

# PROBLEMA BIOQUÍMICO

David R. de Alba Aguayo y Angelica Rueda

Correo E: arueda@cinvestav.mx

## Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real

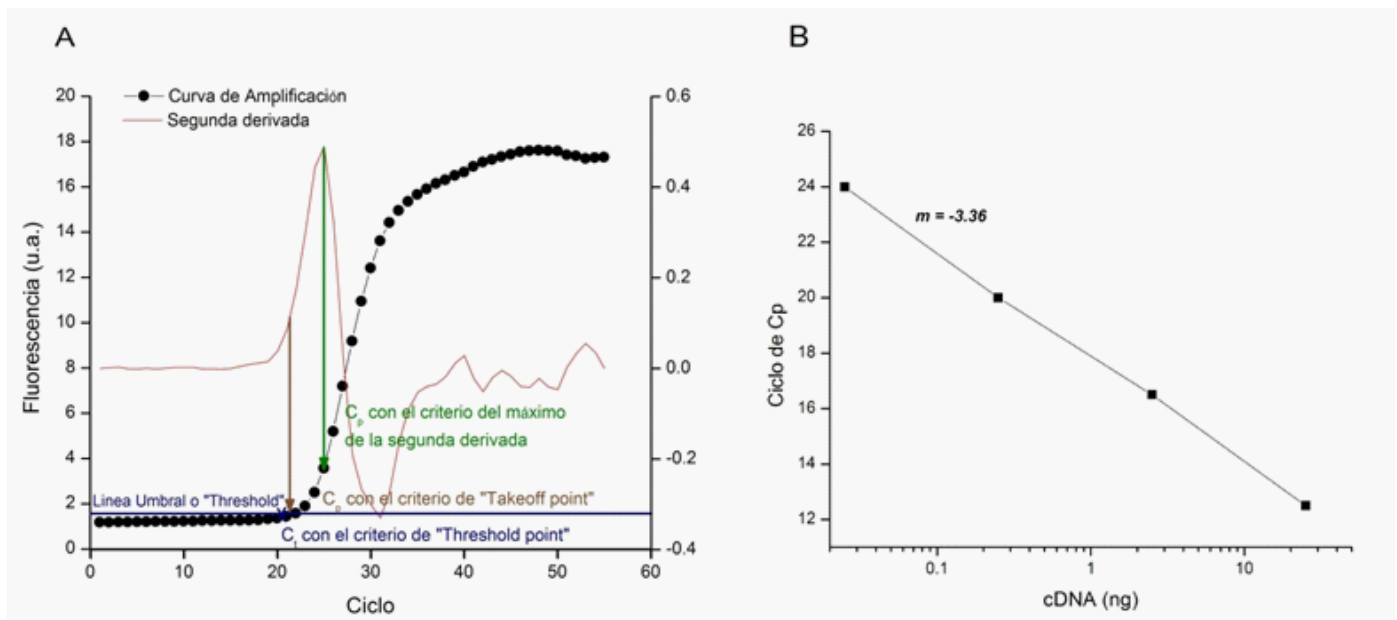
### Introducción

Desde su implementación en 1985 (1) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés "Polymerase Chain Reaction") ha sido extensamente empleada en la investigación. Esta técnica permite duplicar de manera exponencial una secuencia de ácido desoxirribonucleico (DNA) obteniéndose dos copias en cada ciclo de amplificación a partir de una cadena patrón de DNA. A lo largo del tiempo se han generado numerosas variantes de la PCR que permiten abordar diferentes estrategias experimentales, una de estas es la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que, mediante un termociclador acoplado a un espectrofluorómetro y haciendo uso de un agente intercalante fluorescente (como el SYBR Green) cuya fluorescencia aumenta

proporcionalmente con el aumento en la cantidad de DNA, nos permite cuantificar simultáneamente (en tiempo real) el número de copias que se están generando en cada ciclo de amplificación.

Existen dos variantes de qPCR, la primera es la qPCR de cuantificación absoluta que se basa en la elaboración de una curva de calibración que se construye mediante la determinación del ciclo umbral en diluciones conocidas de DNA y la segunda es la qPCR de cuantificación relativa que se basa en la relación entre los niveles de expresión de un gen de interés (GOI ó "Gene of Interest") con respecto a los niveles de expresión de un gen de referencia (Ref) que se expresa constitutivamente, ésta última estrategia de cuantificación es conveniente para investigar los cambios fisiológicos en los niveles de expresión génica (2).

La Figura 1A corresponde a una curva de amplificación representativa a partir de la cual es posible determinar el punto en el cual la fluorescencia de la



**Figura 1.** A) Curva de amplificación de qPCR (puntos negros) y segunda derivada correspondiente (línea roja) que muestra cómo se calcula de forma experimental el Ct o ciclo umbral con el criterio del "threshold point" (línea azul), o de forma matemática el Cp con el criterio del máximo de la segunda derivada (línea verde) o del 20% de ese máximo (línea café). B) Gráfica de Cp respecto a la dilución de cDNA (ng) para la determinación de la eficiencia de amplificación (3).

reacción sobrepasa la fluorescencia basal (umbral o "threshold"), y se considera como el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo. Este punto es conocido como  $C_p$  ("Crossing point") o  $C_t$  ("Threshold point" o ciclo umbral). El  $C_t$  es un valor definido de forma arbitraria por el usuario aunque es posible definirlo de forma matemática. Obteniendo la segunda derivada de la curva de amplificación, es posible definir el  $C_p$  como el ciclo que corresponde al valor máximo de la segunda derivada, adicionalmente, se puede definir el  $C_p$  como el punto de despegue ("takeoff point") que es el equivalente al 20% de ese máximo, ambos parámetros permiten encontrar de forma matemática el ciclo en el cual la fluorescencia aumenta significativamente con respecto a la fluorescencia basal.

Si se grafica el  $C_p$  obtenido con respecto a la dilución de cDNA correspondiente (en ng) se obtiene una curva de calibración (Fig. 1B) cuya pendiente permite calcular la eficiencia de la reacción de amplificación mediante la Ecuación 1 (3).

$$E = 10^{-1/m}$$

Ecuación 1 para el cálculo de la eficiencia en la amplificación de la qPCR (3). Donde  $E$ , eficiencia de la amplificación;  $m$ , pendiente.

Aunque comúnmente y con la finalidad de simplificar el análisis de la expresión relativa de un gen se asume que las eficiencias para todas las curvas son del 100%, es de vital importancia conocer la eficiencia real de la reacción y tomarla en cuenta al momento de calcular la expresión relativa del gen de interés, ya que al tratarse de un incremento exponencial en el número de copias se puede sobreestimar o subestimar los niveles de expresión relativa. Como ejemplo, una diferencia en la  $E$  o  $\Delta E = 0.03$  dará una desviación en la relación de expresión del 46% si la  $E_{GOI} < E_{ref}$  y de 209% si la  $E_{GOI} > E_{ref}$  después de 25 ciclos (3).

Se han desarrollado diversos modelos matemáticos para el cálculo de la expresión relativa de un gen, uno de los más utilizados es el denominado delta delta  $C_t$  ( $\Delta\Delta C_t$ ) (4) (Ecuación 2); sin embargo, su principal desventaja es precisamente no tomar en cuenta la corrección por cambios en la eficiencia de la reacción, asumiendo que siempre se tendrá una eficiencia del 100 % (4).

$$\text{expR} = 2^{-((C_{pGOI} - C_{pRef})_{Exp} - (C_{pGOI} - C_{pRef})_{Ctl})}$$

Ecuación 2 para el cálculo de la expresión relativa en la qPC (4). Donde  $\text{expR}$ , expresión relati-

va;  $C_{tl}$ , grupo control;  $Exp$ , grupo de tratamiento experimental;  $GOI$ , gen de interés;  $Ref$ , gen de referencia.

Otro método empleado para el cálculo de la expresión relativa del gen de interés es el propuesto por Pfaffl (3) (Ecuación 3). Este método sí toma en cuenta los cambios en las eficiencias de la amplificación y permite calcular de una manera más precisa la expresión relativa del gen de interés con respecto al gen de referencia (3). Este método es de gran utilidad pues también considera las variaciones intrínsecas entre los individuos de un mismo grupo experimental y no sólo las inducidas por las condiciones experimentales -previas y/o posteriores- debidas a algún tratamiento.

$$\text{expR} = \frac{(E_{GOI})^{(C_{pGOI}^{Ctl} - C_{pGOI}^{Exp})}}{(E_{Ref})^{(C_{pRef}^{Ctl} - C_{pRef}^{Exp})}}$$

Ecuación 3 para determinar la expresión relativa de un gen (3). Donde  $\text{expR}$ , expresión relativa;  $E_{GOI}$ , eficiencia del gen de interés;  $E_{Ref}$ , eficiencia del gen de referencia;  $\Delta C_{pGOI}$ , diferencia del  $C_p$  del gen de interés del grupo control menos el  $C_p$  del gen de interés del grupo experimental ( $C_{pGOI}^{Ctl} - C_{pGOI}^{Exp}$ );  $\Delta C_{pRef}$ , diferencia del  $C_p$  del gen de referencia del grupo control menos el  $C_p$  del gen de referencia del grupo experimental ( $C_{pRef}^{Ctl} - C_{pRef}^{Exp}$ ).

## Planteamiento experimental

Frecuentemente se define el  $C_t$  de forma arbitraria como se muestra en la Figura 1 (línea azul). Otro método rápido y sencillo para determinar el  $C_t$  consiste en calcular el promedio ( $\bar{F}$ ) y la desviación estándar ( $DS$ ) de la fluorescencia de los primeros ciclos de amplificación (se pueden usar los primeros 10 ciclos) y posteriormente realizar la suma del valor promedio calculado más 5 veces la  $DS$  para obtener un valor de fluorescencia umbral ( $C_{t_f}$ ) el cual se interpola en la curva de amplificación para determinar el ciclo que corresponderá al  $C_t$  (Ecuación 4).

$$C_{t_f} = \bar{F} + 5DS$$

Ecuación 4 para determinar valor de fluorescencia umbral ( $C_{t_f}$ ) y determinar el  $C_t$  de una curva de amplificación de qPCR. Donde  $C_{t_f}$ , fluorescencia umbral;  $\bar{F}$ , fluorescencia promedio de los primeros ciclos;  $DS$ , desviación estándar.

TABLA I

Número de ciclo (Ciclo) y valores de fluorescencia correspondientes (F), registrados a 522 nm para el *SYBR green* que se obtuvieron en una reacción de qPCR. Ref, gen de referencia; GOI, gen de interés; Ctl, control; Exp, condición experimental; *m*, pendiente.

Ref Ctl		Ref Exp		GOI Ctl		GOI Exp	
Ciclo	F	Ciclo	F	Ciclo	F	Ciclo	F
3	1.239	1	1.120	4	3.613	5	1.693
6	1.257	4	1.139	8	3.683	7	1.745
8	1.280	5	1.154	11	3.724	8	1.760
9	1.290	7	1.180	12	3.729	10	1.773
11	1.307	8	1.180	18	3.726	12	1.792
13	1.329	12	1.218	22	3.771	14	1.798
14	1.334	14	1.231	25	3.797	17	1.815
16	1.354	17	1.250	27	3.794	21	1.826
18	1.385	19	1.297	29	3.992	23	1.854
22	1.785	20	1.346	31	4.552	26	2.605
25	4.175	23	2.057	32	5.199	28	4.652
26	5.929	25	4.044	34	7.819	29	6.549
28	10.010	27	7.995	35	9.537	30	8.842
30	13.188	28	10.150	37	12.323	32	12.944
31	14.274	30	13.590	38	13.271	33	14.364
33	15.633	31	14.736	40	14.603	35	16.457
36	16.892	33	16.134	43	15.341	37	17.588
38	17.196	35	17.070	46	15.875	39	18.216
42	17.657	38	17.742	48	16.040	43	18.717
48	17.869	47	17.993	55	16.306	47	18.967
m	-3.955	m	-4.033	m	-3.917	m	-3.917

#### Datos

A continuación se presenta una tabla que contiene los resultados experimentales de una corrida de qPCR en un termociclador Rotor-Gene Q Serie 2.0.2. (Qiagen). Para el experimento se utilizaron 300 ng de cDNA en presencia de SybrGreen (Qiagen) más los *primers* específicos para un gen de referencia (en este caso GAPDH) y un gen de interés a una concentración final de 20  $\mu$ M, los *primers* fueron diseñados para amplificar regiones interexónicas en ambos casos. Las condiciones de reacción de la qPCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 55 ciclos de 5 s a 95°C seguido de 10 s a 60°C y finalmente 1 ciclo de incremento de temperatura desde 60°C hasta 95°C.

#### Preguntas

- 1) Utilizando los datos de la Tabla I, grafica las curvas de amplificación tanto para el gen de interés como para el gen de referencia, en ambas condiciones (control y experimental), se . Se recomienda hacer uso de hojas milimétricas.
- 2) Calcula la *Ct* utilizando la Ecuación 4 para cada curva de amplificación.
- 3) Determina la eficiencia utilizando la Ecuación 1 para cada curva de amplificación y usando el valor de la pendiente (*m*) de la Tabla 1.
- 4) Calcula el cambio en la expresión relativa del gen de interés (GOI) con la ecuación de  $\Delta\Delta Ct$  utilizando solamente los valores de *Ct* obtenidos.

5) Calcula el cambio en la expresión relativa del gen de interés (GOI) con la ecuación de Pfaffl utilizando los valores de  $C_t$  y  $E$  obtenidos anteriormente.

#### Referencias

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-4.
2. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfl L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30(9): p. e36.
3. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): p. e45.
4. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25(4): p. 402-8.