo se presenta en el Protocolo 1: un ensayo de RT-qPCR de dos pasos con SYBR Green, diseñado para medir la expresión relativa basal de los 3 genes ATP2A2 (SERCA2) y ATP2A3 (SERCA3) como GOI y ACTB (β -actina) como gen de referencia (RG) en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, y en MCF-10A línea celular no neoplásica. Se utilizó RNA total de 3 cultivos diferentes de cada línea, (9 muestras), se

realizó la RT, el cDNA se usó para el ensayo de qPCR, cada muestra por triplicado (27 tubos por gen), y se realizaron 2 ensayos. En el primero se cuantificó la expresión de ACTB y ATP2A2 y en el segundo, ACTB y ATP2A3, por lo que cada corrida fue de 54 muestras, usando un Equipo Rotor Gen (sistema de centrifuga y LED). Es altamente recomendable incluir la cuantificación del gen de referencia en cada corrida, independientemente que se utilicen las mismas muestras para la amplificación, ya que las condiciones de la reacción pueden variar ligeramente entre una corrida y otra debido tanto a variaciones en el funcionamiento de los componentes de la reacción, como al factor humano (por ejemplo, error de pipeteo).

5. Análisis de resultados

En el análisis de datos, la detección de la qPCR da como resultado una curva de amplificación (Figura 6):

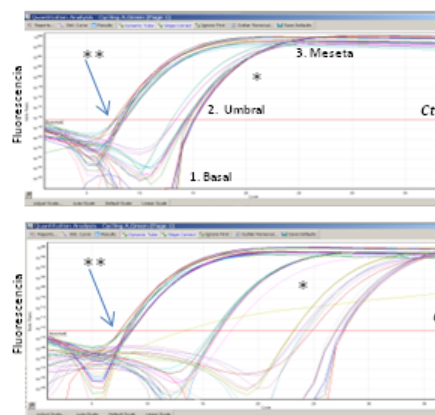


Figura 6. Curvas de amplificación. (Arriba) SERCA2 y (Abajo) SERCA3; ambas con β -actina (**); fluorescencia contra ciclos de amplificación (Ct).

La gráfica muestra 3 fases importantes: 1) la basal, que es todo el ruido de fondo, no hay aún detección de fluorescencia (*background*); 2) la logarítmica, donde el producto de amplificación se duplica cada ciclo (2^n), se acumula el producto hasta que en determinado ciclo se detecta la señal de aumento por arriba de la basal, punto denotado como Ct o umbral (*threshold*), valor determinado por la cantidad inicial de molde. Existe una relación inversamente proporcional entre la cantidad inicial de molde y el valor del Ct, a mayor cantidad inicial de molde, el Ct es menor, y viceversa; y 3) la fase estacionaria o meseta, donde la fluorescencia ya no aumenta, debido al agotamiento de componentes o decaída de la actividad de la Taq polimerasa. El Ct de cada muestra permite el análisis cuantitativo ya sea absoluto o relativo.

La cuantificación absoluta determina el número exacto de moléculas de DNA o RNA, ya sea nanogramos por microlitro, el número de copias o equivalentes genéticos presentes en la muestra (empleada en la detección de cargas virales, agentes patógenos o terapia génica; entre otros). Se utilizan diluciones seriadas como estándares de concentración conocida o factor de dilución, por triplicado, para generar una curva de amplificación. El promedio de Ct obtenidos se grafica contra el logaritmo de la concentración de la fluorescencia y se obtiene la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson (r) o de determinación (R^2). Si la amplificación es "ideal" se duplica en cada ciclo, el espacio entre las curvas de fluorescencia se determina como 2^n (n =número de ciclos). En las Figuras 7a y b se describe una curva de amplificación tipo, con su análisis de regresión lineal, lo que se traduce en que al final de cada ciclo, el número de copias del amplicón aumentó 95.4% del número inicial, lo que sería indicativo de la Eficiencia (Eficiencia (E) = $10^{(1/\text{pendiente})} - 1$). Una eficiencia cercana a 100% es el mejor indicador de un ensayo robusto y reproducible, por lo que en la práctica se debe conseguir >90 y $<105\%$.

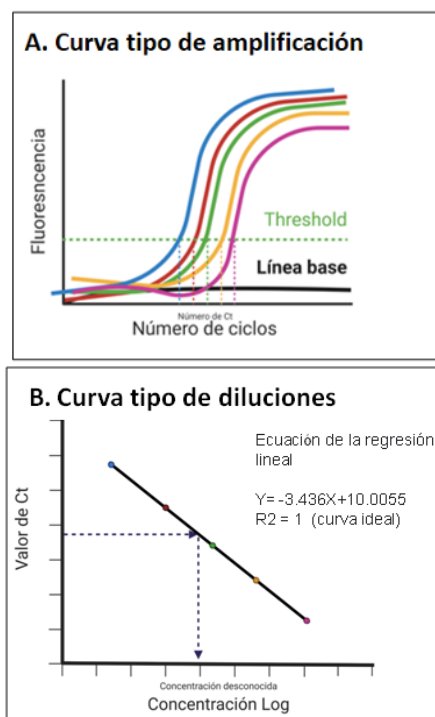


Figura 7. Análisis teórico de la serie de amplificación de diluciones para la curva estándar.

Las eficiencias bajas pueden ser por mal diseño de cebadores o algún inhibidor de la reacción, mientras que las eficiencias mayores a 100% se asocian

frecuentemente a error de pipeteo [6,9-11]. Finalmente, esta curva de calibración permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras problema y obtener su concentración.

La cuantificación relativa es un método comparativo que permite calcular la relación entre el RG y el GOI, la precisión depende del RG que debe permanecer sin cambios para evitar resultados erróneos. Para la cuantificación de la expresión génica se han utilizado β -actina, gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH), RNA ribosómico 18S (RNAr) u otros RNA como RG. El modelo de Pfaffl es un método utilizado para expresar la relación entre RG y GOI y se llama delta delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) [14,15].

Siguiendo con el análisis de los resultados del protocolo 1, además de la curva de amplificación y datos de Ct de cada ensayo (*ATP2A2* y *ATP2A3* con *ACTB* cada uno), obtenemos una curva de temperaturas, T_m o curva de Melt. En las Figuras 8a y b se observa una gráfica con dos picos, el primero de ambas gráficas corresponde al producto de β -actina y el segundo a *SERCA2* y *SERCA3* respectivamente.

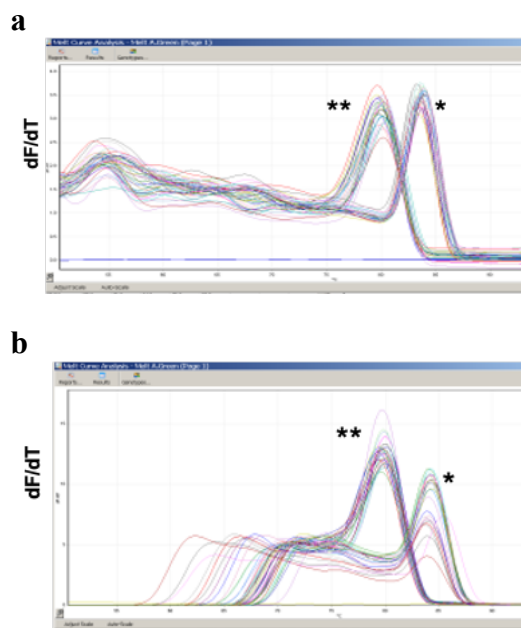


Figura 8. Curvas Melt (T_m).

La curva de T_m es la relación entre fluorescencia y temperatura, conforme aumenta la temperatura la señal decrece, debido a la desnaturalización de los productos, es la derivada negativa de la curva de desnaturalización del DNA, que muestra la tasa de cambio de la señal fluorescente, F , con respecto a la temperatura, T , (dF/dT). La temperatura de desnaturalización depende de la longitud y secuencia

de DNA (contenido de G:C), así como de la solución tampón. El pico de la gráfica representa la temperatura a la que ~ 50% del DNA esta en forma monocatenaria.

La curva se programa para estimar la especificidad del amplicón, después de los ciclos de amplificación (desde 55° a 95°C), se realiza frecuentemente con moléculas intercalantes como el SYBR Green y Molecular Beacons; con las sondas TaqMan no se puede utilizar, su señal depende de la hidrólisis. El área bajo el pico es proporcional a la cantidad del

producto, por lo que se puede calcular la cantidad del producto si se tienen estándares de concentración [6,11,16].

Los valores de Ct obtenidos de la corrida experimental de cada ensayo, se capturaron en una hoja de cálculo, se calculó su logaritmo y se analizaron mediante el método de Pfaffl de $\Delta\Delta Ct$ [16], utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión} \frac{\text{Serca}}{\text{ACTB}} = \frac{(\text{eficiencia SERCA})^{\Delta Ct \text{ SERCA (Control-Tratamiento)}}}{(\text{eficiencia ACTB})^{\Delta Ct \text{ ACTB (Control-Tratamiento)}}$$

con los datos de Ct con $SD \leq 0.5$ entre triplicados de 3 diferentes muestras (no se muestra). En la Figura 9, aparecen la tabla de resultados y sus respectivas gráficas. El valor del ciclo umbral es diferente para cada gen, apareciendo más temprano β -actina, la expresión del gen de *ATP2A2* en las tres líneas es muy parecido (alrededor de Ct14), mientras que la expresión de *ATP2A3* es diferente en las tres líneas, en MCF-7 con mayor expresión (Ct 16.4), después

MDA-MB-231 (Ct 22.8) y muy reducida en MCF-10A (Ct 27.2). La expresión relativa de *ATP2A2* normalizada con β -actina fue muy cercana, sin embargo la expresión normalizada de *ATP2A3* es diferente, siendo muy baja en MCF-10A y MDA-MB-231. La Línea MCF-7 tiene el mismo valor relativo de expresión para los dos genes, ya que esta fue utilizada como referencia para normalizar.

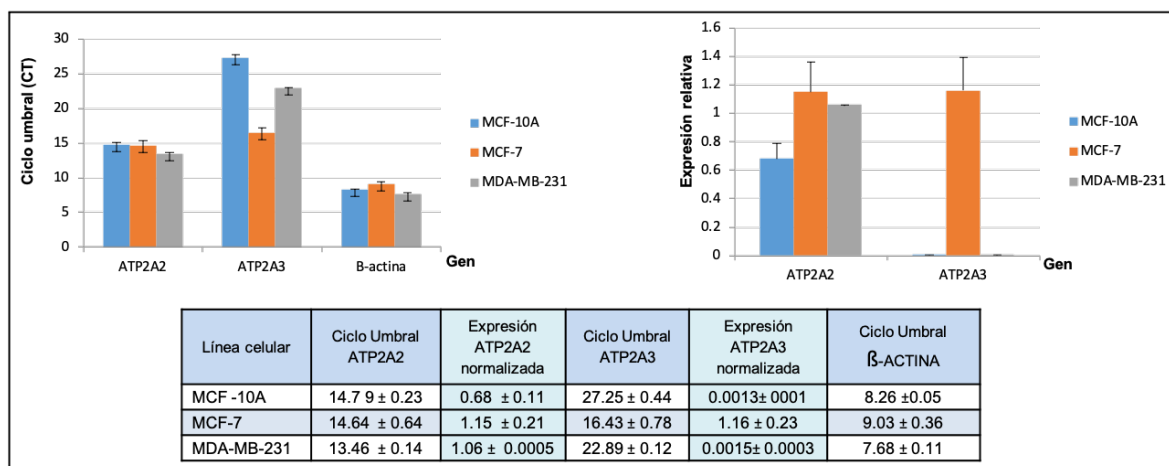


Figura 9. Resultados de expresión obtenidos del Ct de la curva de amplificación.

COVID-19, la nueva frontera para el ensayo de PCR en tiempo real

Con la reciente pandemia del virus SARS-CoV-2 que causa la enfermedad COVID-19, el uso de RT-qPCR está en el primer plano de la investigación. La técnica permite un cribado de pacientes de alto rendimiento, lo cual es fundamental durante una emergencia de salud pública. Después de la secuenciación del genoma del SARS-CoV-2, el diseño de los protocolos fue posible a la par con el diseño de

los cebadores y sondas específicas para detección del virus. El grupo Drosten, con sede en Berlín, diseñó un ensayo que implica el aislamiento de RNA y el posterior RT-qPCR de un solo paso para detectar el gen RdRp del SARS-CoV-2 utilizando sondas fluorescentes [17]. Este ensayo se puede automatizar, lo que permite una detección rápida con alta sensibilidad y selectividad sobre el coronavirus y similares (SARS). En el protocolo 2, antes mencionado, se describe otro ejemplo del uso de qPCR, para el diagnóstico de COVID19. El flujo de

trabajo para la prueba diagnóstica para COVID-19, se muestra en la Figura 10.

Prueba diagnóstica para COVID-19 mediante RT-PCR

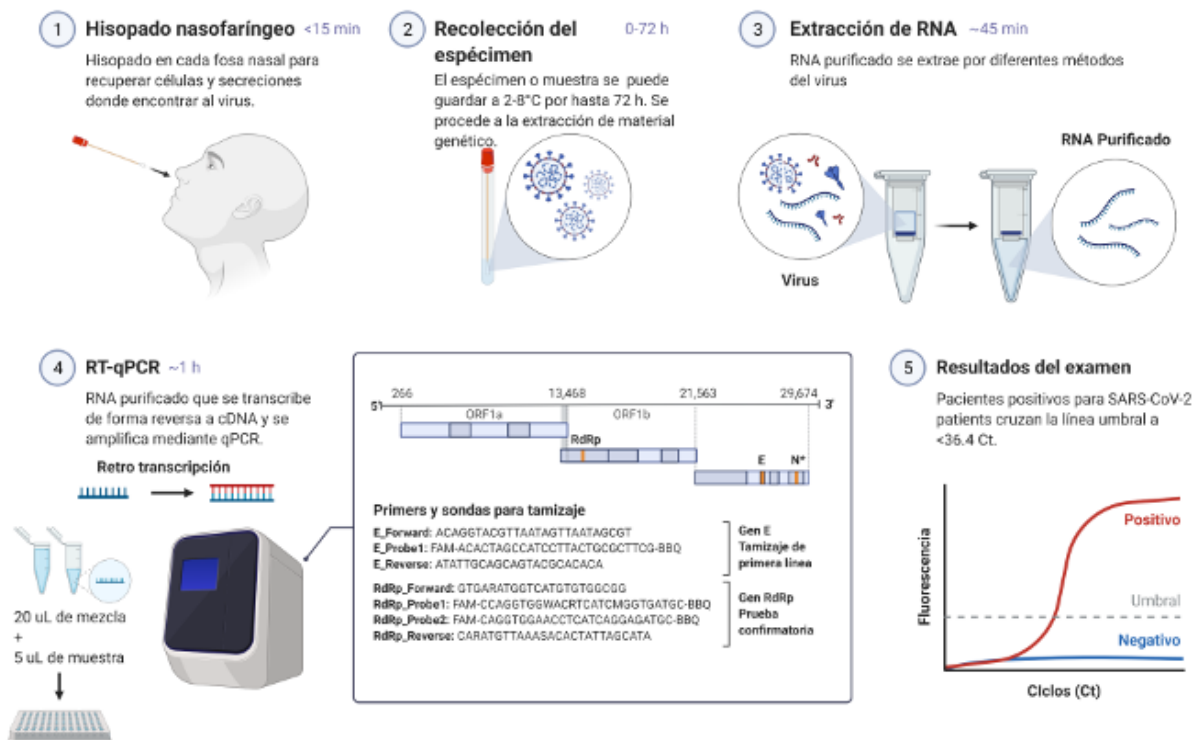


Figura 10. Flujo de trabajo de la prueba diagnóstica para COVID-19 con RT-qPCR

La confirmación de la infección por SARS-CoV-2 se basa en la detección de secuencias virales específicas mediante la RT-qPCR, con cebadores para un fragmento de una región conservada, empleando sondas TaqMan que se encuentran marcadas con 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5', las cuales son específicas para la amplificación de un fragmento del gen RdRp, de 100 pares de bases. Dicha secuencia es específica del SARS-CoV-2 de Wuhan.

Resultados

En la Figura 11, Se presentan tres curvas de amplificación, dos positivas y una negativa, el umbral que se reporta de la curva con Ct 25.32 (verde), corresponde al control positivo de la reacción, muestra conocida, mientras que la curva con Ct 29.3 (negro) corresponde a la amplificación del paciente. Ambos amplificaron el fragmento del gen *RdRp* específico para la detección del SARS-CoV-2, las 3 pruebas se realizaron en singleplex y con sondas TaqMan (marcadas con FAM). En este caso es una prueba

sencilla de carácter cualitativa, que se rige por una curva estándar establecida para esta metodología en la que se establece que con un $Ct \leq 36.4$ es suficiente para interpretar un resultado positivo mientras un $Ct > 36.4$ se considera negativo [18]. En este caso es positivo.

La interpretación clínica con el uso RT-qPCR, es que se puede detectar RNA viral desde unos días antes de la aparición de los síntomas, aumentando la probabilidad al 7º día y disminuyendo a partir de la segunda semana. Por lo tanto, en los primeros días del periodo de incubación y tras la desaparición de los síntomas, la carga viral es baja y puede no ser detectada por la RT-qPCR ya que se encuentra por debajo del umbral de detección. Las variantes en este ensayo, pueden provenir del manejo, transporte o almacenamiento inadecuado de la muestra durante la fase pre-analítica, extracción incorrecta del material genético y/o la falta de actualización de la curva estándar con los nuevos lotes utilizados.

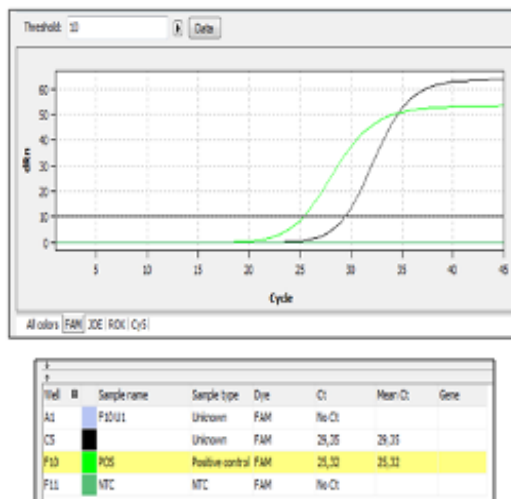


Figura 11. Gráfica de amplificación con la tabla de resultados de Ct de una muestra desconocida.

6. Solución de Problemas

La solución de problemas es el último paso, donde con frecuencia se retorna al primero, aquí se van ajustando los errores o contratiempos de los ensayos, desde la planeación, la química, el método de obtención de muestra, el tipo de qPCR, los materiales, reactivos, la forma de trabajo.

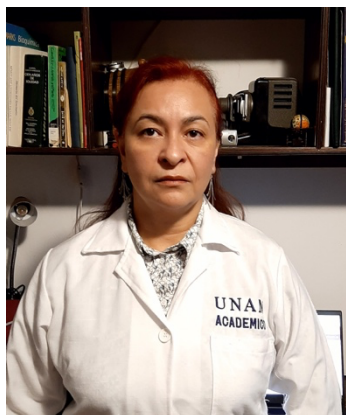
Esta claro que, además de ser una técnica poderosa en laboratorios de investigación de las ciencias de la vida, es un fuerte competidor para el diagnóstico rápido en emergencias de salud pública, y su desarrollo sigue a la vanguardia, como lo demuestra la técnica de la PCR digital (dPCR).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Eduardo Izquierdo Torres por su colaboración en la revisión así como sus sugerencias al texto.

Referencias

- Mullis, K.B. (1990) The Unusual Origin of Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* 262, 56-61.
- Chien, A., Edgar, D.B., AND. Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*. *J. of Bacteriology.* 127, 3, 1550-1557.
- Higuchi, R., Fockler, C. Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnol.*, 11, 1026-1030.
- Baltimore, D. (1970) Viral RNA-Dependent DNA Polymerase. *Nature.* 226.
- Valasek, M.A. and Repa, J.J. (2005) The Power of Real-Time PCR. *Adv. Physiol Educ.* 29, 151-159.
- Abdel-Nour, A.M. and Pfaffl, M.W. (2020) MIQE & qPCR: How to Apply the MIQE Guidelines a Visual Interactive and Practical qPCR guide. 4th. edition.
- Deepak, S.A., Kottapalli, K.R., Oros, G., Rangappa, K.s., Iwahashi, H., Masuo, Y. and Agrawal, G.K. (2007) Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curren Genomics*, 8, 234-351.
- Nolan, T., Huggett J., Sanchez, E. Good Practice Guide for the Application of Quantitative PCR (qPCR), LGC (2013).
- BIORAD (2006). Real-Time PCR Applications Guide. 100p.
- Life Technologies. Real Time PCR Handbook. (2014). 68pag.
- Dorak, M.T. (2006). Real-Time PCR. Taylor & Francis Group. 329p.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M.J. and Solera, J. (2015) Real-Time PCR Detection Chemistry. *Clinica Chimica Acta.* 439, 231-250.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. and Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Proc.Natl.Acad. Sci.*, 88:7276-7280.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. and Zumla, A. (2005). Real-Time RT-PCR normalization; Strategies and Considerations. *Genes and Immunity*, 6, 279-284.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29, 9:45.
- Wilhelm, J., and Pingoud, A. (2003) Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 4, 1120 -1128.
- Corman, V., Bleicker, T., Brünink, S. and Drosten, C. (2020) Diagnostic Detection of 2019-nCoV by Real-Time RT-PCR. Berlin, Jan 17th, 2020.



**BIÓL. GABRIELA RODRÍGUEZ
RODRÍGUEZ**

ID ORCID: 0000-0001-9897-2593

Técnico Académico en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Egresada de la Facultad de Ciencias, colaboró como ayudante de investigador en el área de

neurociencias en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM con la Dra. Ana María López Colomé, realizando cultivos primarios de neuronas y epitelio pigmentado, para el estudio de los receptores a glutamato. Tiene 19 años colaborando en los proyectos del Dr. Ángel Zaráin Herzberg en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina, con cultivos primarios de cardiomiocitos de rata para el estudio de la expresión de la bomba de calcio de SERCA2 y de la Calsecuestrina en el corazón; así como cultivos de diferentes líneas celulares.

Actualmente trabaja con líneas de cáncer mama, gástrico y colon para el estudio de la expresión y regulación transcripcional y epigenética de los genes de SERCA2 y SERCA3.

Parte de las actividades que desarrolla es el instruir y colaborar con los estudiantes en las diferentes técnicas del laboratorio para el cultivo celular, la extracción de material genético, la técnica de PCR Tiempo Real, la técnica de Western Blot, los protocolos de expresión génica, entre otros.

Es coautora de 13 publicaciones indexadas.