

PCR EN TIEMPO REAL

Penélope Aguilera¹, Martha Ruiz Tachiquín²,
Martha Graciela Rocha Munive⁴, Benjamín Pineda Olvera³
y María Elena Chánez Cárdenas¹

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction* por sus siglas en inglés) en tiempo real es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80, que permite detectar ADN a partir de pequeñas

- ¹ Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan México. penelope.aguilera@gmail.com.
- ² Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Instituto Nacional del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330. Col. Doctores, C.P. 06720, Cuauhtémoc México. mer-tachiquin@yahoo.com.mx.
- ³ Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan México. benpio76@hotmail.com.
- ⁴ Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental, Instituto Nacional de Ecología. Av. San Rafael Atlixco # 186. UAM Izta-palapa Edificio W, Planta baja. Col. Vicentina. C.P. 09349. México, D. F. mrocha@ine.gob.mx.

cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces (Mullis 1990) (véase capítulo de PCR).

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10^7 equivalentes genómicos de la secuencia blanco) (Brechtbuehl *et al.* 2001) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Los ensayos de la PCR en tiempo real son entre 10,000 y 100,000 veces más sensibles que las pruebas de protección por ARNasa,¹ 1,000 veces más sensibles que la hibridación por *Dot blot*² y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN (Wong y Medrano 2005). Además, se ha reportado que para la PCR convencional (punto final), la cantidad final de producto amplificado puede verse afectada por inhibidores, saturación de la reacción o bien por falta de una estandarización adecuada. Entonces, los resultados de la PCR punto final pueden no tener relación entre la cantidad de ácidos nucleicos que había al inicio de la reacción y la concentración final del producto amplificado.

Debido a la enorme proyección que tienen los ensayos de la PCR en tiempo real como herramienta útil y extremadamente sensible en investigación clínica, industrial, biológica y biomédica, en este capítulo se revisan las bases teóricas de esta técnica, sus aplicaciones, el análisis de resultados y se da un ejemplo específico para realizar un ensayo de cuantificación.

¹ Las pruebas de protección de la ARNasa se emplean para detectar y cuantificar moléculas de ARN, así como para analizar la estructura de ARNm. Se basan en la hibridación de una sonda de ARN en solución (antisentido) marcada con radioactividad, contra el conjunto de moléculas de ARN que se requieren analizar. Se hibridizan y después se separan en un gel de poliacrilamida desnaturalizante, en el que se observa el ARN "protegido". La ARNasa destruye los segmentos de cadena sencilla y se mantienen los dobles. Con esta técnica se pueden identificar moléculas incluso si se encuentran en concentraciones muy bajas. Los resultados cuantitativos tomando en cuenta la cantidad original de ARN blanco empleada.

² Esta técnica permite identificar moléculas de ARN al aplicarlas como puntos en una membrana a través de succión con vacío, para su posterior hibridación con una sonda marcada.

BASES TEÓRICAS DE LA PCR EN TIEMPO REAL

Para la amplificación por PCR en tiempo real además de los reactivos que se emplean en la PCR punto final, es necesario emplear un fluoróforo. En algunos ensayos cuantitativos se requiere determinar el número de moléculas ARNm (ver más adelante), por lo que es necesario llevar a cabo una reacción de transcripción reversa (RT) del ARNm a ADNc antes de que se aplique la PCR en tiempo real. En este caso, el ensayo se conoce como *retrotranscripción o RT* acoplada a la PCR (RT-PCR), la que puede realizarse en uno o dos pasos. Finalmente, se realiza la amplificación (síntesis) del ADN o ADNc en un termociclador acoplado a un sistema óptico, que monitorea la señal de los fluoróforos usados para detectar el producto amplificado (ver más adelante sistemas de detección). Debido a que la fluorescencia de éstos aumenta conforme el producto se amplifica, se combinan los procesos de amplificación y detección en una sola etapa.

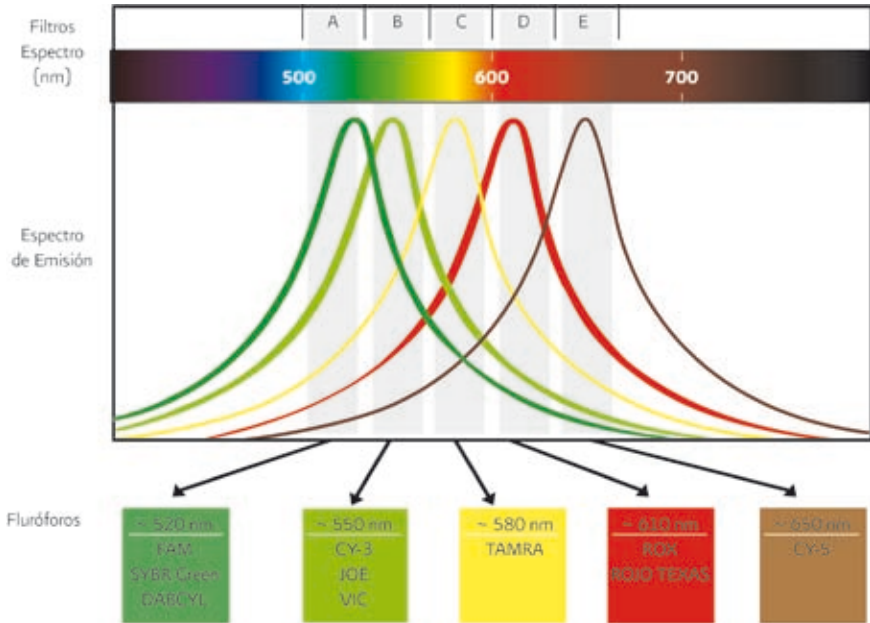
EQUIPOS PARA REALIZAR LA PCR EN TIEMPO REAL

Los equipos para llevar a cabo la PCR en tiempo real incluyen un termociclador y una unidad capaz de detectar señales fluorescentes (fluorómetro) para monitorear el progreso de la reacción de amplificación, así como un *Hardware* y un *Software* para la captura y el análisis de los datos, respectivamente.

El termociclador del equipo debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra (desnaturalización del ADN molde, alineamiento de los oligonucleótidos y síntesis). El sistema fluorométrico consiste en una fuente de energía para excitar a los fluoróforos (a una determinada longitud de onda de excitación) y un sistema de detección, que permita monitorear la señal emitida (a una longitud de onda de emisión) (Figura 1). La fuente de energía que proporciona la luz de excitación para los fluoróforos puede provenir de una lámpara (tungsteno), una resistencia (diodo emisor de luz) o un láser. Las diferentes longitudes de onda de emisión se detectan con dispositivos que incluyen filtros, multiplicadores y fotodetectores.

Entre los equipos que utilizan una lámpara como fuente de excitación, se encuentran los equipos ABI Prism 7000 o el modelo 7500 de Applied Biosystem, los modelos Mx4000 y Mx3000P de Stratagene y el modelo iCycler iQ de

Figura 1. Espectro de emisión de los fluoróforos comúnmente usados en la PCR en tiempo real. En la figura se observan los espectros de emisión de diversos fluoróforos a diferentes longitudes de onda. Las letras A a la E representan las longitudes de onda empleadas por diferentes filtros para detectar el grupo de fluoróforos listados en la parte inferior (Modificado de https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_077749.pdf).



Bio-Rad. Los equipos que utilizan una resistencia son el LightCycler de Roche, SmartCycler de Cepheid, Rotor-Gene de Corbett y el DNA Engine Opticon de MJ Research. El modelo 7900HT ABI Prism de Applied Biosystems utiliza láser (Wong y Medrano 2005).

Sistemas de detección usados en la PCR en tiempo real

Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: a) fluoróforos con afinidad por el ADN y b) sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (blanco).

a) Fluoróforos con afinidad por el ADN

Estos fluoróforos emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. Inicialmente, se utilizaba bromuro de etidio, pero su uso no es recomendable porque no discrimina de manera eficiente entre ADN de cadena doble o sencilla. Por otro lado, al ser un agente que se intercala en el ADN, se ha reportado que interfiere con la polimerización. También, existen otros como BEBO, YOYO-1 y TOTO-1 pero no son usados cotidianamente. El compuesto más utilizado es SYBR Green, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena. Mientras más ADN de doble cadena haya en el tubo de reacción, mayores serán la unión y la señal de fluorescencia del SYBR Green (Figura 2A). Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Sin embargo, presenta varias desventajas, ya que no es posible hacer reacciones múltiples o *multiplex* (en donde se amplifican varios genes en la misma reacción), además de que la señal emitida no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN. Por lo anterior, para un uso correcto del SYBR Green en la PCR cuantitativa es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva de disociación³ y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se debe sólo a la amplificación del blanco (Figura 2B). La estandarización para obtener un solo producto de amplificación, en algunos casos, consume mucho tiempo y reactivos (Lutfalla y Uze 2006).

b) Sondas específicas

Los sistemas de detección específicos para una secuencia de interés se pueden dividir en tres tipos: a) sondas de hidrólisis, b) sondas de hibridación y c) sondas de horquilla (Figura 3). Todas se basan en el principio FRET (*Flourescence Resonance Energy Transfer* por sus siglas en inglés), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o *quencher*), los cuales emiten fluores-

³ Procedimiento que se utiliza para verificar la presencia de un solo producto de amplificación, basado en la temperatura de disociación de dicho producto. En este ensayo al aumentar la temperatura, la señal de fluorescencia observada muestra un punto de inflexión donde el 50 % del producto se ha desnaturalizado. Al graficar la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura, se obtiene un pico que indica la temperatura de desnaturalización del producto. La presencia de más de un pico indica que hay más de un producto de amplificación.

Figura 2. Fluoróforos con afinidad por el ADN: SYBR Green. A) Mecanismo de incorporación del SYBR Green. Durante la alineación del iniciador, el SYBR Green se incorpora en la doble cadena. La señal de fluorescencia incrementa de manera proporcional a las moléculas de doble cadena producidas en la amplificación (modificado de <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>). B) y C) Ejemplo del uso de una curva de disociación para comprobar la especificidad del ensayo. En el ejemplo, se presenta la fluorescencia emitida en función de la temperatura cuando hay un solo producto (1, línea continua) o cuando hay dos productos amplificados (2, línea punteada). En 2c se grafica la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura, para el caso en que hay un solo producto de amplificación se observa un solo pico que indica la temperatura de desnaturalización del producto ($T_m=89^\circ\text{C}$), mientras que cuando hay dos productos se observan dos picos ($T_m=79^\circ\text{C}$ y $T_m=89^\circ\text{C}$) (Lutfalla y Uze, 2006).

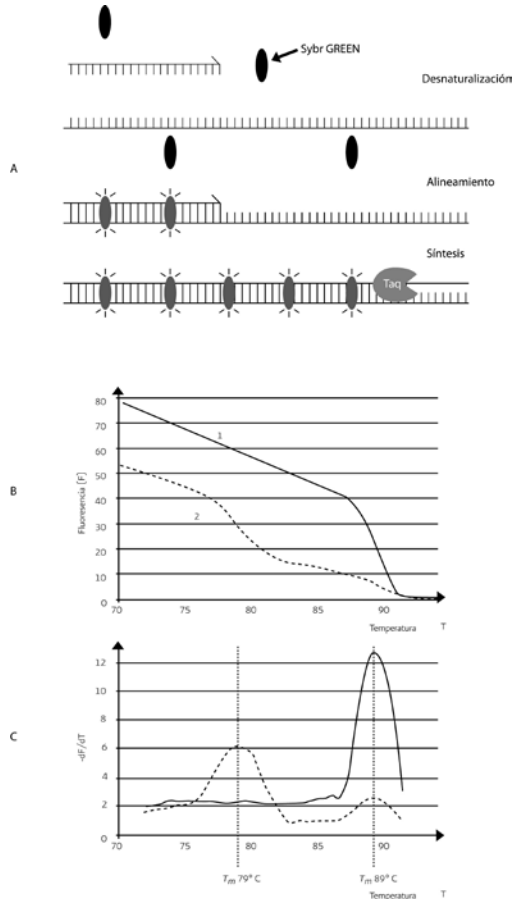
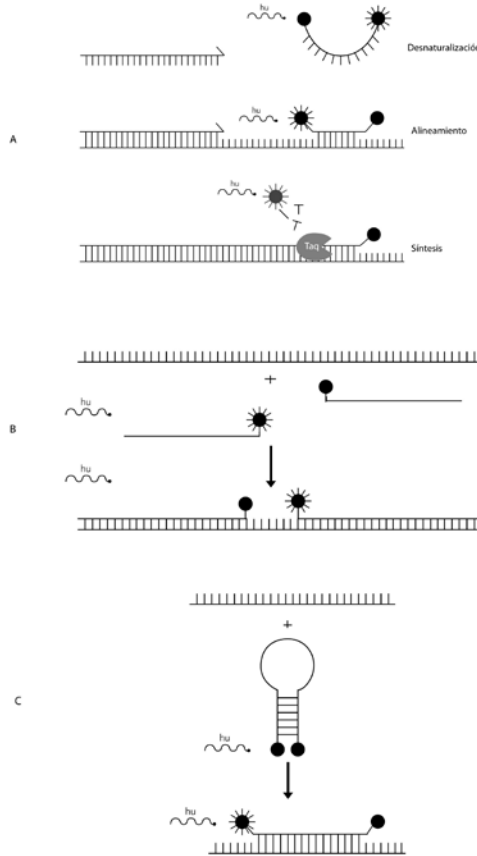


Figura 3. Sondas específicas. A) Sondas de hidrólisis. Representación gráfica de la fluorescencia emitida por las sondas Taqman®. Cuando el reportero en el extremo 5' y su apagador se encuentran en vecindad (10 nucleótidos) el equipo no detecta la señal emitida por el reportero. Sin embargo, cuando la ADN polimerasa progresa sobre la cadena, ésta desplaza y posteriormente hidroliza la sonda vía su actividad 5'→3' exonucleasa. Al separarse el apagador y el reportero se emite la señal de fluorescencia. B) Sondas de hibridación. Se observa el uso de dos sondas que hibridan al ADN en forma adyacente y donde uno de ellos se encuentra acoplado a un fluoróforo donador y el otro a un fluoróforo aceptor. Este sistema monitorea la fluorescencia emitida por el fluoróforo aceptor de manera opuesta al sistema usado en las sondas de hidrólisis. C) Sondas de horquilla. La hibridación de la sonda con el ADN permite que el fluoróforo se separe suficientemente del apagador de manera que permita la emisión del fluoróforo excitado cuya emisión será detectada por el equipo (modificado de <http://www.b2b.in-vitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>).



cencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando este par de moléculas se separa, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector (revisado en Valasek y Repa 2005, Kubista *et al.* 2006).

Sondas de hidrólisis

Entre las más utilizadas se encuentran las sondas *TaqMan*® que se conocen también como sondas 5' nucleasas (ya que utilizan la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa) (Figura 3A). En este sistema se utiliza una sonda, es decir, un oligonucleótido específico (~20 bases) para la secuencia del gen de interés marcado con dos fluoróforos, un reportero unido al extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. La longitud de la sonda es la distancia entre los dos fluoróforos, de manera que la fluorescencia del reportero está apagada por el fenómeno FRET. La actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa corta los nucleótidos de la sonda durante la amplificación, los fluoróforos se separan y se observa la señal de fluorescencia. Es decir, la hidrólisis de la sonda provoca un incremento en la señal del reportero y ésta aumenta proporcionalmente al incremento del amplicón. Algunos ejemplos de fluoróforos reporteros son FAM, VIC y NED, entre los apagadores se encuentran TAMRA, DABCYL y BHQ (Figura 1).

Sondas de hibridación

En este caso se utilizan dos sondas específicas que hibridan con la secuencia del ADN de interés (Figura 3B). Una de ellas está marcada con un donador y la otra con un aceptor. La señal del fluoróforo aceptor es monitoreada por el sistema de detección conforme se da la amplificación del ADN, así la cantidad de oligonucleótidos unidos será mayor por lo que se incrementará la intensidad de la fluorescencia. Este sistema sigue la señal del fluoróforo aceptor de forma opuesta a la sondas de hidrólisis, que siguen la señal del reportero o donador.

Sondas de horquilla

En estas sondas, un oligonucleótido marcado en su extremo 5' con un reportero y el 3' con un apagador, se encuentran formando una horquilla, estructura que los mantiene cercanos para poder llevar a cabo la transferencia de energía y mantener al reportero apagado (Figura 3C). Al unirse a la secuencia de interés, la horquilla se extiende, aumentando la distancia entre el apagador y el reportero, permitiendo detectar la fluorescencia de este último. Estas sondas de horquilla son altamente específicas. Existen varias que utilizan este principio como los *molecular beacons*, los *scorpions*, los *sunrise primers* así como los *LUX primers*.

PROTOCOLO

Este protocolo se utiliza para cuantificar el porcentaje de copias de transgen en maíz genéticamente modificado a partir del ADN genómico. Se emplean sondas Taqman® y se amplifica un gen endógeno de maíz y una región del promotor 35s, comúnmente usado en las construcciones genéticas insertadas en organismos genéticamente modificados (OGM).

Equipo

- PCR en tiempo real
- Regulador de voltaje con *no-break*
- Computadora con el programa de análisis instalado

Material

- Guantes de nitrilo libres de polvo
- Tubos o placas PCR de 200 µl de calidad óptica
- Puntas nuevas estériles de 10 y 100 µl
- Micropipetas de alta precisión de 20 µl y 200 µl
- Gradilla para tubos PCR
- Charola para hielo

Reactivos

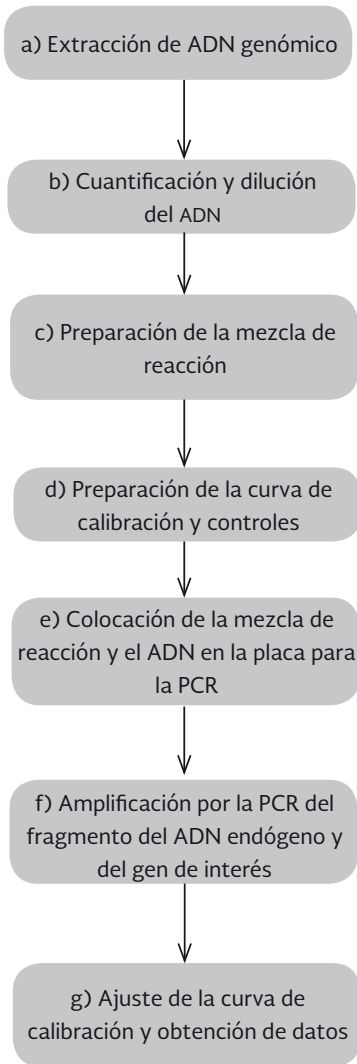
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- Agua grado biología molecular (ultrapura)
- Sonda TaqMan® e iniciadores para el marcador p35s:
 - Sonda: 35s 6FAM- TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA-TAMRA
 - sF: CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTG
 - sR: TCTTGCGAAGGATAGTGGGATT
- Sonda TaqMan® e iniciadores para el marcador endógeno HMG (High Mobility Group):
 - Sonda-Mhmg: 6FAM- CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA
 - MaiJ-F2: TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA
 - mhmg-Rev; GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT
- Muestras del ADN:
- ADN extraído de harina de maíz de material de referencia certificado. Para una lista de los materiales disponibles ver: (http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/reference_materials_catalogue/catalogue/RM_Catalogue.pdf). Por ejemplo, Maize GMO Standard 1507 BioChemika, Set con 0%, 0.1%, 1% y 10% 1507, ERM.
- ADN extraído de harina de maíz problema.

Método

Antes de empezar

Verificar que el fluoróforo para el ensayo sea el apropiado de acuerdo con el equipo que se usará. El equipo debe estar calibrado; en caso necesario realizar las calibraciones pertinentes. El equipo y el *software* deben estar conectados a un *no break* para evitar que se interrumpa el ensayo o se pierdan datos por falla o por cambios repentinos en el suministro eléctrico. Las superficies de trabajo deben estar limpias para evitar la contaminación. Es muy importante trabajar con guantes sin polvo, limpiar las superficies con papel sin pelusa y detergentes que degraden el ADN o bien con una solución de hipoclorito de sodio al 10%.

Etapas de la técnica



1. Preparar una curva de calibración (ADN) con estándares certificados a diferentes concentraciones.
 - 1.1. Se emplean los puntos 10%, 1%, 0.1% y 0% de concentración por cuadruplicado.
2. Reacciones de amplificación. Preparar por duplicado la mezcla de reacción, una para el marcador endógeno y otra para p35s, de acuerdo a las cantidades de la Tabla 1.

Tabla 1. Mezcla de reacción para el ensayo de amplificación para la cuantificación de transgénicos en maíz.

| Reactivo | Ci | Cf | Vol. para una reacción de 25 μ l |
|----------------------------------|----------------|--------|--------------------------------------|
| Agua grado biología molecular | ---- | ---- | 9.5 μ l |
| TaqMan® Universal PCR Master Mix | 2X | 1X | 12.5 μ l |
| Iniciador sentido | 10 μ M | 150 nM | 0.375 μ l |
| Iniciador antisentido | 10 μ M | 150 nM | 0.375 μ l |
| Sonda | 5 μ M | 50 nM | 0.25 μ l |
| ADN molde | 50 ng/ μ L | 100 ng | 2 μ l |
| Volumen total | ---- | ---- | 25 μ l |

Ci = concentración inicial; Cf = concentración final.

3. Las muestras del ADN que van a ser analizadas deben mantenerse en hielo hasta que se coloquen en la placa o en los tubos PCR. Procesar cada muestra por duplicado.
4. Todos los reactivos para la PCR deberán descongelarse y homogeneizarse, cuidadosamente. Mantenerse sobre hielo y tapados para evitar que reciban la luz directa.
5. Colocar 23 μ L de la mezcla de reacción en cada tubo.
6. Agregar 2.0 μ L del ADN problema a cada tubo.
7. Una vez preparadas las mezclas, centrifugar los tubos para eliminar burbujas que pudieran interferir con la lectura de la fluorescencia y la solución quede en el fondo de los tubos.
8. Preparar el equipo y programar las condiciones para la amplificación (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción del programa de amplificación.

| Etapa | Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (h:min:s) | Número de ciclos |
|-------|------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 1 | 50 | 0:02:00 | 1 |
| 2 | 1 | 95 | 0:10:00 | 1 |
| 3 | 1 | 95 | 0:00:15 | 45 |
| | 2 | 60 | 0:01:00 | |

9. Ejecutar el programa.

10. Obtención de datos.

10.1 Establecer el umbral. En el *software* del equipo desplegar las curvas de amplificación en escala logarítmica. Primero, el gen endógeno, después p35s. Localizar la línea umbral en el área donde las curvas sean paralelas. Analizar los datos. Ver la curva en modo lineal y verificar que el umbral seleccionado quede dentro de la fase geométrica de ésta.

10.2 Establecer la línea base. Determinar el número de ciclo en el que la primera curva de amplificación cruza el umbral y establecer la línea base tres ciclos antes de este punto.

10.3 Analizar los datos y exportarlos a una hoja de cálculo. De acuerdo al equipo y *Software* empleado, lo anterior puede hacerse de manera automática o manual, algunos programas permiten hacer todo el análisis sin necesidad de exportar a una hoja de cálculo. Después de seleccionar el umbral y la línea base, el programa generará de manera automática la curva de calibración y realizará una regresión lineal con los puntos de la curva. A partir de la regresión calculará los valores de ciclo umbral o Ct (véase más adelante) para las muestras problema y de estos últimos se calcula la concentración en porcentaje.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

- Verificar que los genes a analizar tengan una sola copia. Existen OGM con más de una copia del promotor 35s, que no pueden ser utilizados porque sobreestimarían el contenido real de material genéticamente modificado en la muestra.
- Para realizar el ensayo de la PCR en tiempo real es muy importante contar

con ADN de buena calidad y eliminar la presencia de inhibidores de la PCR que pudieran interferir en ella y producir resultados erróneos.

- Con la finalidad de prevenir la contaminación de las muestras, es recomendable emplear puntas con filtro y micropipetas de presión positiva para preparar la mezcla de reacción y para adicionar el ADN de las muestras a cuantificar.
- Es muy importante trabajar con pipetas calibradas.
- Preparar alícuotas de los reactivos para no descongelarlos repetidamente. Las alícuotas de sondas e iniciadores pueden estar en el refrigerador por varias semanas.
- Preparar una mezcla de reacción para cada punto de la curva de calibración y adicionar el ADN a toda la mezcla, posteriormente dividirla según corresponda. Esto es particularmente útil para los puntos de la curva de menores concentraciones, ya que en ellos el número de copias presente en la solución es menor y se incrementa el error de muestreo, disminuyendo la probabilidad de que se tome el mismo número de copias en las diferentes repeticiones.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Durante la amplificación por la PCR-TR, la sonda adicionada genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de amplificación por la PCR se puede dividir en cuatro fases: 1) inicial o basal, 2) geométrica (conocida como logarítmica o exponencial), 3) lineal y 4) *plateau* o estacionaria (Figura 4, ver también capítulo de PCR).

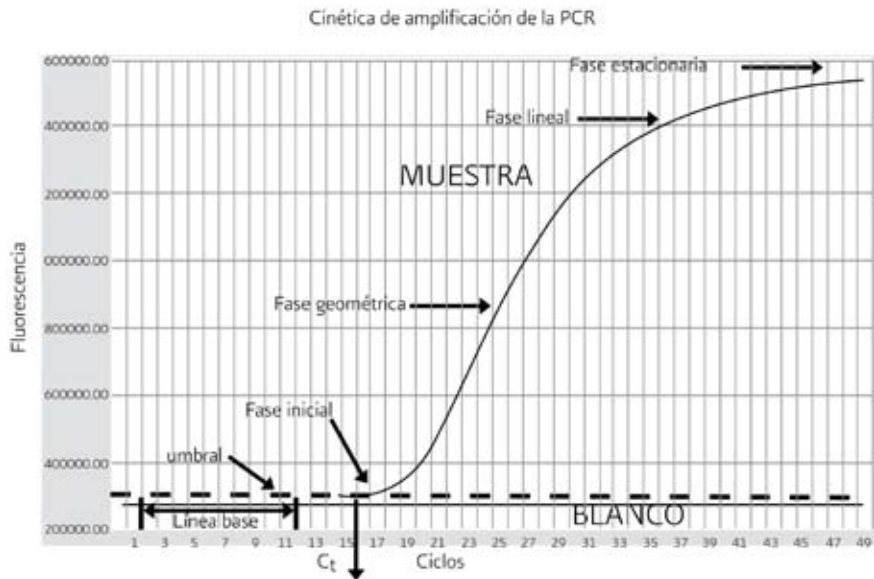
Durante la fase inicial, entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal. Sin embargo, como se muestra en la Figura 4, esta fase sirve para delimitar la línea base (ver más adelante). En la fase geométrica, los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la PCR tiene una eficiencia cercana al 100%. En esta fase de la cinética de amplificación, el comportamiento del ADN es 2^n , es decir, a partir de cada molécula del ADN se generan dos, por lo que el producto de la PCR se duplica después de cada uno de los ciclos. La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase. Por último, la fase estacionaria muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes

de la reacción se agotaron. En ésta, la cantidad de producto obtenida es constante aunque se incremente el número de ciclos. En la Figura 4 también se muestran dos componentes importantes de la cinética de amplificación: la línea base, la cual sirve para corregir las curvas que se obtienen de un experimento, restándose a las curvas de amplificación, y el C_t que se explica a continuación.

Valor de C_t

El C_t , del inglés *cycle threshold*, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. La comparación

Figura 4. Cinética de amplificación de la PCR. Durante los ciclos iniciales de la PCR no hay cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia emitida, por lo que es indistinguible el ADN amplificado y el ruido basal, pero permiten fijar la línea base. En la siguiente etapa, aumenta la cantidad del ADN amplificado y la señal fluorescente. El punto donde se observa un sensible incremento en la fluorescencia se conoce como fase inicial, la cual es el origen de la fase logarítmica o geométrica. Posteriormente, inicia la fase lineal en la cual la eficiencia de amplificación no es constante. Finalmente, se llega a la fase estacionaria donde el producto obtenido permanecerá constante aunque se aumente el número de ciclos.



de los Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del ADN o ADNc específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del ADN blanco haya en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces, el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad del ARNm o del ADN. El valor de Ct puede ser asignado de manera automática por el *Software* del equipo mediante diferentes algoritmos o bien se puede asignar de forma manual. Como todo valor de fluorescencia, el Ct es un valor que puede ser afectado por características propias del equipo detector, como los filtros utilizados, la ganancia, el tiempo de vida de la lámpara, etc., por lo que no es posible comparar valores de Ct entre diferentes experimentos y/o equipos.

Para evaluar la cantidad del ADN de interés en cada una de las muestras, se toma en cuenta la eficiencia de la amplificación (ver siguiente apartado). En el caso más sencillo, la eficiencia de la amplificación es 100%, es decir, el Ct se asigna sólo durante la fase geométrica de la amplificación donde ésta es 100% eficiente. Si se asume esta eficiencia, la proporción entre la cantidad inicial de copias del ADN blanco entre dos muestras diferentes se calcula como:

$$[No]_A/[No]_B = 2^{(\Delta Ct)} \quad (1)$$

Donde:

$[No]_A$ = número inicial de moléculas del ADN en la muestra A

$[No]_B$ = número inicial de moléculas del ADN en la muestra B

ΔCt = la diferencia entre $Ct_B - Ct_A$

Si el Ct de la muestra A es tres veces mayor que el de la muestra B, es decir, B requiere de tres ciclos más para alcanzar el mismo umbral de fluorescencia que A, eso significa que hay 8 ($2 \times 2 \times 2$) veces más ADN blanco en la muestra A que en la B.

La fórmula 1 sólo se puede utilizar en la fase geométrica cuando la eficiencia es 100%. Sin embargo, en la mayoría de los casos experimentales, la eficiencia no es 100%, por lo que es necesario incluir la eficiencia de la reacción en la fórmula:

$$[No]_A/[No]_B = (1+E)^{(\Delta Ct)} \quad (2)$$

Donde E es la eficiencia de la reacción

Eficiencia de la amplificación (validación de los ensayos de la PCR en tiempo real)

La eficiencia de la amplificación debe considerarse para tener una cuantificación confiable. Inicialmente, se asumía que era suficiente elegir valores de Ct en la fase geométrica para tener una eficiencia total. Sin embargo, ya que la mayor parte de los casos experimentales no la presentan, es necesario calcularla para obtener un factor de corrección que evite una sobreestimación de la concentración del ADN inicial.

La eficiencia de la reacción de la PCR se calcula utilizando una “curva” proveniente de la amplificación de una dilución serial de un estándar (de un producto de la PCR o un plásmido puro que contenga el ADN blanco, o como en el caso del ejemplo del protocolo, de un estándar certificado del que se extrae el ADN) (Figura 5A). Los valores de Ct de las curvas obtenidas se grafican contra el logaritmo del factor de dilución del número de copias del molde o de la concentración de la muestra (Figura 5B). Deben hacerse triplicados o cuadruplicados de cada dilución y la desviación estándar entre los diferentes puntos debe tener un valor de Ct menor a 0.2.

La recta (Figura 5B) está descrita por la siguiente ecuación:

$$Ct = k \log(N_0) + Ct(1) \quad (3)$$

Donde Ct (1), que es la ordenada al origen, corresponde a una dilución del estándar que contiene una sola molécula del ADN blanco (Figura 5B).

La eficiencia de la reacción se calcula con la siguiente fórmula:

$$E = 10^{-1/k} - 1 \quad (4)$$

Cuando la pendiente (k) de la recta obtenida es cercana o igual a -3.32, la eficiencia de la amplificación es igual a 100%. El valor calculado de E debe sustituirse en la ecuación (2).

El método descrito se utiliza comúnmente para cuantificar la eficiencia de la reacción de la PCR. Sin embargo, existen muchos autores que opinan que puede sobreestimar el valor de E. Actualmente, además de la curva estándar se sugiere involucrar algún método alternativo para determinar la eficiencia con el fin de ratificarla (especialmente en los ensayos de cuantificación relativa, ver más adelante) (Wong y Medrano 2005).

Ensayos de cuantificación

En la PCR en tiempo real existen dos tipos de cuantificación, la absoluta y la relativa. En ambos tipos se utiliza el valor de Ct para determinar la cantidad del ADN o ARN.

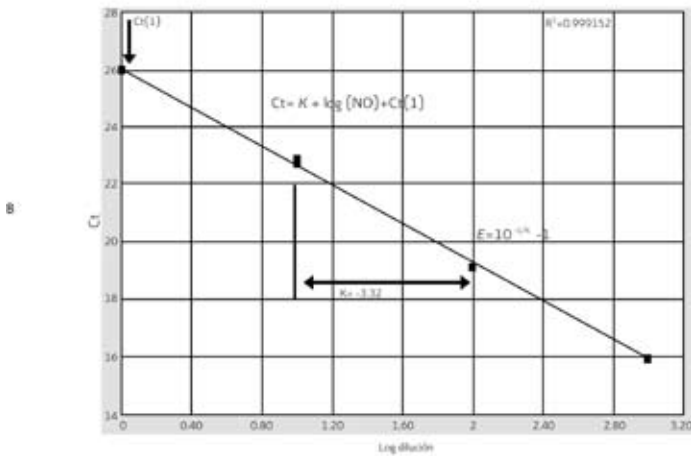
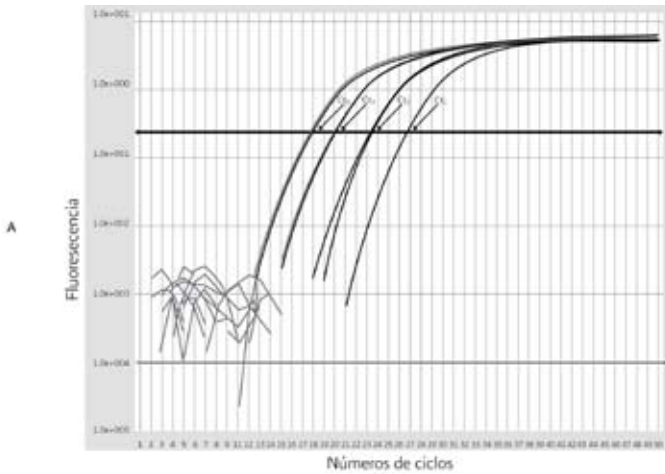
a) Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta se utiliza para determinar cargas virales, la presencia de agentes patógenos y transgénicos (ver más adelante en la sección de aplicaciones). Este tipo de ensayo permite determinar el número exacto de moléculas del ADN o ARN en una muestra. Para llevarla a cabo, se requiere una muestra con una cantidad exacta en ng/ μ L, μ mol/ μ L, número de copias o equivalentes genómicos, como estándar absoluto externo. Este estándar puede ser un fragmento del ADN de doble cadena o de cadena sencilla, un ADNc, un producto amplificado por la PCR de la secuencia del ADN de interés clonado en un plásmido, un producto de la PCR convencional o la síntesis directa de la secuencia del ADN blanco. Este estándar externo se usa para hacer diluciones seriadas y generar una curva, a partir de los valores de Ct obtenidos para cada concentración y el logaritmo de la concentración correspondiente. Esta curva de calibración permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras problema y obtener su concentración.

b) Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se utiliza en ensayos de expresión génica, principalmente. En este caso se parte de los niveles del transcrito o ARNm de las muestras, por lo que es necesario realizar la transcripción reversa (RT) y los ensayos se conocen como RT-PCR en tiempo real. Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés *versus* un gen de expresión constante que actúa como control. La diferencia con la cuantificación absoluta radica en que no se parte de una cantidad conocida del ADN, sino de un control endógeno o gen constitutivo. Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del estándar interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno. Es necesario normalizar los datos entre el valor que se obtiene para el gen blanco y el del gen endógeno, de tal manera que los valores resultantes

Figura 5. Curva estándar. A) Curva estándar de amplificación. Esta curva se genera al realizar amplificaciones a partir de diluciones seriadas del ADN de una muestra con concentración conocida. La curva se produce al graficar el promedio de los Ct obtenidos \pm la desviación estándar de cada uno de los triplicados o cuadruplicados. B) Curva estándar. La recta obtenida permite calcular las concentraciones desconocidas de las muestras usando la ecuación: $Ct = k + \log(N0) + Ct(1)$. También, permitirá calcular la eficiencia de la reacción ($E = 10^{-1/k} - 1$). La figura muestra el log de la dilución contra el valor de Ct, en este caso la pendiente es de -3.32.



sean reflejo de los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida.

Para normalizar la expresión génica, a partir de ensayos de cuantificación relativa, existen algunos métodos y modelos que consideran la eficiencia de la amplificación para determinar la cantidad del ADN, por ejemplo el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak y Schmittgen 2001), el *Q gene* (Muller et al. 2002) y el de la curva de amplificación (Peirson et al., 2003); así como, los modelos de Pfaffl (Pfaffl 2001) y el modelo de Liu y Saint (Liu y Saint 2002). Uno de los más utilizados es el de método comparativo de Ct, que se explica a continuación. *Nota:* cada usuario puede elegir dentro de los métodos disponibles de acuerdo a sus ventajas y desventajas (Wong y Medrano 2005).

c) Método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre una muestra experimental o gen de interés y un calibrador o gen endógeno. Se lleva a cabo un ensayo de validación usando diluciones seriadas tanto para el gen problema como para el gen endógeno. Se obtienen los valores de ΔCt ($Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{endógeno}}$). Éstos se grafican en el eje y versus el logaritmo de la concentración en cada una de las diluciones en el eje x. La pendiente de la recta debe ser menor o igual a 0.1 para que el método sea válido. Este método requiere que la eficiencia de amplificación (E) sea la misma para el gen blanco y el gen endógeno, y productos de la PCR pequeños (150 pb aproximadamente).

Normalización y controles endógenos

En el caso de los ensayos de RT-PCR en tiempo real para medir expresión génica, es necesario corregir la variación entre muestras. En este proceso se compara la cantidad del ARNm en dos muestras diferentes. En cada una de las muestras se mide la cantidad del ARNm de interés en relación con la cantidad del ARNm de referencia, el cual teóricamente, es constante en las dos muestras. La proporción $ARNm_{\text{blanco}}/ARNm_{\text{referencia}}$ se usa para comparar la cantidad del ARNm blanco en las muestras.

Los resultados obtenidos se normalizan con ayuda de un control, el $ARNm_{\text{referencia}}$. Generalmente, este control es un gen que de manera ideal debe expresarse cons-

tante e independientemente de las condiciones experimentales, del tratamiento de las muestras, así como en los diferentes tejidos o tipos celulares.

Existen varios tipos de controles endógenos:

a) Genes constitutivos

Tales como los genes de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y de la β -actina. Estos son los más usados. Sin embargo, gracias a la sensibilidad de la PCR en tiempo real, se ha observado que en realidad, algunos procesos biológicos o el uso de diferentes tipos celulares afectan su expresión. Por lo tanto, es necesario validar la estabilidad de la expresión del gen control en las condiciones de un experimento a realizar antes de usarlo para llevar a cabo la normalización.

b) Genes del ARN ribosomal (ARNr)

Generalmente, se utiliza el 18S. Estos ARNr son sintetizados por una polimerasa distinta a la que sintetiza los ARNm, por lo tanto la expresión del ARNr está afectada mucho menos por el tratamiento a que se hayan sometido las muestras (Spanakis 1993).

c) ARN total

La concentración del ARN total se usa también para normalizar la expresión de genes. Esta normalización tiene dos inconvenientes. Uno, la cuantificación del ARN tiene que ser muy precisa, por lo que los métodos espectrofotométricos que se utilizan rutinariamente no pueden ser empleados y el proceso de normalización depende directamente de la cuantificación del ARN. Dos, la concentración del ARN total está afectada por distintos procesos celulares (Bustin 2000).

d) ARNm múltiples

Se utilizan varios genes constitutivos y se obtiene un factor de normalización proveniente de la media de los niveles de expresión. El uso de varios ARNm constitutivos es el método más aceptado en la actualidad para normalizar los datos en la expresión génica, minimiza los problemas mencionados con los otros métodos (Pfaffl *et al.* 2004).

APLICACIONES

La PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta común en la investigación básica, la industria, la agricultura, la medicina forense y la clínica, mismas que se han visto beneficiadas por la sensibilidad, velocidad y especificidad de éste método.

Investigación básica

La determinación del nivel de expresión de los genes ha permitido asociar cambios de ciertas moléculas en una diversidad de procesos fisiológicos como en la inflamación (Rodríguez *et al.* 2007) o para predecir recurrencia del cáncer (Katsuragi *et al.* 2007). Ayuda en la genotipificación de animales *knock out*, *knock in* y modelos transgénicos, así como en la determinación de la eficacia del *knock down*. En el genoma humano, el reconocimiento de polimorfismos de un solo nucleótido, SNPs (del inglés *single nucleotide polymorphisms*) intenta comprender la complejidad de la respuesta ante las enfermedades más comunes (Schirmer *et al.* 2007), el entender el papel de éstos ayudará a disminuir los efectos adversos que se presentan en ciertos individuos y permitirá diseñar regímenes de tratamientos con dosis personalizadas (Kleyn y Vesell 1998).

Diagnóstico molecular

El análisis por (RT) PCR en tiempo real puede realizarse a partir de una amplia variedad de muestras clínicas como tejidos frescos y fijados en parafina, secreciones corporales, líquido cefalorraquídeo, sangre total, plasma, leucocitos, material fecal, exudados de garganta, vaginales o anales, etc. Se pueden detectar diversos microorganismos como virus (Espy *et al.* 2006) y bacterias (Murdoch 2004) a nivel cualitativo (presencia o ausencia) y cuantitativo (carga viral). La velocidad de estas pruebas y el apoyo que dan al diagnóstico oportuno y certero le otorgan un valor agregado. Esta técnica se puede utilizar de guía en la elección del tratamiento apropiado, al determinar mutaciones que confieren resistencia a medicamentos, como la rifampicina y la isoniazida (Rolain *et al.* 2004), y a los antivirales como ocurre en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (Johnson *et al.* 2007), evitando los efectos adversos por el uso

de medicamentos innecesarios por su falta de efectividad, reduciendo costos y previniendo la hospitalización (Espy et al. 2006). Además, esta metodología permite el manejo de muestras potencialmente infecciosas. En el caso de virus “peligrosos”, la detección por (RT) PCR en tiempo real puede realizarse en muestras inactivadas por esterilización, previniendo la infección del personal ocupacionalmente expuesto (Espy et al. 2002).

Monitoreo de patógenos

En aguas residuales pueden detectarse bacterias como *Escherichia coli* O157 (Ibekwe et al. 2002) y otros organismos como *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, etc. (Shannon et al. 2007). También pueden detectarse patógenos en plantas y alimentos. Las leyes de control de alimentos aceptan un nivel tolerable de contaminación por patógenos; por lo tanto, una cuantificación precisa es muy importante para no sobrepasar los niveles máximos autorizados y para evitar la pérdida de lotes marcados falsamente como contaminados (Weller et al. 2000, Agindotan et al. 2007, Gachon et al. 2004).

Monitoreo de OGM

Los organismos genéticamente modificados se encuentran regulados a nivel internacional y es importante conocer los niveles de presencia en alimentos y en la cadena de consumo. Para esto, es necesario contar con métodos de detección y cuantificación adecuados y eficaces, así como garantizar que durante su comercio no se sobrepasen los umbrales permitidos por algunos países, de modo tal que la herramienta idónea para su control ha sido la cuantificación mediante PCR en tiempo real (Holst-Jensen 2009).

PERSPECTIVAS

La (RT) PCR en tiempo real es una técnica para determinar cantidades del ADN o ARN en una gran variedad de ensayos que involucran la expresión de genes, la detección de patógenos y transgénicos, la genotipificación, la determinación de la carga viral, entre otros. En el futuro, esta técnica se vinculará totalmente en el diagnóstico de enfermedades, estudios epidemiológicos, estudios foren-

ses, determinaciones de la calidad de agua y/o aire, alimentos, en los estudios genéticos y, por supuesto, en la investigación básica.

Al ser una herramienta poderosa para el análisis de abundancia o presencia de los ADN específicos, es necesario contar con un diseño experimental adecuado que optimice la generación de datos y análisis de los resultados, ya que por su sensibilidad es una técnica que puede dar lugar a resultados erróneos y sobreestimaciones. En la planeación de estos ensayos hay que incorporar todos los controles necesarios, así como asegurarse de la especificidad de los productos de amplificación, del rendimiento, del rango de detección y llevar a cabo tanto triplicados intraensayos como ensayos de reproducibilidad entre experimentos. De especial cuidado debe ser el proceso de RT, el uso de controles endógenos en el caso de los ensayos de expresión génica, así como los métodos de normalización de los datos.

Para obtener resultados certeros utilizando esta técnica, es necesario tener en cuenta que una estrategia no es aplicable para cualquier situación experimental y que es necesario validar cada método que se realiza en la condición experimental particular.

BIBLIOGRAFÍA

- Agindotan B. O., P. J. Shiel y P. H. Berger. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142: 1-9.
- Brechtbuehl K., S. A. Whalley, G. M. Dusheiko y N. A. Saunders. 2001. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods* 93: 105-113.
- Bustin S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193.
- Espy M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, J. E. Rosenblatt, F. R. 3rd Cockerill y T. F. Smith. 2002. Detection of vaccinia virus, herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and Bacillus anthracis DNA by LightCycler polymerase chain reaction after autoclaving: implications for biosafety of bioterrorism agents. *Clinical Proceedings* 77: 624-628.
- Espy M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. 3rd Cockerill y T. F. Smith. 2006. Real-time

- PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 165-256.
- Gachon C., A. Mingam y B. Charrier. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* 55: 1445-1454.
- Holst-Jensen A. 2009. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances* 27: 1071-1082.
- Ibekwe A. M., P. M. Watt, C. M. Grieve, V. K. Sharma y S. R. Lyons. 2002. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4853-4862.
- Johnson J. A., J. F. Li, X. Wei, J. Lipscomb, D. Bennett, A. Brant, M. E. Cong, T. Spira, R. W. Shafer y W. Heneine. 2007. Simple PCR assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations. *PLoS ONE* 2: e638.
- Katsuragi K., M. Yashiro, T. Sawada, H. Osaka, M. Ohira y K. Hirakawa. 2007. Prognostic impact of PCR-based identification of isolated tumour cells in the peritoneal lavage fluid of gastric cancer patients who underwent a curative R0 resection. *British Journal of Cancer* 97: 550-6
- Kleyn P. W. y E. S. Vesell. 1998. Genetic variation as a guide to drug development. *Science* 281: 1820-1821.
- Kubista M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjobak, B. Sjogreen, L. Strombom, R. Stahlberg y N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125.
- Liu W. y D. A. Saint. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry* 302: 52-59.
- Livak K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lutfalla G. y G. Uze. 2006. Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments. *Methods in Enzymology* 410: 386-400.
- Mladek C., K. Guger y M. T. Hauser. 2003. Identification and characterization of the ARIADNE gene family in Arabidopsis. A group of putative E3 ligases. *Plant Physiology* 131: 27-40.

- Muller P. Y., H. Janovjak, A. R. Miserez y Z. Dobbie. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32: 1372-1379.
- Mullis K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56-61.
- Murdoch D. R. 2004. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 112: 713-727.
- Peirson S. N., J. N. Butler y R. G. Foster. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research* 31: e73.
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Pfaffl M. W., A. Tichopad, C. Prgomet y T.P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509-515.
- Rodriguez C., J. F. Alcudia, J. Martinez-Gonzalez, B. Raposo, M. A. Navarro y L. Badimon. 2007. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNF alpha: A new mechanism underlying TNF alpha-induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 196: 558-64.
- Rolain J. M., M. N. Mallet, P. E. Fournier y D. Raoult. 2004. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 538-541.
- Schirmer M., M. Hoffmann, E. Kaya, M. Tzvetkov y J. Brockmoller. 2007. Genetic polymorphisms of NAD(P)H oxidase: variation in subunit expression and enzyme activity. *Pharmacogenomics Journal* 84: 297-304.
- Shannon K. E., D. Y. Lee, J. T. Trevors y L. A. Beaudette. 2007. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *The Science of the Total Environment* 382: 121-129.
- Spanakis E. 1993. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Research* 21: 3809-3819.
- Valasek M. A. y J. J. Repa. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiological Education* 29: 151-159.

Weller S. A., J. G. Elphinstone, N. C. Smith, N. Boonham y D. E. Stead. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2853-2858.

Wong M. L. y J. F. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75-85.

https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_077749.pdf.

<http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>.

