

PCR a tiempo real

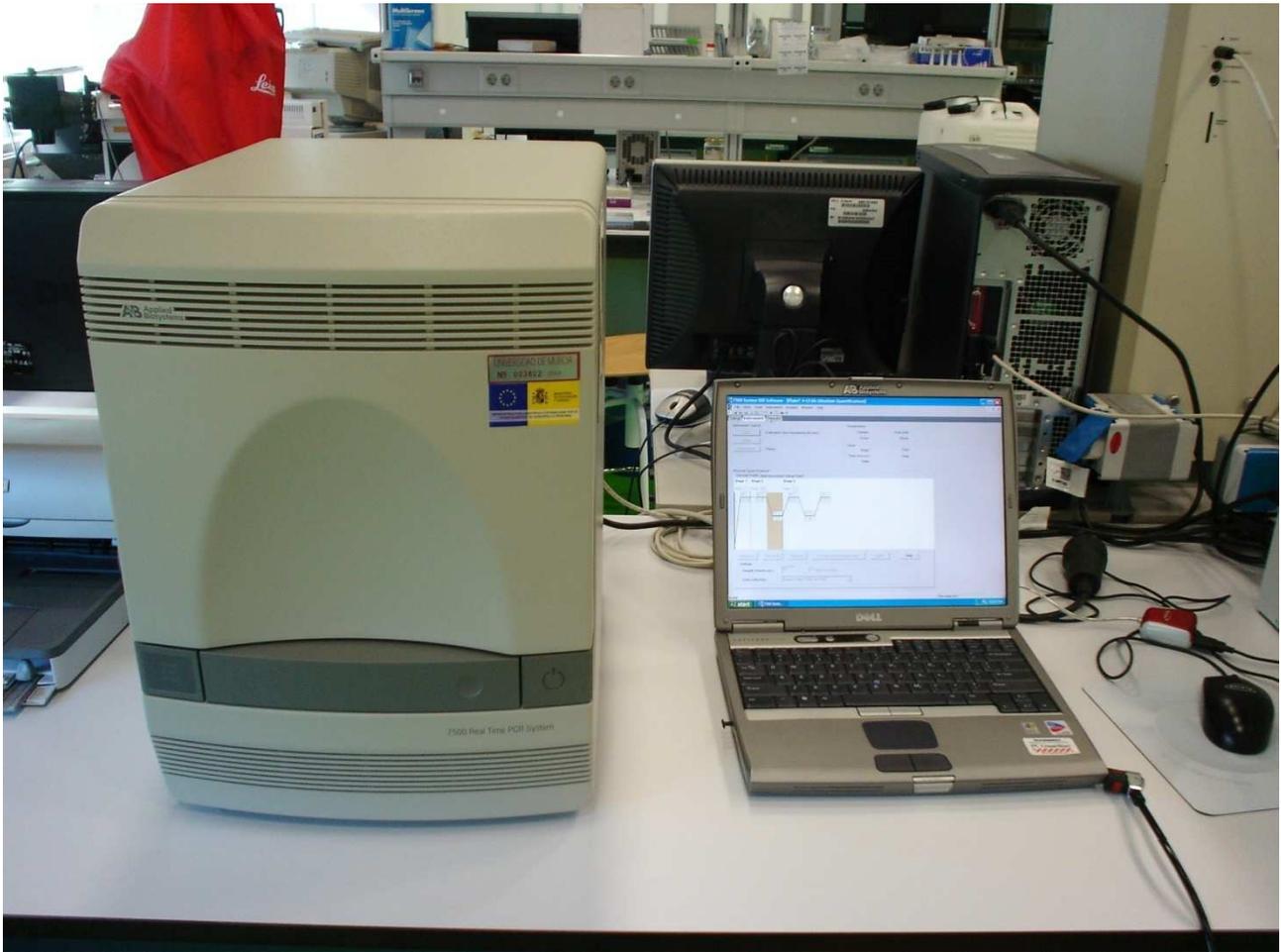
Sección de Biología Molecular,
Servicio de Apoyo a la Investigación,
Universidad de Murcia

PCR a tiempo real (PCRrt)

- Aplicaciones:

- Cuantificación de ácidos nucleicos (AQ).
- Estudio de la expresión de los genes (RQ o RT-PCRrt).
- Discriminación alélica o detección de variantes genéticas que afecten a un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism, SNP*).
- Establecimiento de la presencia o ausencia de secuencias de ácidos nucleicos específicas y de particular interés (*Plus/Minus Assays*).
- *High resolution Melting (HRM)* (sólo en 7500 Fast).

Real Time PCR Systems



- Descripción: *QuantStudio 5 Flex, 7500 y 7500 Fast Real Time PCR Systems* de Applied Biosystems. Se trata de equipos diseñados para trabajar en placa de 96 pocillos.

- Programas disponibles:

QuantStudio Design & Analysis Software, y *7500 Software v 2.0.6*: para recogida y análisis de datos.

Primer Express v 3.0.1: para diseño de sondas *TaqMan* y cebadores.

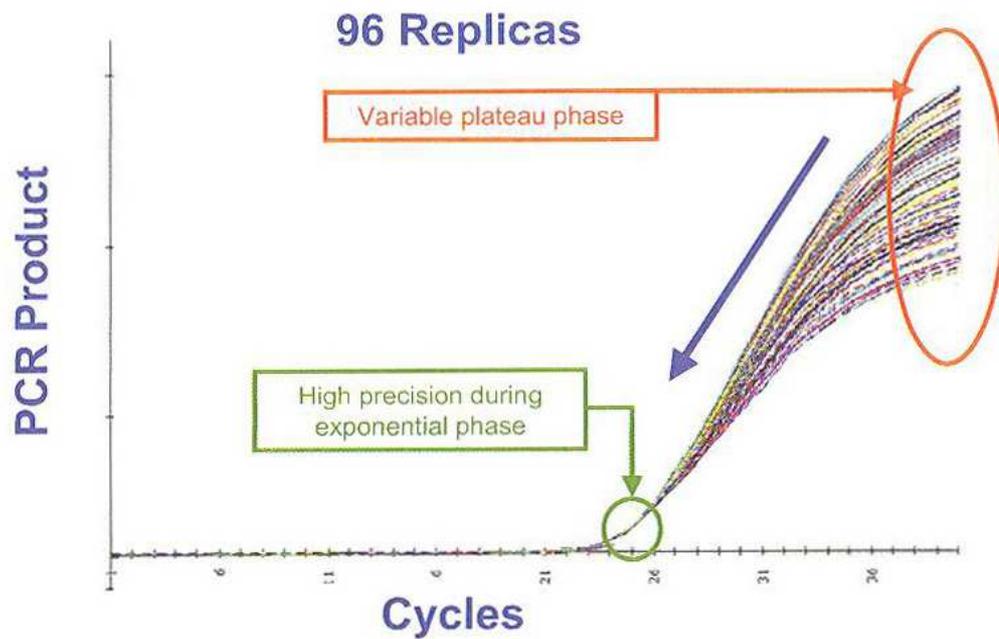
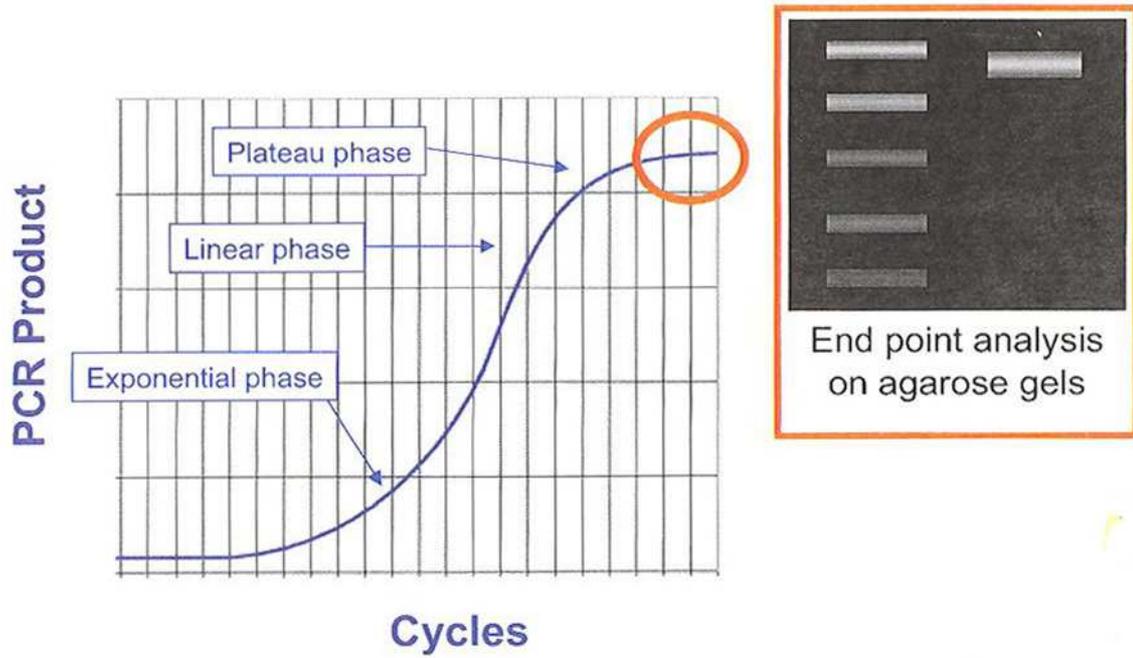
En la nube de

ThermoFisher: (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/cloud.html>)

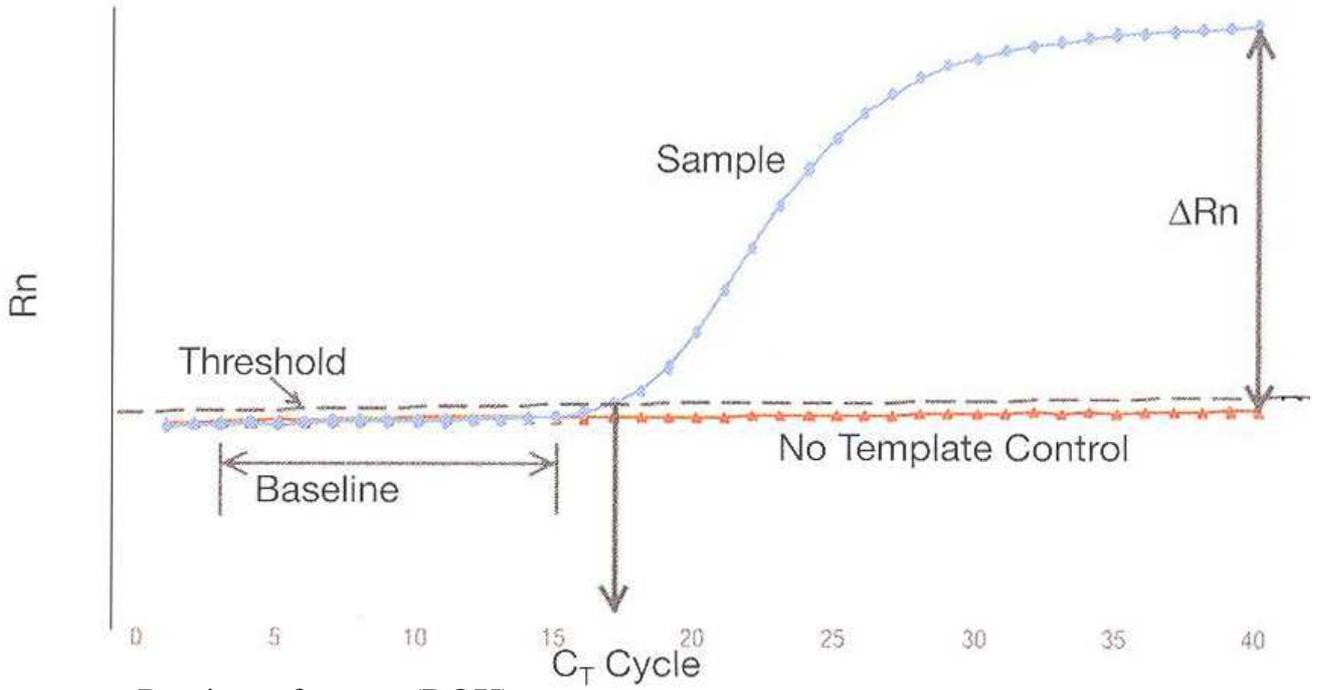
DA Design and Analysis Application.

RQ Relative Quantification (análisis multiplaca)

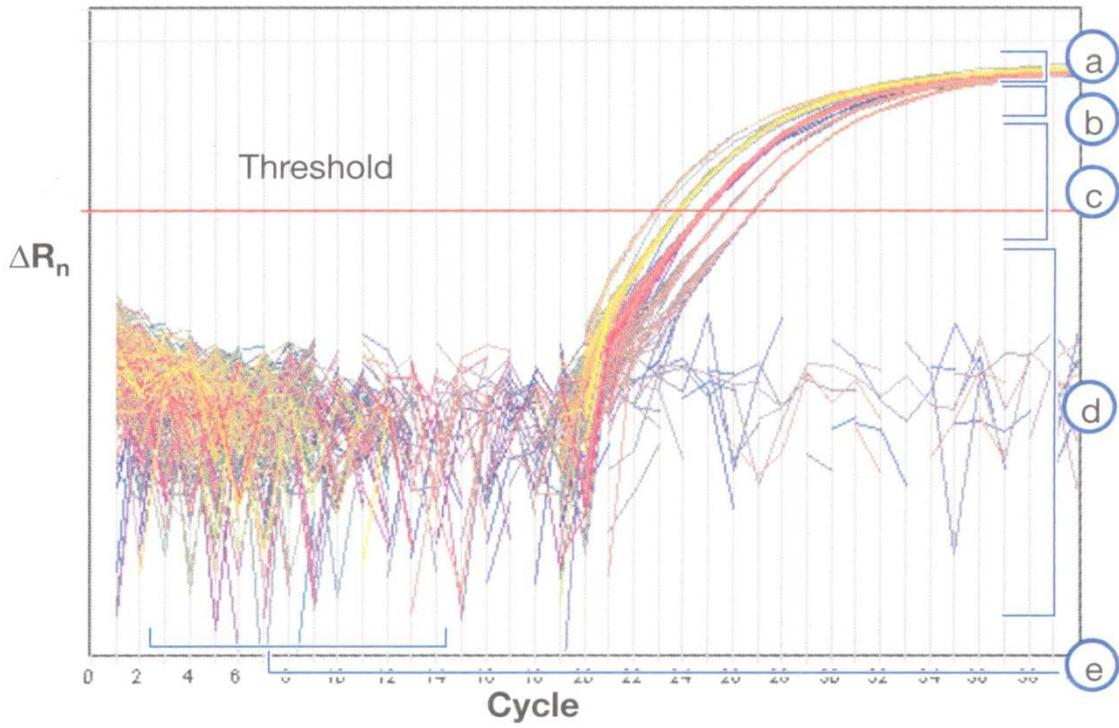
La fase exponencial de la PCR



Terminología en PCRrt



Passive reference (ROX)



- Plateau phase (a)
- Linear phase (b)
- Exponential phase (c)
- Background (d)
- Baseline (e)

PCR a tiempo real (PCRrt)

- Aplicaciones:

- Cuantificación de ácidos nucleicos (AQ).
- Estudio de la expresión de los genes (RQ o RT-PCRrt).
- Discriminación alélica o detección de variantes genéticas que afecten a un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism, SNP*).
- Establecimiento de la presencia o ausencia de secuencias de ácidos nucleicos específicas y de particular interés (*Plus/Minus Assays*).
- *High resolution Melting (HRM)* (sólo en 7500 Fast).

Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta C_t$ Methods*).
- 1.5. Elección del endógeno.
- 1.6. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*)

Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).

1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).

1.3. Definición de los componentes.

1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta C_t$ Methods*).

1.5. Elección del endógeno.

1.6. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.

3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*).

1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).



Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta C_t$ Methods*).
- 1.5. Elección del endógeno.
- 1.6. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

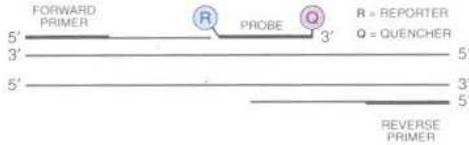
- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*).

1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green* or *TaqMan*)

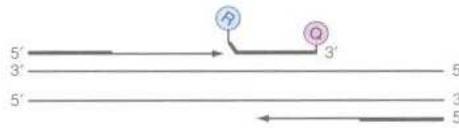
TaqMan

Polymerization



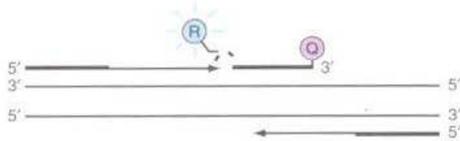
Step 1: A reporter (R) and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan probe.

Strand Displacement



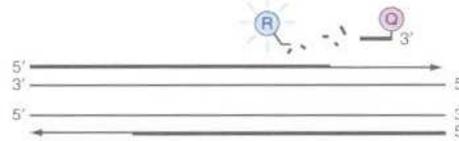
Step 1 continued: when both dyes are attached to the probe, reporter dye emission is quenched.

Cleavage



Step 2: During each extension cycle, the AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.

Polymerization Completed



Step 3: After being separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.

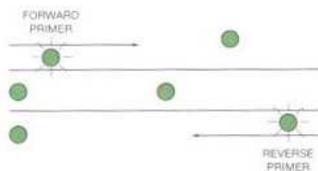
SYBR Green



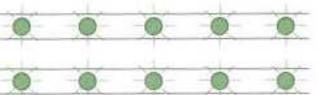
Step 1: Reaction setup
The SYBR[®] Green I dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



Step 2: Denaturation
When the DNA is denatured, the SYBR[®] Green I dye is released and the fluorescence is drastically reduced.

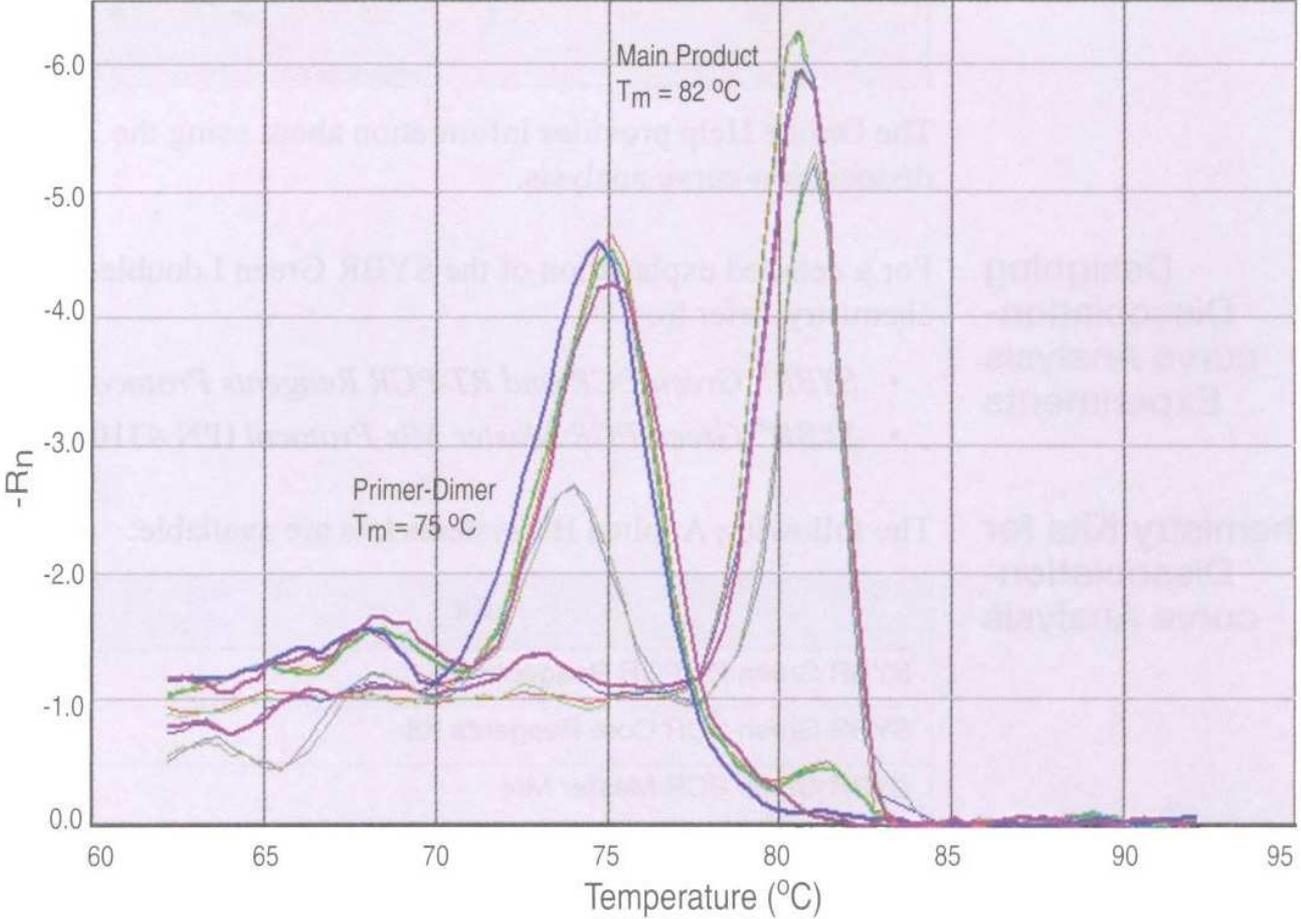


Step 3: Polymerization
During extension, primers anneal and PCR product is generated.



Step 4: Polymerization completed
SYBR[®] Green I dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the instrument.

Curvas de disociación: cuando se utiliza SYBR Green



Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta C_t$ Methods*).
- 1.5. Elección del endógeno.
- 1.6. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*).

1.3. Definición de los componentes.

- Target:

La secuencia nucleotídica que estamos estudiando.

- Calibrator:

La muestra que se emplea para referir todos los resultados. Es una condición o tipo de muestra (por ejemplo, tejido sano frente a tumoral).

- Endogenous control:

Gen presente en todas las muestras del estudio, con un nivel uniforme de expresión. Se emplea como referencia activa para normalizar, ya que permite eliminar:

- Los errores en el *input* de ARN.
- Las variaciones en la eficiencia de la retrotranscripción.

Cada tipo de muestra requiere su control endógeno. (Cada placa de 96 debe de tener su endógeno).

Ejemplos: β -actina, GAPDH, rRNA.

- Replicate wells: al menos tres por muestra y endógeno.

Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta C_t$ Methods*).
- 1.5. Elección del endógeno.
- 1.6. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.5*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.06*).

1.4. Métodos para abordar el ensayo

- Relative Standard Curve Method for Quantification

- Comparative Ct Method for Relative Quantification ($\Delta\Delta Ct$)

Paso 1: Normalización respecto del endógeno

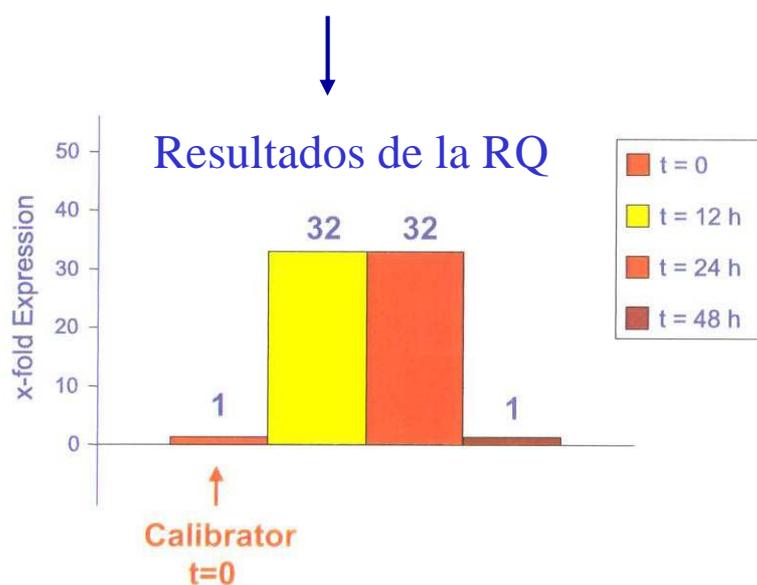
$$Ct_{Target\ gene} - Ct_{Endogenous\ control} = \Delta Ct$$

Paso 1: Normalización respecto del calibrador

$$\Delta Ct_{Sample} - \Delta Ct_{Calibrator} = \Delta\Delta Ct$$

Paso 3: Aplicar la fórmula

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



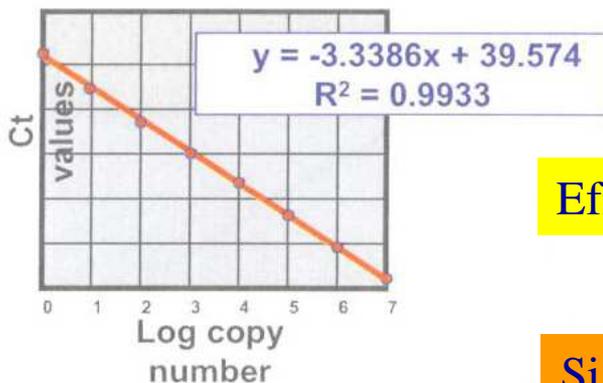
¡NB: Es necesario validar el método de los $\Delta\Delta Ct$!

Validación del método de los $\Delta\Delta Ct$

¿Qué persigue?: descartar que las diferencias en la expresión del gen sean debidas en realidad a diferencias en las **eficiencias** de los distintos procesos de PCR.

¿Cómo se realiza?: mediante diluciones seriadas de las muestras, para obtener el valor de la pendiente de la recta que resulta de representar $Ct/Log Input$. La pendiente está relacionada con la **eficiencia** de la PCR.

Además de la eficiencia del proceso, la representación $Ct/Log Input$ permite establecer el **rango dinámico** y la **precisión** del ensayo.



Example:

Slope = -3.3386

$E = 10^{(-1/-3.3)} - 1$

$= 10^{(0.30)} - 1$

$= 1.955 - 1$

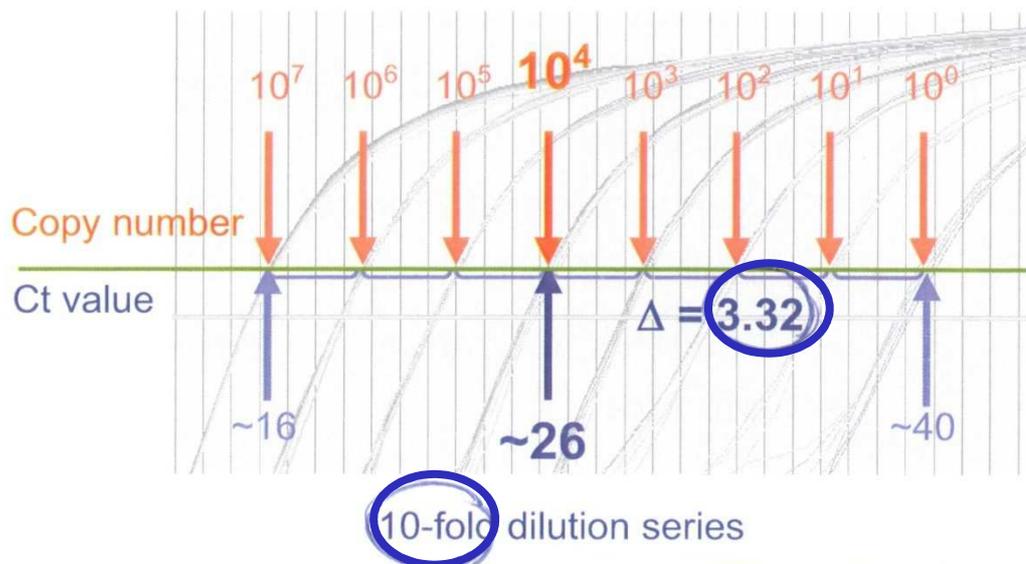
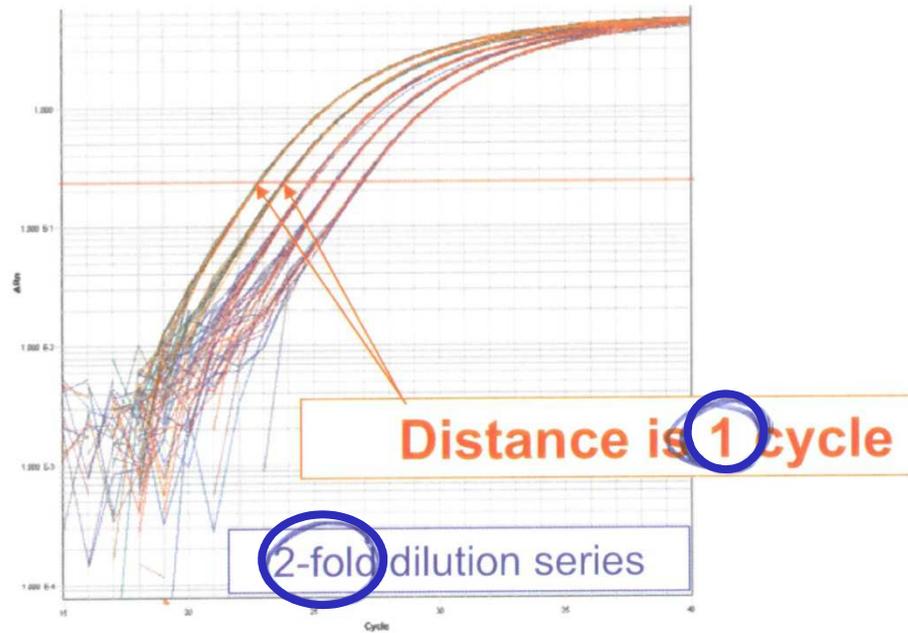
$= 0.995$ or 99.5%

Eficiencia = $10^{(-1/slope)} - 1$

Si la pendiente = -3,32,
la eficiencia es 1

Validación del método de los $\Delta\Delta Ct$

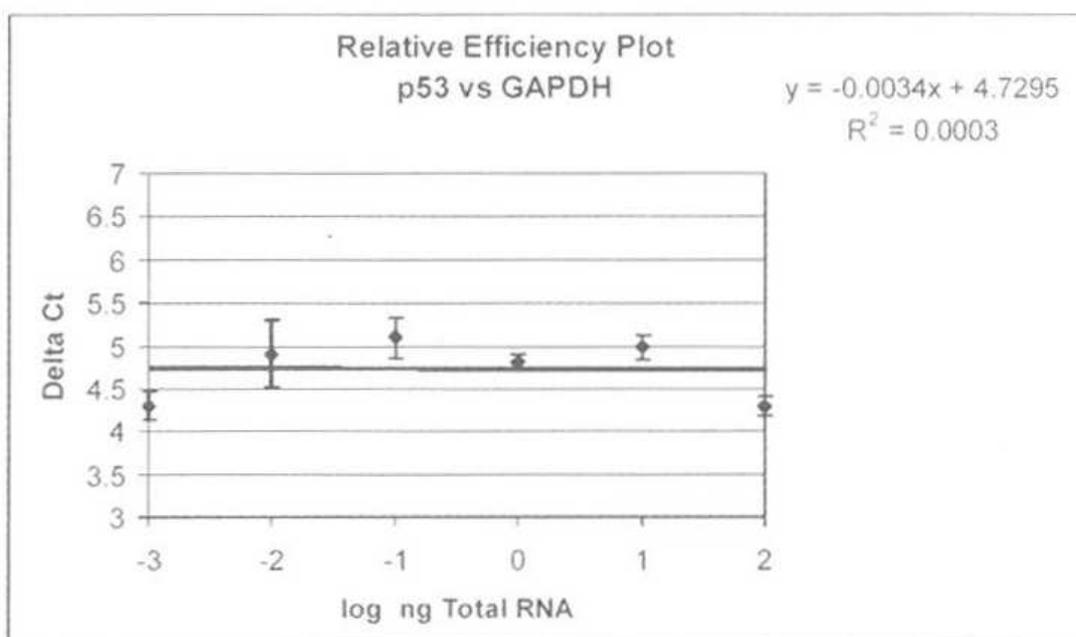
Full Efficiency



Validación del método de los $\Delta\Delta C_t$

Criterio de validación

Input Amount ng Total RNA	c-myc Average C_T	GAPDH Average C_T	ΔC_T c-myc - GAPDH
100.0	20.28 ± 0.11	15.23 ± 0.02	5.05 ± 0.11
10.0	23.88 ± 0.14	18.62 ± 0.04	5.26 ± 0.15
1.0	27.33 ± 0.09	22.18 ± 0.02	5.15 ± 0.09
0.1	30.93 ± 0.23	25.53 ± 0.07	5.40 ± 0.24
0.01	34.39 ± 0.37	29.13 ± 0.14	5.26 ± 0.39
0.001	37.03 ± 0.12	32.57 ± 0.13	4.46 ± 0.17



If the efficiencies of the two systems are...	Then...
< 0.1	<ul style="list-style-type: none"> You can use the $\Delta\Delta C_T$ calculation for the relative quantification of target without running standard curves on the same plate.
> 0.1	<ul style="list-style-type: none"> Perform the validation experiment over a larger dynamic range (5 to 6 logs) or design and synthesize new primers to improve efficiency. Perform the quantification using the standard curve method.

Validación del método de los $\Delta\Delta Ct$

Detección de la presencia de inhibición

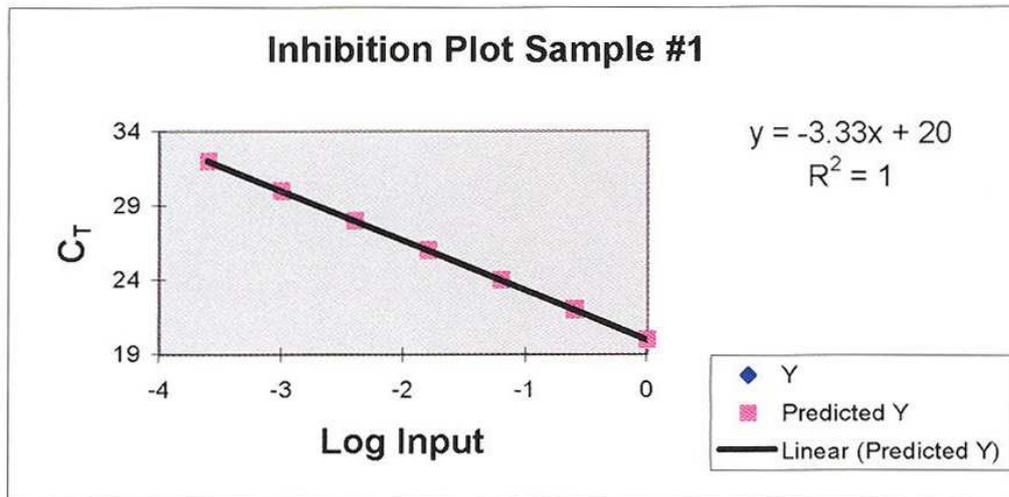


Figure 2: Inhibition Plot Sample #1 demonstrating no inhibition

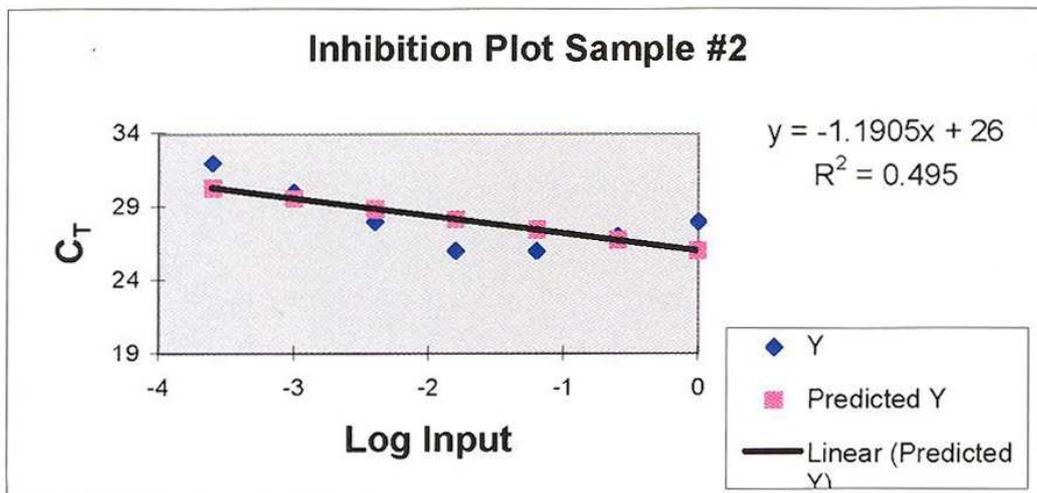


Figure 3: Inhibition Plot Sample #2 demonstrating presence of inhibitor

Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta C_t$ Methods*).
- 1.5. Elección del endógeno.
- 1.6. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*).

1.5. Elección del endógeno

Objetivo: seleccionar un gen(es) cuya expresión sea estable en todas las condiciones del estudio.

Así, por ejemplo, si estamos validando genes de un estudio previo de **microarrays**, el endógeno se selecciona a partir del propio estudio.

En caso contrario, el **GENEVESTIGATOR** en su aplicación *RefGenes tool* es una herramienta que puede ser de gran utilidad:

RefGenes is a new type of tool that allows the identification of the genes having the highest stability of expression across a chosen set of conditions.

RefGenes selects candidate genes from the entire genome. The primary objective is to provide scientists performing qRT-PCR experiments an objective choice of reference genes specific for their experimental context.

The screenshot shows the GENEVESTIGATOR RefGenes tool interface. The interface is divided into several sections:

- SINGLE EXPERIMENT ANALYSIS**: Includes 'SINGLE EXPERIMENT TOOLS' with 'Samples' and 'Differential Expression'.
- COMPENDIUM-WIDE ANALYSIS**: Includes 'CONDITION SEARCH TOOLS' with 'Anatomy', 'Cell Lines', 'Cancers', 'Perturbations', and 'Development'.
- GENE SEARCH TOOLS**: Includes 'Anatomy', 'Cell Lines', 'Cancers', 'Perturbations', 'Development', 'RefGenes' (highlighted with a red circle), and 'Ortholog Search'.
- SIMILARITY SEARCH TOOLS**: Includes five tools for similarity analysis.

Annotations on the screenshot:

- A blue arrow labeled 'Toolset' points to the 'RefGenes' tool icon.
- A black arrow labeled 'Individual tools' points to the 'RefGenes' tool icon.

GENEVESTIGATOR

Web:

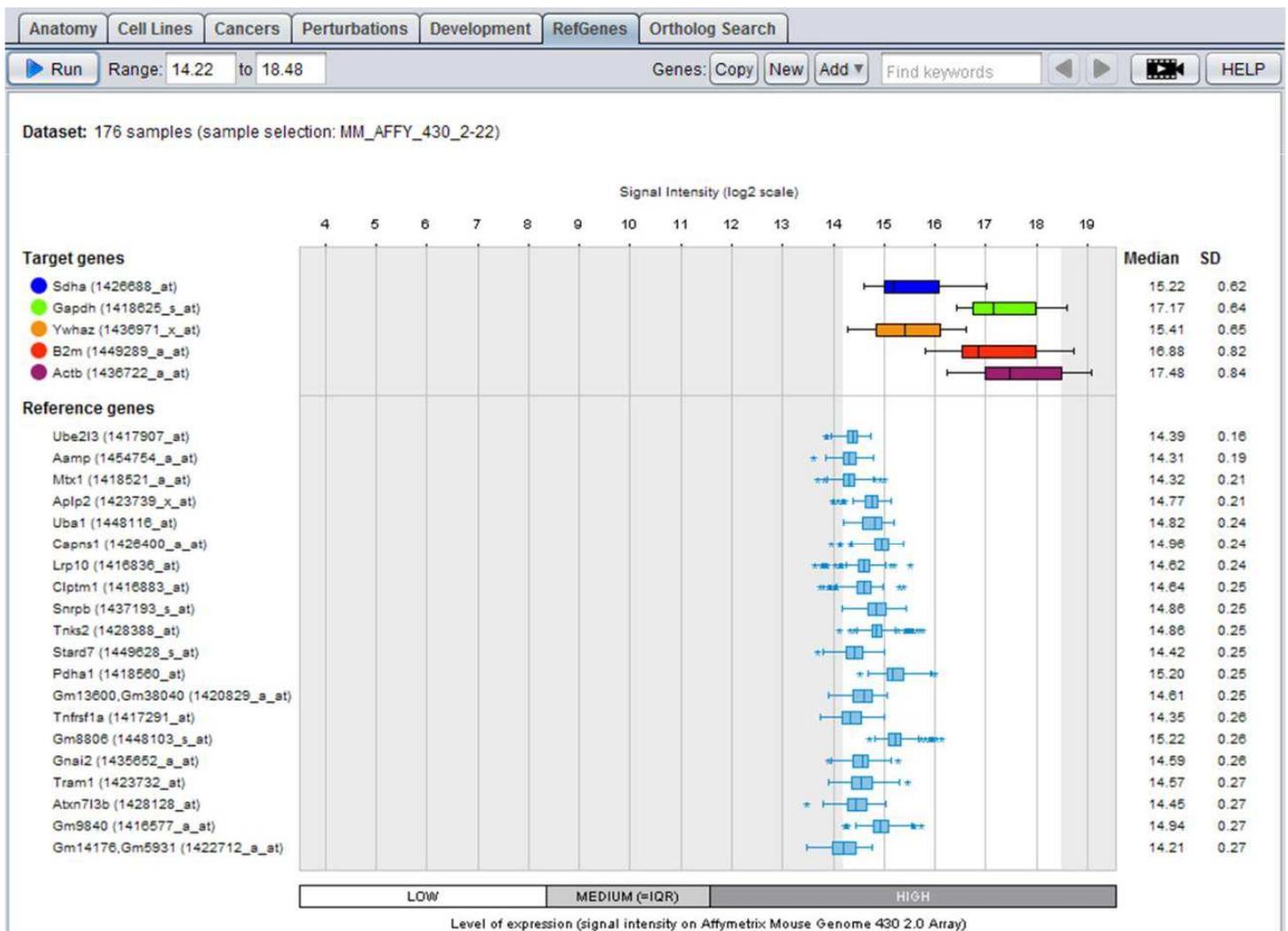
<https://genevestigator.com/gv/>

Manual:

https://genevestigator.com/userdocs/manual/GENEVESTIGATOR_UserManual.pdf

Tutorial sobre *RefGenes*:

https://genevestigator.com/gv/doc/video_refgenes.jsp



Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta C_t$ Methods*).
- 1.5. Elección del endógeno.
- 1.6. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

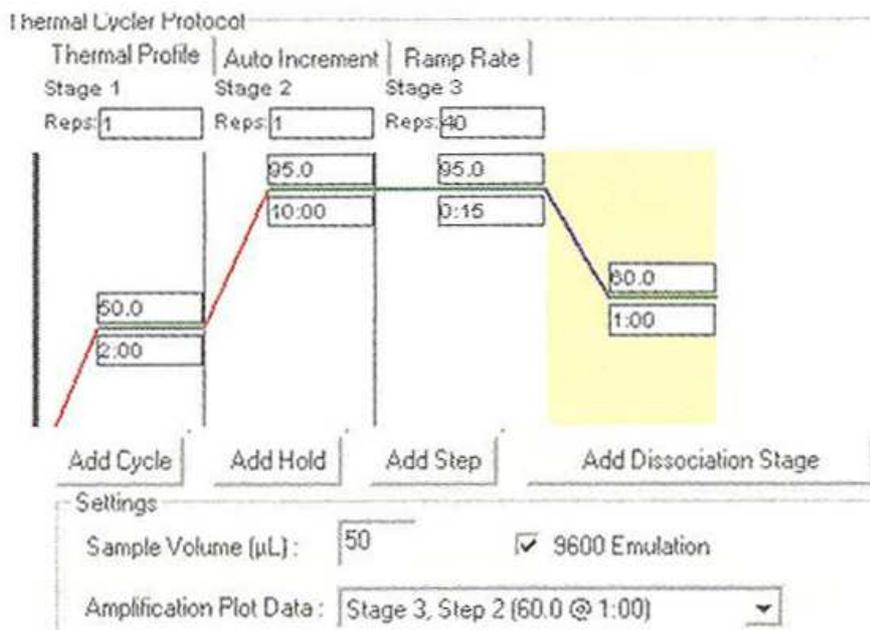
4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*).

1.6. Elección de los cebadores y sondas

(*Primer Express v 2.0*: para diseño de sondas *TaqMan* y cebadores)

¿Qué se persigue? Que todas las muestras que se procesen en una misma placa de 96 se ajusten a las mismas condiciones del termoclicador, de manera que todos los procesos de PCR transcurran con igual **eficiencia**:

Times and Temperatures (Two-step RT-PCR)				
1) RT Step	HOLD	HOLD	* For reference only. RT is complete at this point.	
	10 min @ 25 °C	120 min @ 37 °C		
2) PCR Step	Initial Steps		PCR (Each of 40 cycles)	
	AmpErase® UNG Activation	AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Activation	Melt	Anneal/Extend
	HOLD	HOLD	CYCLE	
	2 min @ 50 °C	10 min @ 95 °C	15 sec @ 95 °C	1 min @ 60 °C



Notas importantes sobre los *amplicos* (*targets*):

- Deben de ser de pequeño tamaño (50-150 bp), para lograr las máximas **eficiencias**.
- Si cubren la unión entre exones, se evita la amplificación del ADN genómico.

1.6. Elección de los cebadores y sondas

Cebadores de la RT

Primers	Selection Guidelines
Oligo d(T) ₁₆	<ul style="list-style-type: none"> • Use to reverse transcribe only eukaryotic mRNAs and retroviruses with poly-A tails • Avoid long mRNA transcripts or amplicons greater than 2 kilobases upstream
Random hexamers	<ul style="list-style-type: none"> • Try first for use with long reverse transcripts or reverse transcripts containing hairpin loops • Use to transcribe all RNA (rRNA, mRNA, and tRNA)
Sequence-specific reverse primers	<ul style="list-style-type: none"> • Use to reverse transcribe RNA-containing complementary sequences only

Guía para el diseño de cebadores y sondas de la PCR

Primer and probe design guidelines for quantitative assays

Probe Guidelines	Primer Guidelines
Select the probe first and design the primers as close as possible to the probe without overlapping it (amplicons of 50 to 150 basepairs are strongly recommended).	
Keep the G/C content in the 30 to 80% range.	
Avoid runs of an identical nucleotide. This is especially true for guanine, where runs of four or more Gs should be avoided.	
When using Primer Express software, the T _m should be 68 to 70 °C.	When using Primer Express software, the T _m should be 58 to 60 °C.
No G on the 5' end.	The five nucleotides at the 3' end should have no more than two G and/or C bases.
Select the strand that gives the probe more C than G bases.	
Make TaqMan MGB probes as short as possible, without being shorter than 13 nucleotides.	

1.6. Elección de los cebadores y sondas

Concentración de los cebadores

Recommended primer concentrations for DNA and cDNA quantification assays

Chemistry	Concentrations (nM)	
	Forward Primer	Reverse Primer
TaqMan probe	900	900
SYBR Green I dye	50	50

Optimización de las concentraciones (*SYBR Green*):

- Seleccionar aquéllas con menor Ct y mayor ΔR_n .
- Incluir NTCs y realizar Curvas de Disociación.

Reverse Primer (nM)	Forward Primer (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

1.6. Elección de los cebadores y sondas

Concentración de los cebadores

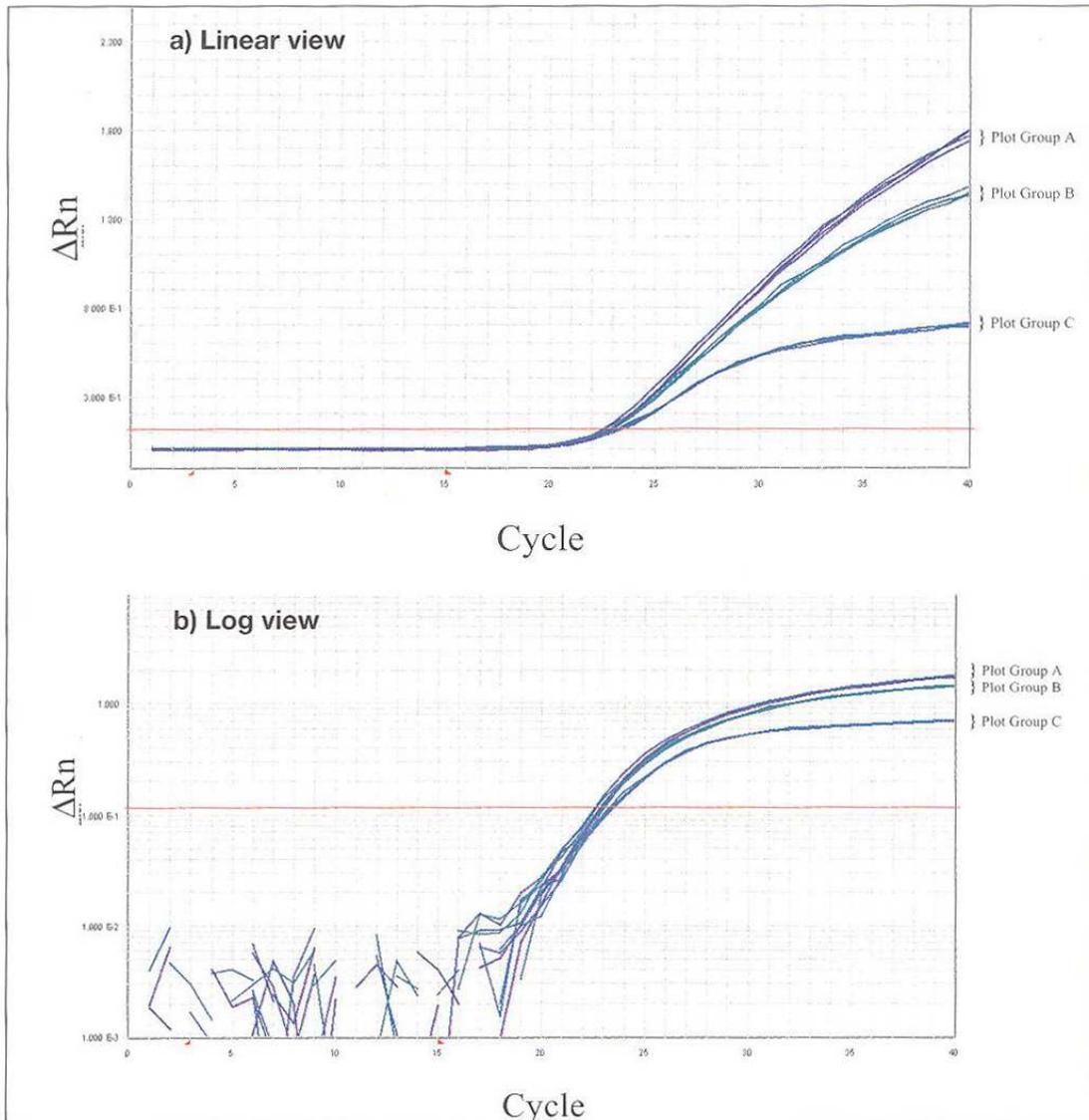


Figure 3-2 Primer optimization experimental results showing amplification plots of primer combinations.

Plot group key:

A: Combinations that contain at least 300 nM of forward and reverse primer

B: Combinations that contain at least 150 nM of forward and reverse primer

C: Combinations that contain at least 50 nM of forward and reverse primer

Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta Ct$ Methods*).
- 1.5. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*).

2) La retrotranscripción

- Es fundamental la calidad del ARN: hay que evitar la presencia de proteínas contaminantes y de ARN degradado. Un ARN con $A_{260/280} = 0 > 2$ se considera relativamente libre de proteínas.

Si $A_{260/280} < 2$, se recomienda añadir un inhibidor de Rnasas ($Cf = 1 \text{ U}/\mu\text{l}$).

- Para determinar el *input* de ARN: realizar diluciones seriadas, para determinar el **rango dinámico**.

- Para transformar el ARNtotal en ADNc: seguir las instrucciones del *kit* (pej., *High Capacity cDNA Archive Kit* de Applied Biosystems).

Cebadores de la RT:

Primers	Selection Guidelines
Oligo d(T) ₁₆	<ul style="list-style-type: none">• Use to reverse transcribe only eukaryotic mRNAs and retroviruses with poly-A tails• Avoid long mRNA transcripts or amplicons greater than 2 kilobases upstream
Random hexamers	<ul style="list-style-type: none">• Try first for use with long reverse transcripts or reverse transcripts containing hairpin loops• Use to transcribe all RNA (rRNA, mRNA, and tRNA)
Sequence-specific reverse primers	<ul style="list-style-type: none">• Use to reverse transcribe RNA-containing complementary sequences only

Condiciones del termociclador en la RT:

Step Type	Time	Temperature
HOLD	10 min	25 °C
HOLD	120 min	37 °C

2) La retrotranscripción

RT Master Mix:

Step	Action																																						
1.	In a 0.2-mL microcentrifuge tube, prepare a reaction mix for all total RNA samples to be reverse transcribed. If preparing four samples, follow the recommended volumes shown below.																																						
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Component</th> <th colspan="2">Volume (μL)</th> <th rowspan="2">Final Conc.</th> </tr> <tr> <th>Per Sample</th> <th>Reaction Mix (x4)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RNase-free water</td> <td>Variable[‡]</td> <td>Variable[‡]</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>10X RT Buffer</td> <td>1.0</td> <td>4.0</td> <td>1X</td> </tr> <tr> <td>25 mM MgCl_2</td> <td>2.2</td> <td>8.8</td> <td>5.5 mM</td> </tr> <tr> <td>deoxyNTPs Mixture (2.5 mM)</td> <td>2.0</td> <td>8.0</td> <td>500 μM per dNTP</td> </tr> <tr> <td>Random Hexamers (50 μM)</td> <td>0.5</td> <td>2.0</td> <td>2.5 μM</td> </tr> <tr> <td>RNase Inhibitor (20 U/μL)</td> <td>0.2</td> <td>0.8</td> <td>0.4 U/μL</td> </tr> <tr> <td>MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/μL)</td> <td>0.625</td> <td>2.5</td> <td>3.125 U/μL</td> </tr> <tr> <td>Total[§]</td> <td>6.525</td> <td>26.1</td> <td>—</td> </tr> </tbody> </table> <p>‡ The volume of RNase-free water (μL) will be $3.475 - \text{RNA sample volume}$ in a 10-μL reaction.</p> <p>§ If changing the reaction volume, make sure the final proportions are consistent with the recommended values above.</p>	Component	Volume (μL)		Final Conc.	Per Sample	Reaction Mix (x4)	RNase-free water	Variable [‡]	Variable [‡]	—	10X RT Buffer	1.0	4.0	1X	25 mM MgCl_2	2.2	8.8	5.5 mM	deoxyNTPs Mixture (2.5 mM)	2.0	8.0	500 μM per dNTP	Random Hexamers (50 μM)	0.5	2.0	2.5 μM	RNase Inhibitor (20 U/ μL)	0.2	0.8	0.4 U/ μL	MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μL)	0.625	2.5	3.125 U/ μL	Total[§]	6.525	26.1	—
Component	Volume (μL)		Final Conc.																																				
	Per Sample	Reaction Mix (x4)																																					
RNase-free water	Variable [‡]	Variable [‡]	—																																				
10X RT Buffer	1.0	4.0	1X																																				
25 mM MgCl_2	2.2	8.8	5.5 mM																																				
deoxyNTPs Mixture (2.5 mM)	2.0	8.0	500 μM per dNTP																																				
Random Hexamers (50 μM)	0.5	2.0	2.5 μM																																				
RNase Inhibitor (20 U/ μL)	0.2	0.8	0.4 U/ μL																																				
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μL)	0.625	2.5	3.125 U/ μL																																				
Total[§]	6.525	26.1	—																																				

Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta Ct$ Methods*).
- 1.5. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*).

3) Obtención de los datos

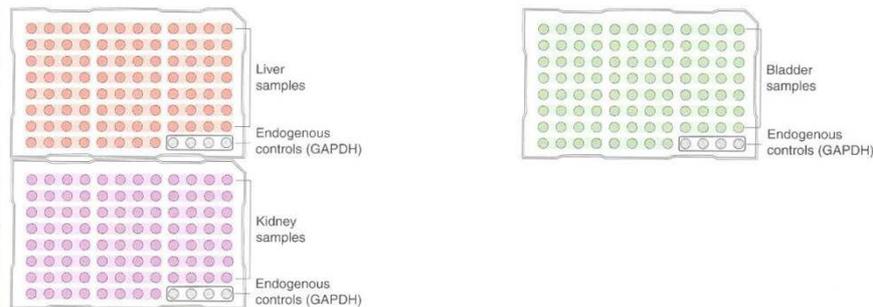
3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*

PCR Master Mix for Primer Optimization

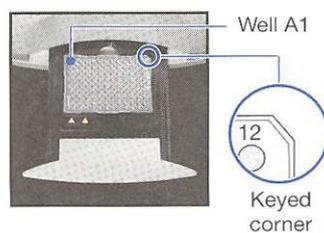
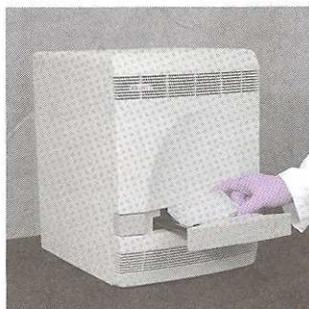
Component	Volume (μL) for One 50- μL Reaction	Volume (μL) for 100 50- μL Reactions	Final Concentration
Power SYBR Green PCR Master Mix (2X)	25	2500	1X
Forward Primer	Variable	Variable	50 to 900 nM
Reverse Primer	Variable	Variable	50 to 900 nM
Template	Variable	Variable	1 to 100 ng
Water	Variable	Variable	—
Total	50	5000	—

3.2. Preparación y lectura de la placa de 96

Samples and endogenous controls are arranged on three plates as shown below. 50 μL of PCR master mix containing cDNA are added to each well.



The reactions are kept on ice until the plates are loaded on the 7300/7500 system.



Incluir controles:

- NTC.
- De la contaminación de genómico

Esquema general de un ensayo de RQ

1) Diseño de un experimento de RQ

- 1.1. Selección del método de PCR (*Single- or Multiplex*).
- 1.2. Elección de los reactivos (*SYBR Green or TaqMan*).
- 1.3. Definición de los componentes.
- 1.4. Métodos para abordar el ensayo (*Relative Standard Curve or $\Delta\Delta Ct$ Methods*).
- 1.5. Elección de los cebadores y sondas.

2) La retrotranscripción

3) Obtención de los datos

- 3.1. Preparación de la *PCR Master Mix*.
- 3.2. Preparación y lectura de la placa de 96 (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos (*7500 Software v 2.0.6*).

4) Análisis de los datos:

7500 Software v 2.0.6

QuantStudio Design & Analysis Software

En la nube de ThermoFisher:

(<https://www.thermofisher.com/es/es/home/cloud.html>)

DA Design and Analysis Application.

RQ Relative Quantification (análisis multiplaca).

