Introdução a PCR em Tempo Real

Juliana Giusti
Assessora Científica LSG

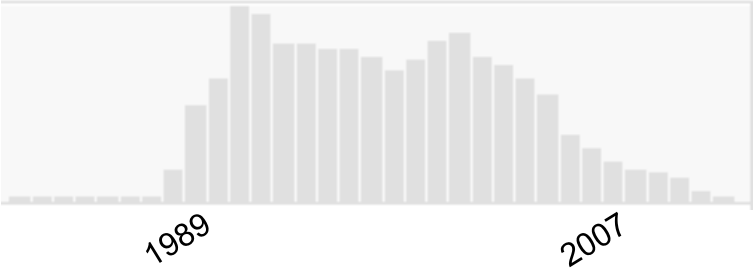
Introdução

A detecção e quantificação de ácidos nucléicos estão entre as técnicas mais importantes nos estudos de ciências da vida

Até há cerca de 10 anos a quantificação da expressão gênica era majoritariamente analisada através de metodologias de hibridação

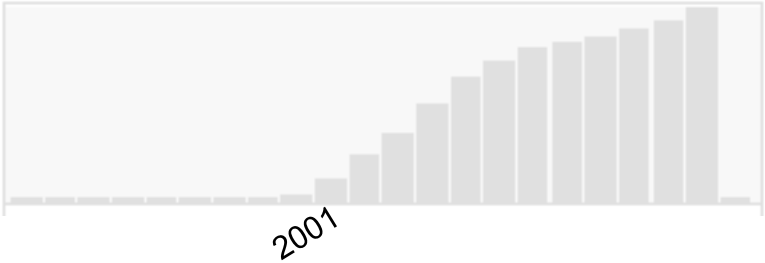
Introdução

Northern Blotting (1981 a 2013)



- Tecnologia mais utilizada por muito tempo
- Intensidade da banda de hibridação relacionada a quantidade
- Barata
- Análise em baixa escala

Microarray (1992 a 2013)



- Hibridação em miniatura
- Não utiliza radioativo
- Análises de genes em larga escala

Introdução

PROBLEMAS

Northern Blotting

•Como fazer quando se tem pouco material? Northern Usa 10ug de RNA
•Protocolo sujo (usa radioativo)
•Protocolo muito elaborado e extenso

Microarray

•Protocolo caro
•Análise difícil dos dados
•Precisa de validação dos resultados através de uma outra técnica

SOLUÇÃO

Conseguir usar PCR para quantificação

- Mais sensível
- Mais rápida

Introdução

PCR CONVENCIONAL:

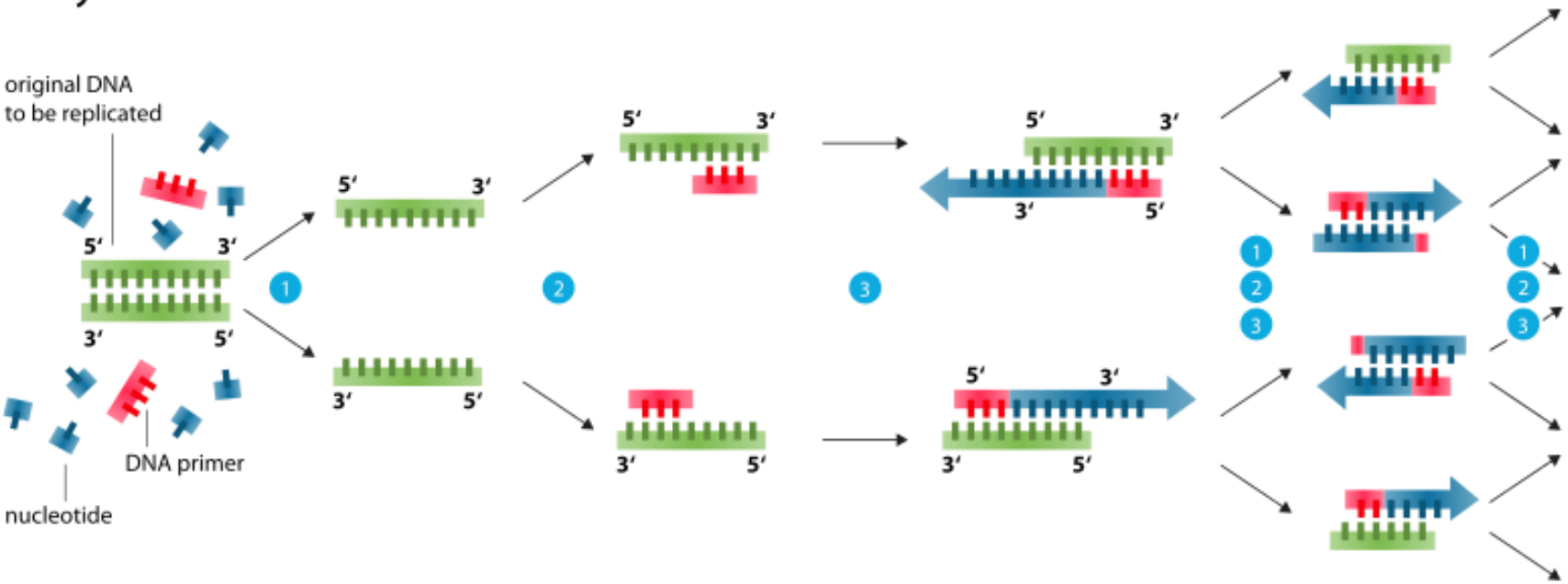
- Consiste em amplificar cópias de DNA *"in vitro"*

OBJETIVO: Multiplicar sequencia específica do DNA a concentrações que possa ser detectado

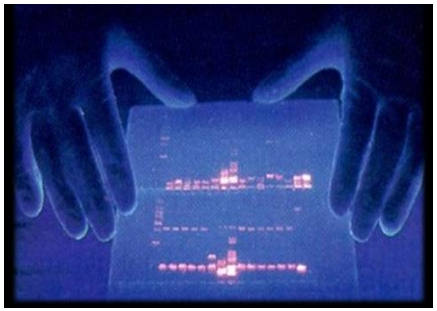
RESULTADO: Valores Qualitativos

PCR convencional

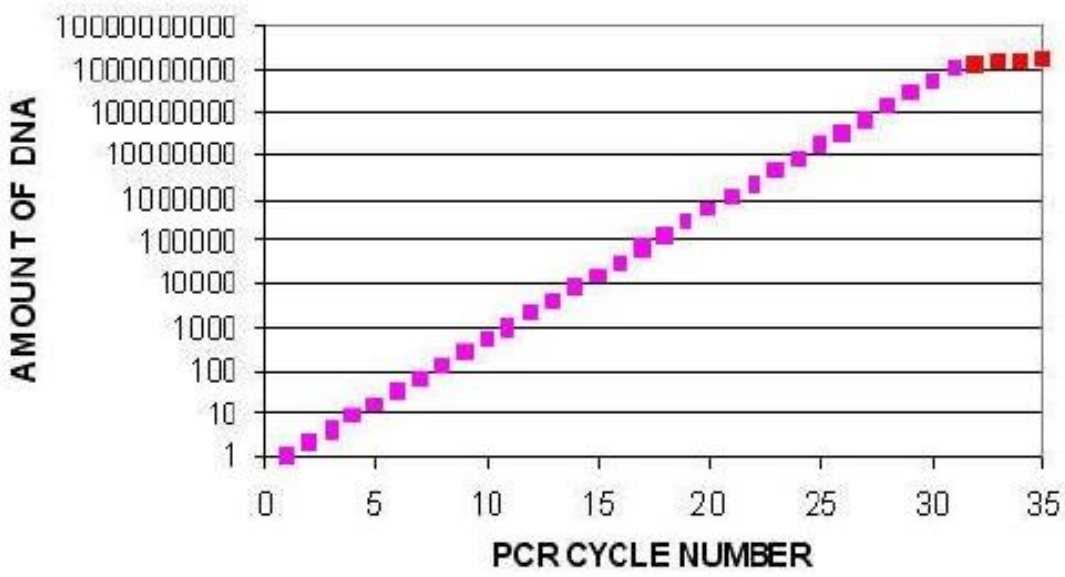
Polymerase chain reaction - PCR



1. **Denaturation** at 94-96°C
2. **Annealing** at ~68°C
3. **Elongation** at ca. 72 °C



Introdução



Número de Ciclos	Quantidade de DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024
11	2048
12	4096
13	8192
14	16384
…	…
27	134217728
28	268435456
29	536870912
30	1073741824

PCR Convencional

-**PCR Qualitativa:** Presença ou Ausência do produto amplificado;

-Baixa Precisão;

-Baixa Sensibilidade;

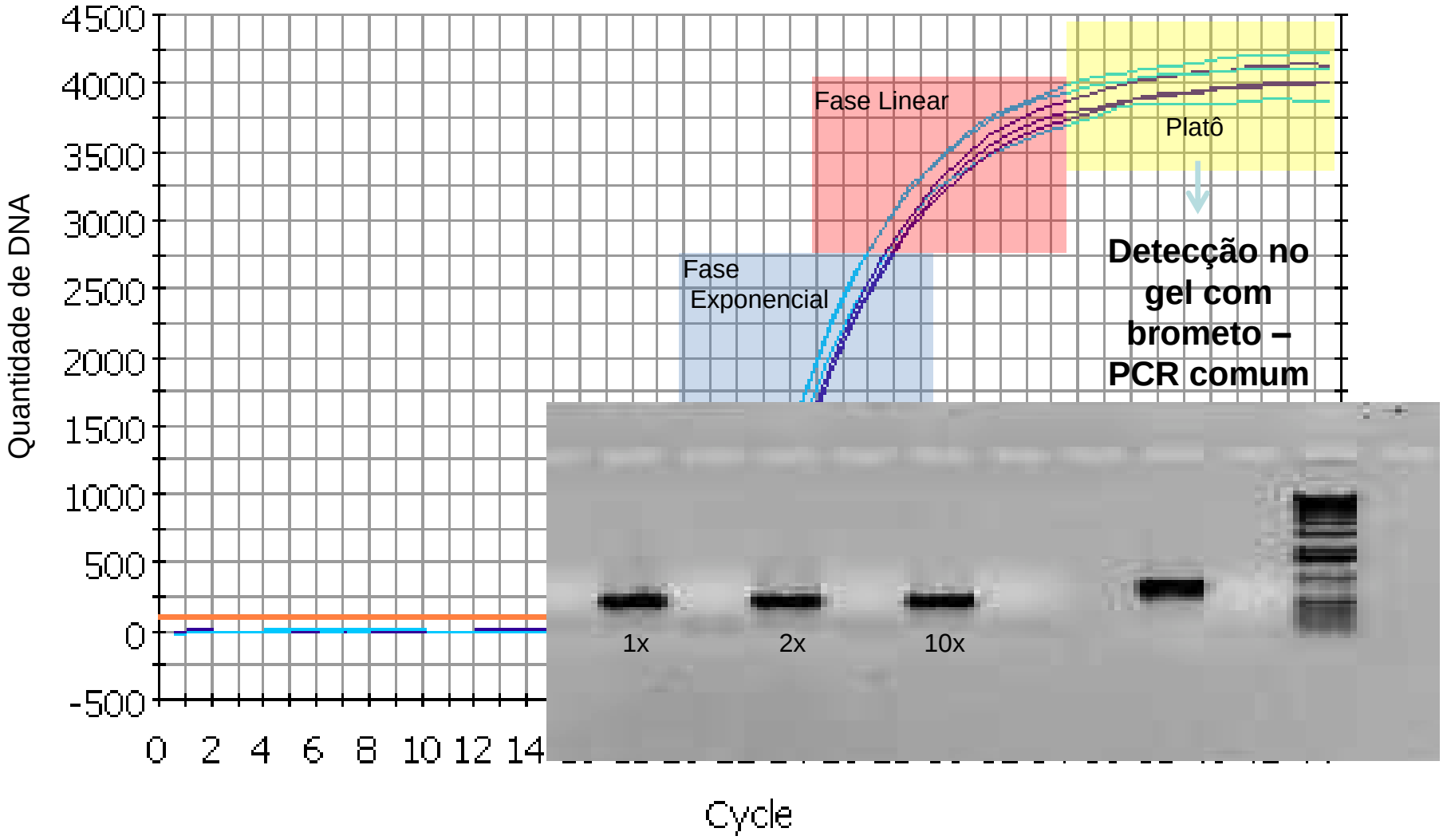
-Pós-Processamento do Produto da PCR;

-Contaminação (brometo);

-Demanda de tempo;

-Custos

Introdução


Quantidade de DNA
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
0 2 4 6 8 10 12 14
Cycle
Fase Linear
Platô
Fase Exponencial
Detecção no gel com brometo – PCR comum
1x
2x
10x

Introdução

Limitações da PCR comum:

•Sistema de detecção não quantitativo e de sensibilidade mais reduzida (Brometo de etídeo)

•Contaminação do ambiente de trabalho (uso do brometo para poder analisar o resultado)

•Necessidade de pós-processamento do produto da PCR

PCR TEMPO REAL

Habilidade de monitorar em tempo real o progresso de uma reação de PCR através do uso de moléculas fluorescentes

PCR em tempo real

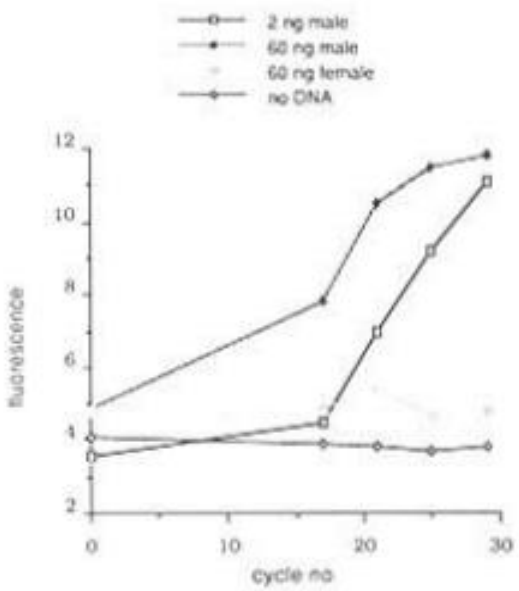
A técnica de PCR em tempo real foi descrita por Higuchi e colaboradores em 1992

SIMULTANEOUS AMPLIFICATION AND DETECTION OF SPECIFIC DNA SEQUENCES

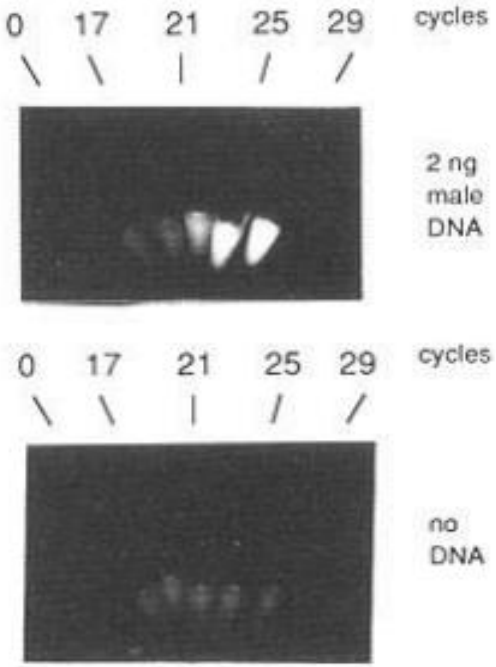
Russell Higuchi*, Gavin Dollinger[1], P. Sean Walsh and Robert Griffith

Roche Molecular Systems, Inc., 1400 53rd St., Emeryville, CA 94608. [1]Chiron Corporation, 1400 53rd St., Emeryville, CA 94608. *Corresponding author.

A.



B.



BIO-RAD

PCR em tempo real

A partir de 1996 começou a ser utilizada para a quantificação de ácidos nucléicos

Evolução do uso da técnica

- 1999 → Apenas 8% dos artigos utilizavam essa técnica para quantificar
  → As técnicas mais utilizadas para quantificação de RNA era RT-PCR e Northern blott

- 2007/08 → 88% dos artigos publicados utilizam essa técnica

Vantagens da PCR em Tempo Real:

- Alta sensibilidade
- Boa reprodutibilidade
- Evita contaminação por não precisar de pós processamento

BIO-RAD

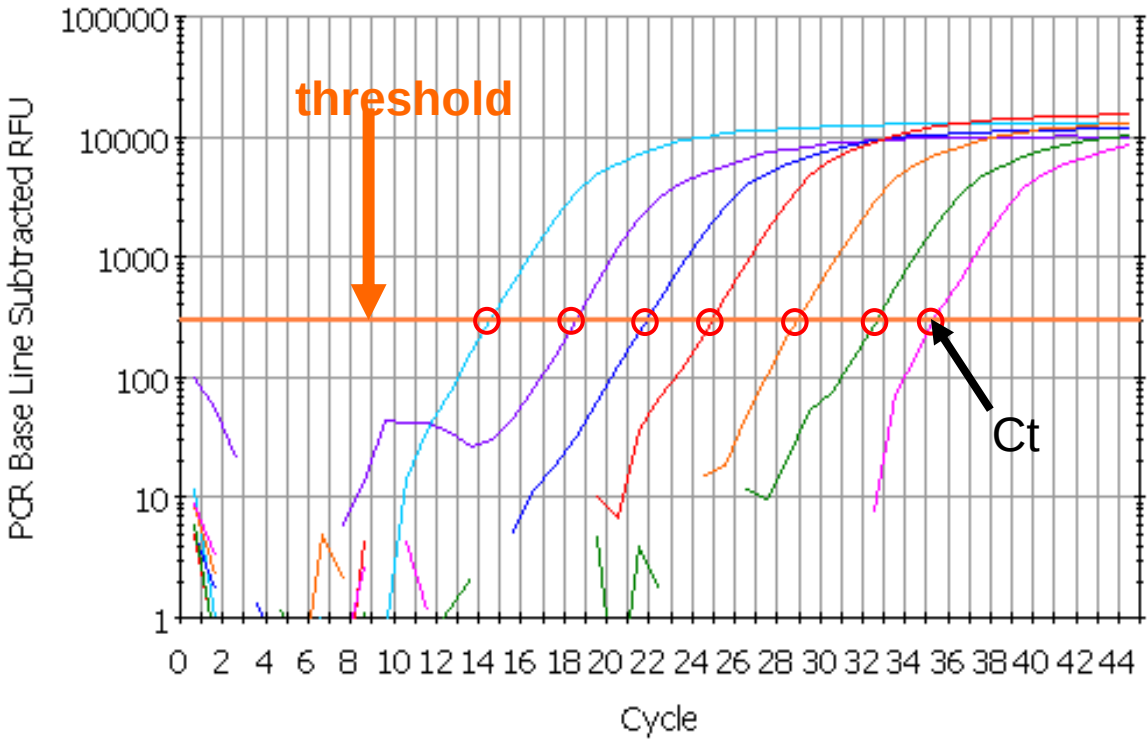
PCR em tempo real

PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

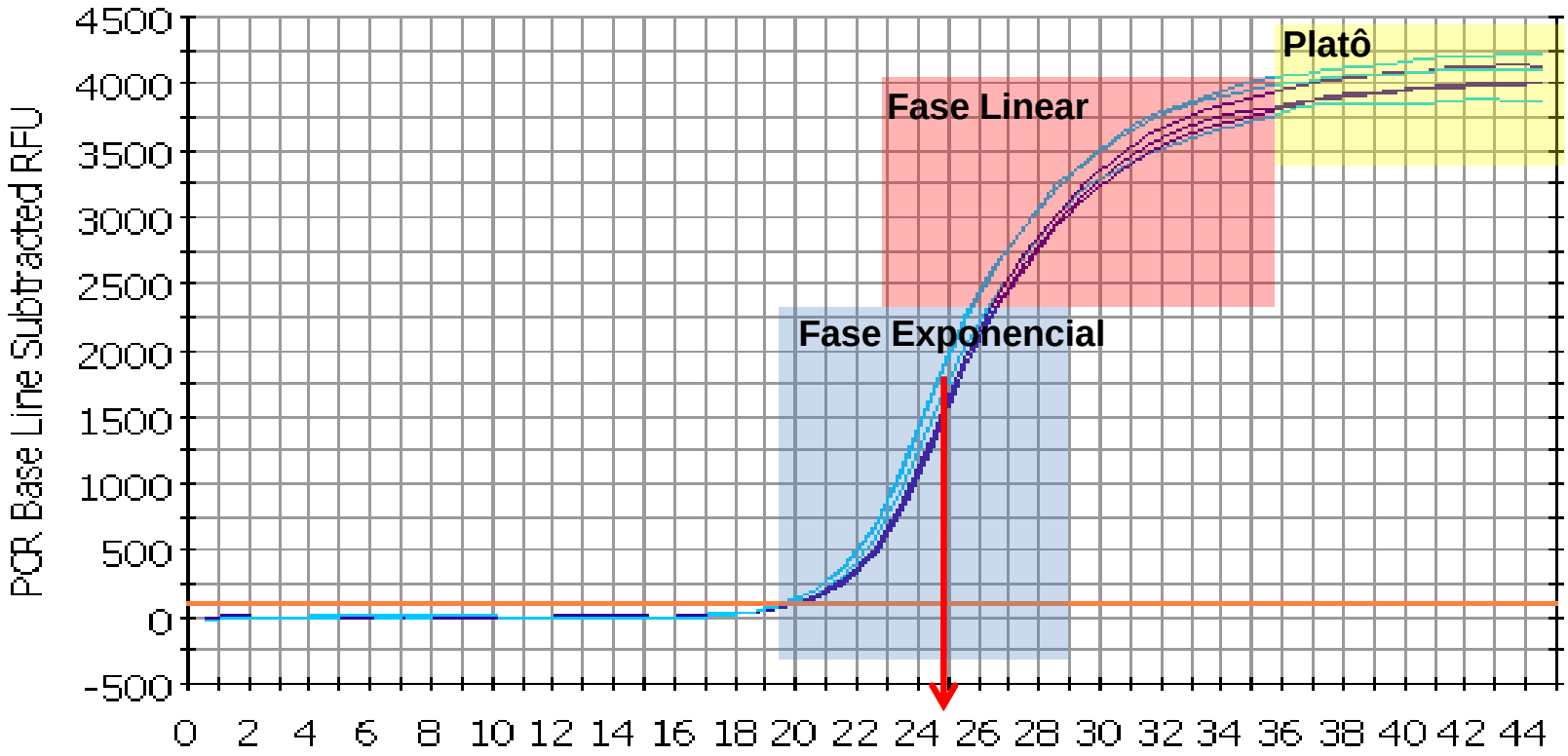
Existe uma relação quantitativa entre a quantidade inicial da amostra e a quantidade de produto de PCR após um determinado número de ciclos

$$P=T(1+E)^n$$

P= produto final
T= amostra inicial
E=eficiência do primer
n= número de ciclos



PCR em tempo real



Fase de detecção da Real Time – Alta eficiência

PCR em tempo real

Tipos de sistemas de detecção de fluorescência:

1. Ligantes de DNA
   - Brometo de Etídio
   - Sybr green
   - SYTO 9
   - EVA Green

2. Sondas de Hidrólise sequência específica
   - Taqman
   - FRET

BIO-RAD

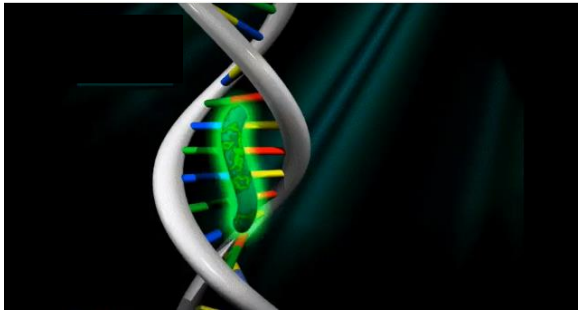
PCR em tempo real

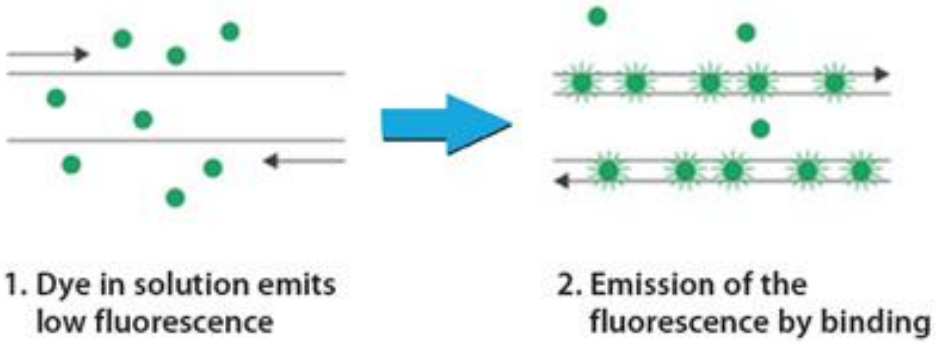
1. Ligantes de DNA

O mais usado é o SYBR

•Se liga ao sulco menor da **dupla fita**

• Permite curva de dissociação





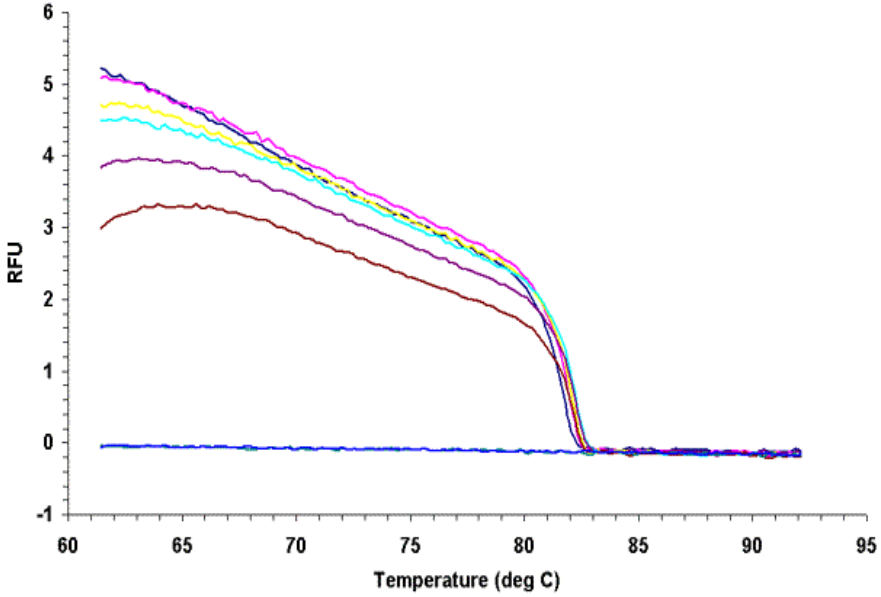
PCR em tempo real

1. Ligantes de DNA

Curva de Dissociação

T melting do produto determinada por:

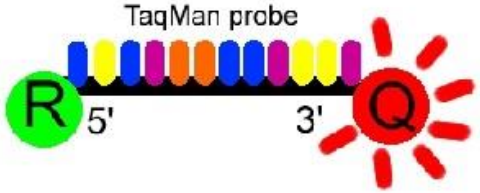
- Tamanho do fragmento
- Composição (conteúdo de A/T e C/G)

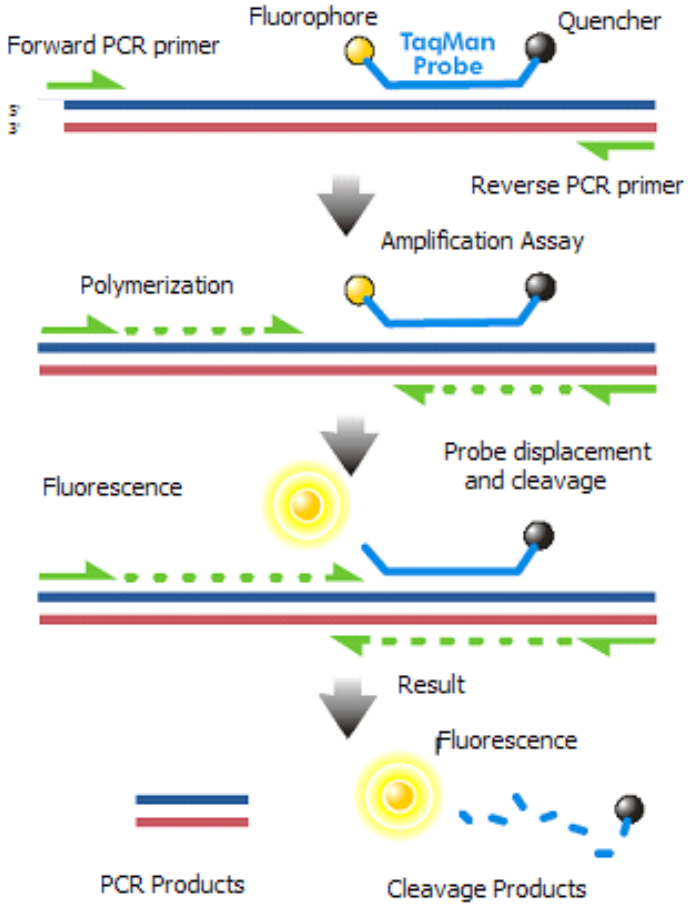


PCR em tempo real

2. Sondas de Hidrólise sequência específicas

O sistema mais usado é **Taqman**





- Baseado na atividade 5' – 3' exonuclease da Taq

BIO-RAD

PCR em tempo real

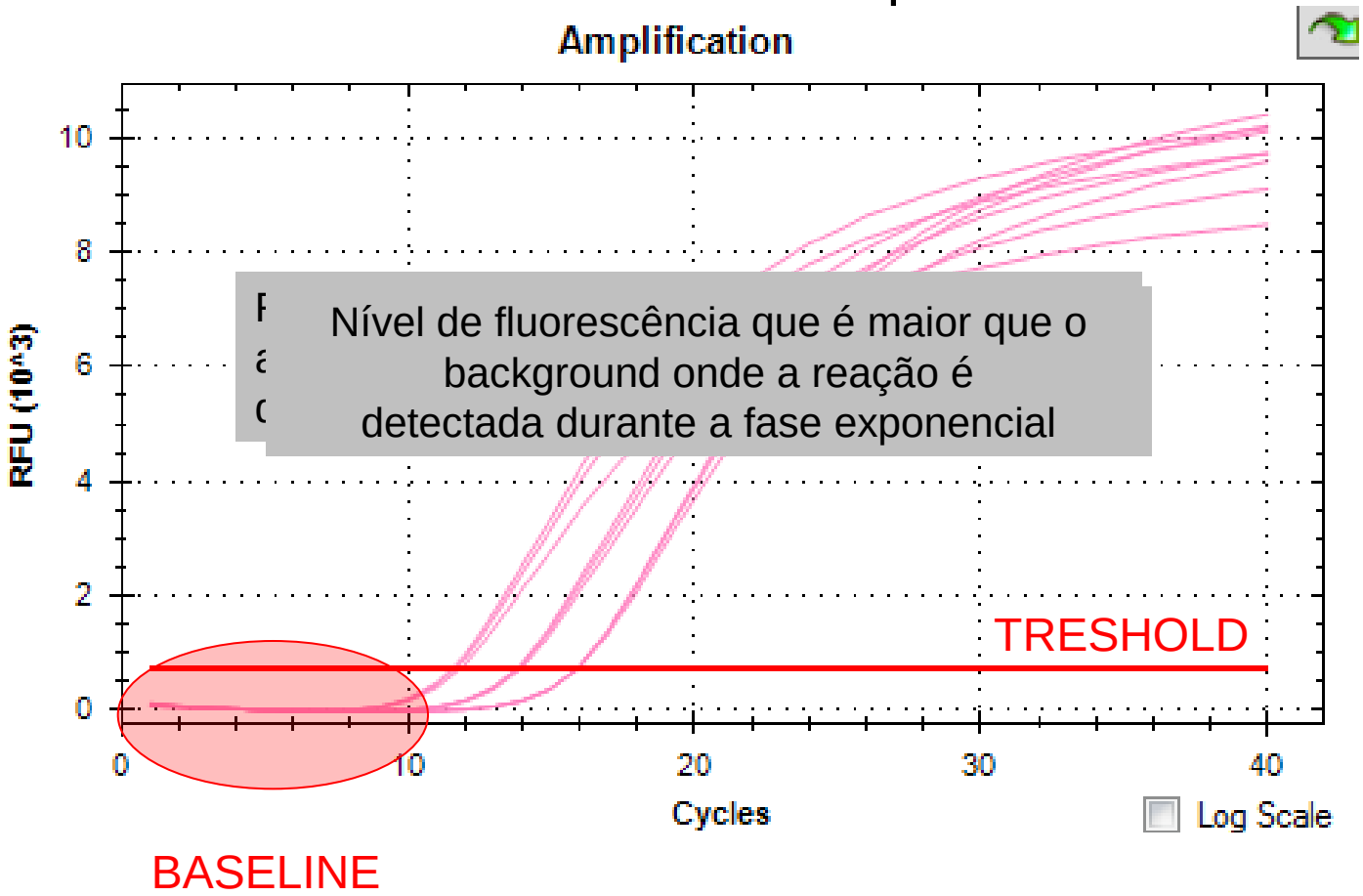
Comparação Sybr X Taqman

SYBR		**Taqman**
Inespecífico	Especificidade	Específico
Mais barato	Custo	Mais caro
Não permite	Multiplex	Permite
Sim, apenas com tamanhos diferentes	Distinção alélica	Sim

BIO-RAD

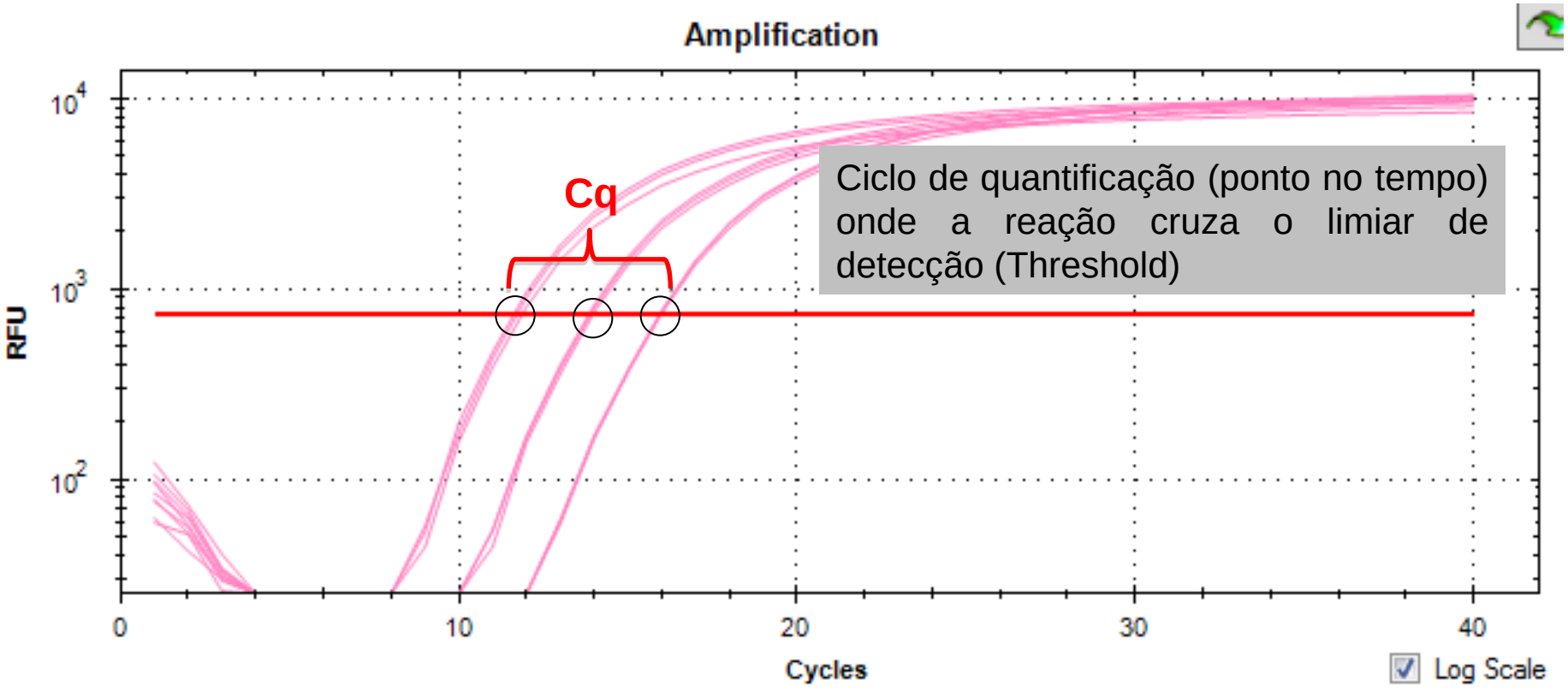
PCR em tempo real

Qual o resultado de uma PCR em tempo real???

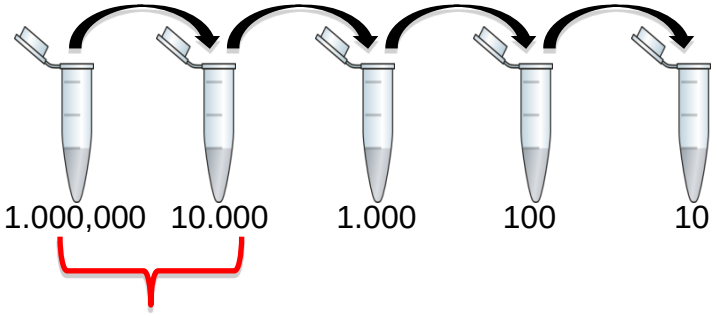


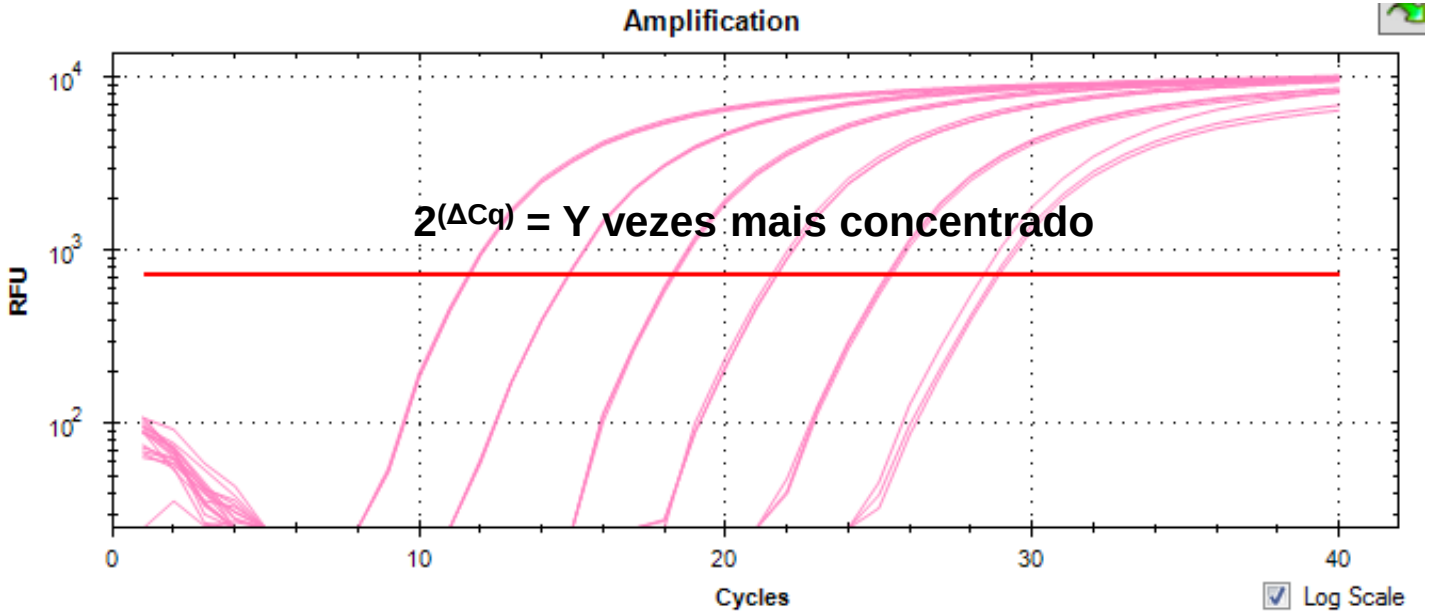
PCR em tempo real

Qual o resultado de uma PCR em tempo real???



PCR em tempo real





Aplicações da qPCR

Aplicações

• A qPCR pode ser utilizada em diversas aplicações dependendo do tipo de molécula utilizada

DNA

1. **Detecção/ quantificação de patógenos**
2. **Detecção de mutações (SNP, CNV)**
3. **Alterações da cromatina (metilação)**

RNA/cDNA

1. **Expressão Gênica (técnica gold)**
2. **Detecção de vírus de RNA**
3. **Pequenos RNAs**

PROTEÍNA

1. **Thermal shift**

Aplicações

As aplicações também podem ser classificadas quanto a quantitativas ou qualitativas

•**Quantitativas**

1.Quantificação relativa (estudos de expressão gênica)

2.Quantificação absoluta (carga viral/nº cópias)

•**Qualitativas**

1.Genotipagem (SNPs)

2.Detecção (diagnóstico: +/-)

3.Thermal shift

Aplicações

•**Quantitativas**

1. Quantificação relativa

   Avaliar mudanças entre dois grupos experimentais distintos

   Resultado em ordem de grandeza (quanto eu tenho de difrença de quantidade de um target em quantidades equivalentes entre células cancerosas vs. Normais)

   Normalização com **genes de referência**

2. Quantificação absoluta

   Avaliar mudanças entre dois grupos experimentais distintos

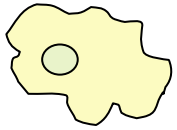
   Resultado é uma quantidade (nº de cópias, ug de ácido nucleico)

   Resultado através da interpolação o resultado obtido com uma **curva padrão**

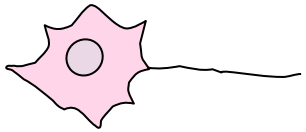
1. Quantificação relativa

Um pesquisador quer saber se a expressão do gene p53 é diferente entre cleluas normais e células cancerosas de ovário. Se sim, quanto é essa diferença?

Porque fazer essa pergunta??



≠ tipos celulares
genoma igual
Transcriptoma diferente



1. Quantificação relativa

Quando precisamos medir a expressão de um determinado RNAm, como garantir que uma possível diferença de Ct seja devido a diferença de expressão e não uma diferença de quantidade inicial de molde colocada???

Utilização de gene de referência

gene que se expresse homogeneamente entre as diferentes amostras e que não tenha sua expressão alterada pelas condições experimentais do estudo

Exemplos:

18S, 28S
GPDH
β- actina
MHC I
EF1-α

BIO-RAD

1. Quantificação relativa

Como selecionar esse genes?

Através de dados da literatura:

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | ONE

Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected *Nicotiana benthamiana* Using Quantitative Real-Time PCR

Deshui Liu, Lindan Shi, Chenggui Han, Jialin Yu, Dawei Li, Yongliang Zhang*

State Key Laboratory of Agro-Biotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing, China

Rho *et al. BMC Cancer* 2010, **10**:240
http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/240

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR

Hyun-Wook Rho, Byoung-Chan Lee, Eun-Seok Choi, Il-Ju Choi, Yeon-Su Lee and Sung-Ho Goh*

1. Quantificação relativa

Como selecionar esse genes?

Através de painéis comerciais de genes de referências:

Experimentos comerciais validados onde é possível testar diversos genes de referencia na sua amostra

BIO-RAD Reference Genes H96

Predesigned 96-well panel for use with SYBR® Green

GeneCode	Reference Genes H96	Reference Genes H384
ACTB	✓	✓
header	✗	✗
G6PD	✓	✓
GAPDH	✓	✓
GUSB	✓	✓
HMBS	✓	✓
HPRT1	✓	✓
IPO8	✓	✓
PGK1	✓	✓
RPL13A	✓	✓
RPLP0	✓	✓
TBP	✓	✓
TFRC	✓	✓
UBC	✓	✓
YWHAZ	✓	✓

1. Quantificação relativa

Como avaliar quais os melhores genes de referência?

- Selecionar pelo menos 4 genes de referencia para realizar o experimento completo
- Utilizar programas que selecionem os melhores genes de referência para suas amostras

Ex. NormFinder (Andersen et al. 2004)

GeNorm (Vandesompele et al. 2002)

BestKeeper (Pfaffl et al. 2004)

- Utilizar **pelo menos os 2** melhores genes de referência para analizar os resultados

CFX Manager já permite essa análise

Research

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes

Jo Vandesompele, Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe and Frank Speleman

Address: Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital 1K5, De Pintelaan 185, B-9000 Ghent, Belgium.

Correspondence: Frank Speleman. E-mail: franki.speleman@rug.ac.be

1. Quantificação relativa

Métodos de quantificação relativa?

Método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) = Eficiências entre genes de referência e target próxima a 100% e com um máximo de diferença entre eles de 5%

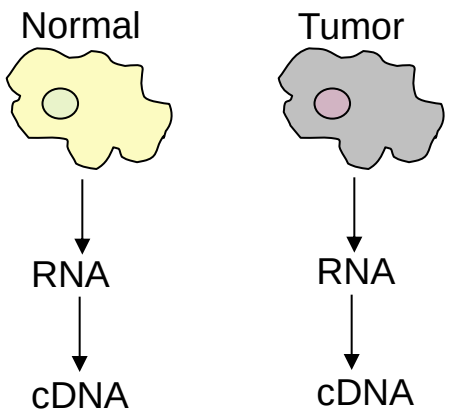
Método de Livak modificado ($E^{-\Delta\Delta Cq}$) = Eficiências entre genes de referência e target iguais (5% diferença) mas diferentes de 100%

Método de Pfaffl = Eficiências entre genes de referência e target diferentes

1. Quantificação relativa

Método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)

Um pesquisador quer saber se a expressão do gene p53 é diferente entre cleluas normais e células cancerosas de ovário. Se sim, quanto é essa diferença?



Amostra	Cq Gene Especifico	Cq Referência
Normal	29,71	25,54
Tumor	28,63	25,69

ΔCq = Cq Gen espe – Cq referência → ΔCq Normal = 29,71– 25,54 = 4,17

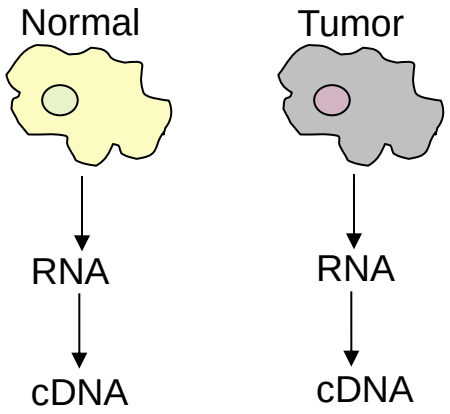
ΔCq Tumor = 28,63– 25,69 = 2,94

$\Delta\Delta Cq$ = ΔCq Amostra – ΔCq Controle → $\Delta\Delta Cq$= 2.94-4,17 = -1,23

Expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta Cq}$ → **Expressão relativa = 2.34x mais expresso que o normal**

1. Quantificação relativa

Método de Pfaffl



Amostra	Cq Especifico	Cq Referência	E específico	E referência
Normal	29,71	25,54	1,88	1,95
Tumor	28,63	25,69		

$$\text{Expressão relativa} = \frac{E_{gen\ esp}^{(\text{Cq Controle} - \text{Cq Amostra})}}{E_{referência}^{(\text{Cq Controle} - \text{Cq Amostra})}}$$

$$\text{Expressão relativa} = \frac{1{,}88^{(29{,}71 - 28{,}63)}}{1{,}95^{(25{,}54 - 25{,}69)}}$$

Expressão relativa = 2,18

2. Quantificação absoluta

- Baseia-se na comparação com um padrão cujo número de moléculas é conhecido.

Construção de uma **CURVA PADRÃO** (diluição seriada de uma amostra com concentração conhecida)

- Melhores resultados com normalização com um gene interno

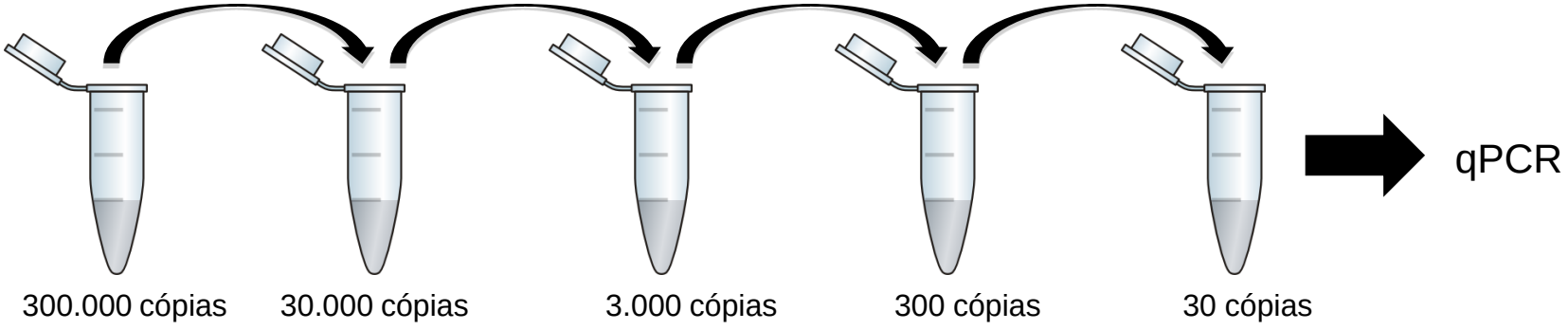
- Quantificação DNA = standard DNA
- Quantificação RNA = standard RNA

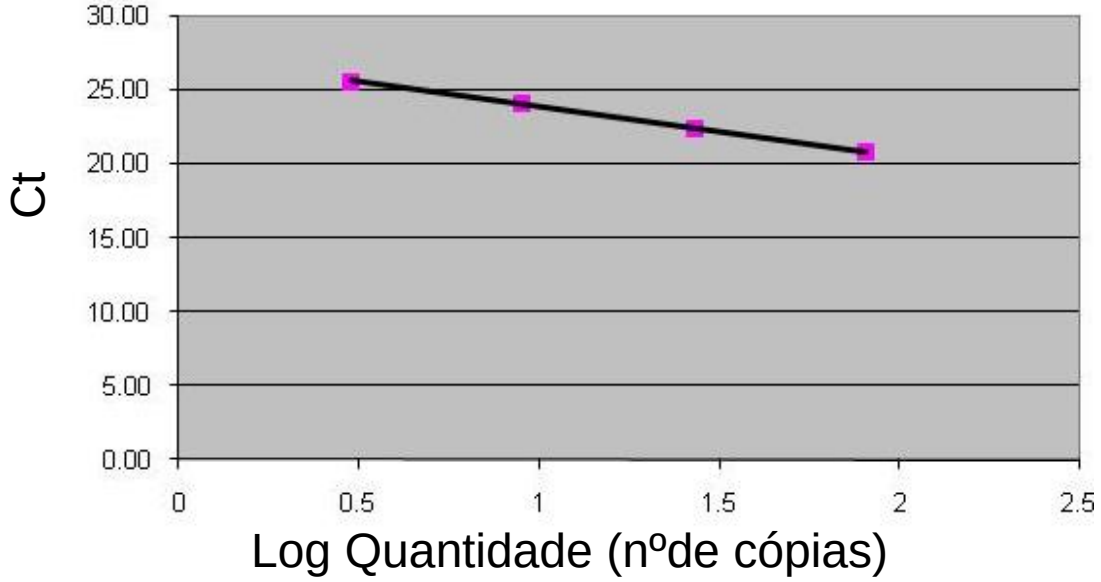
2. Quantificação absoluta

- O que pode ser o padrão?
  - RNA/DNAg comercial
  - Óligo sintético
  - Plasmídeos contendo a sequencia alvo

- Pontos importantes:
  - Precisão ao fazer a diluição
  - Qualidade das pipetas
  - Qualidade do padrão

2. Quantificação absoluta



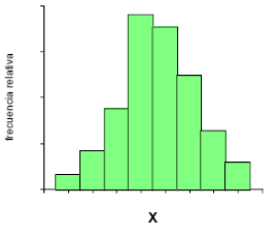


Análise estatística dos dados

1º Passo = Os experimentos de real time devem ser feitos em triplicata técnica e em triplicata biológica

2º Passo = Checar se os dados são ou não paramétricos

Apresentam distribuição normal → Teste: Shapiro-wilks



Apresentam homogeneidade de variâncias
(as possíveis variações verificadas não são explicadas pela variação experimental)

Métodos estatísticos

Amostras	Paramétrico	Não Paramétrico
2 amostras	t- Student	Wilcoxon
Mais de 2 amostras	ANOVA	Kruskal Wallis

Métodos estatísticos

Softwares específicos para análise de expressão gênica:

qBASE: da mesma empresa do geNorm - utiliza o Método de Pfaffl modificado para aceitar mais de um gene de referência para calcular a expressão.

Method

Open Access

qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data

Jan Hellemans, Geert Mortier, Anne De Paepe, Frank Speleman and Jo Vandesompele

Address: Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, De Pintelaan, B-9000 Ghent, Belgium.

Correspondence: Jo Vandesompele. Email: Joke.Vandesompele@UGent.be

Published: 9 February 2007

Genome ***Biology*** 2007, **8**:R19 (doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19)

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at http://genomebiology.com/2007/8/2/R19

Received: 31 August 2006
Revised: 7 December 2006
Accepted: 9 February 2007

© 2007 Hellemans *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Métodos estatísticos

Softwares específicos para análise de expressão gênica:

REST: programa muito citado – utiliza o **Método de Pfaffl** para calcular a expressão

© 2002 Oxford University Press

Nucleic Acids Research, 2002, Vol. 30, No. 9 00

Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR

Michael W. Pfaffl*, Graham W. Horgan[1] and Leo Dempfle[2]

BIO-RAD

Métodos estatísticos

Softwares específicos para análise de expressão gênica:

fgStatistics: programa grátis – primeiramente pensado para microarray – utiliza o **Método de Pfaffl** para calcular a expressão.

https://sites.google.com/site/fgstatistics/Home

Aplicações

• As aplicações também podem ser classificadas quanto a quantitativas ou qualitativas

•**Quantitativas**

1. Quantificação relativa (estudos de expressão gênica)

2. Quantificação absoluta (carga viral/nº cópias)

•**Qualitativas**

1. Genotipagem (SNPs)

2. Detecção (diagnóstico: +/-)

3. Thermal shift

•Qualitativas

1.Genotipagem (SNPs)

Utiliza o sistema de detecção de sonda de hidrólise

Aplicações:

- Farmacogenômica

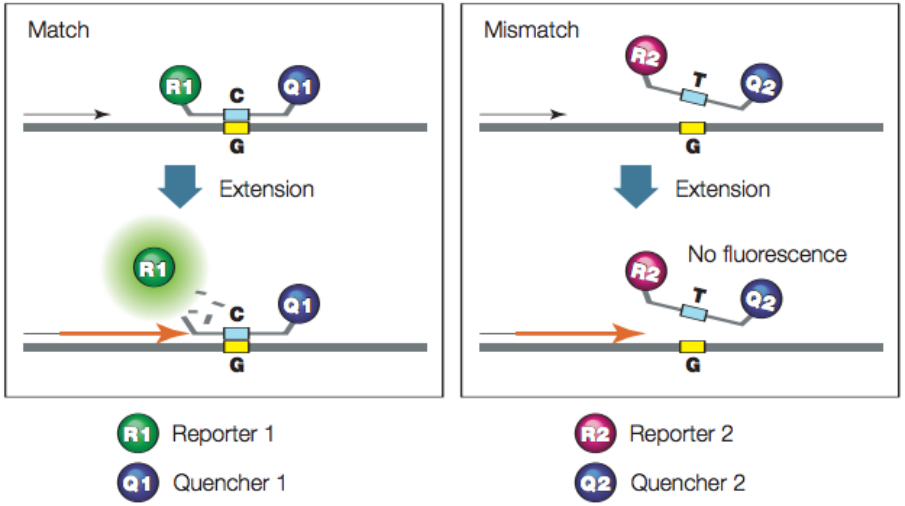
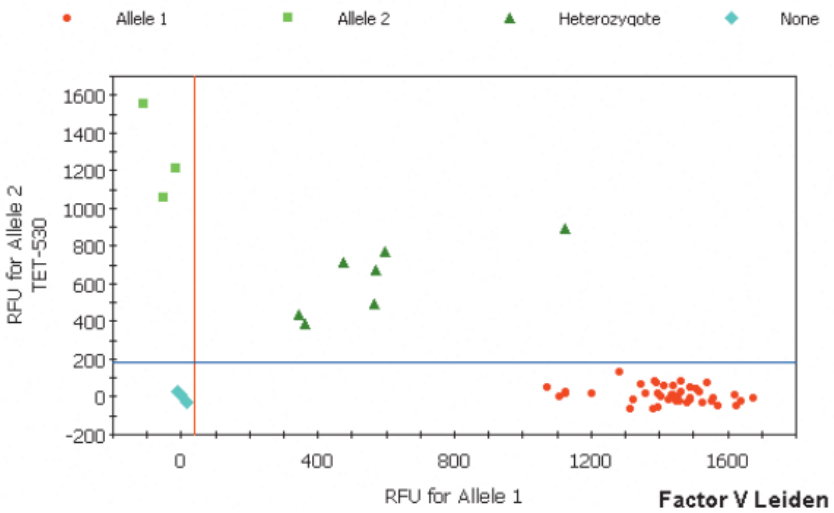


Fig. 6.1. Mechanism of allelic discrimination using TaqMan assay.

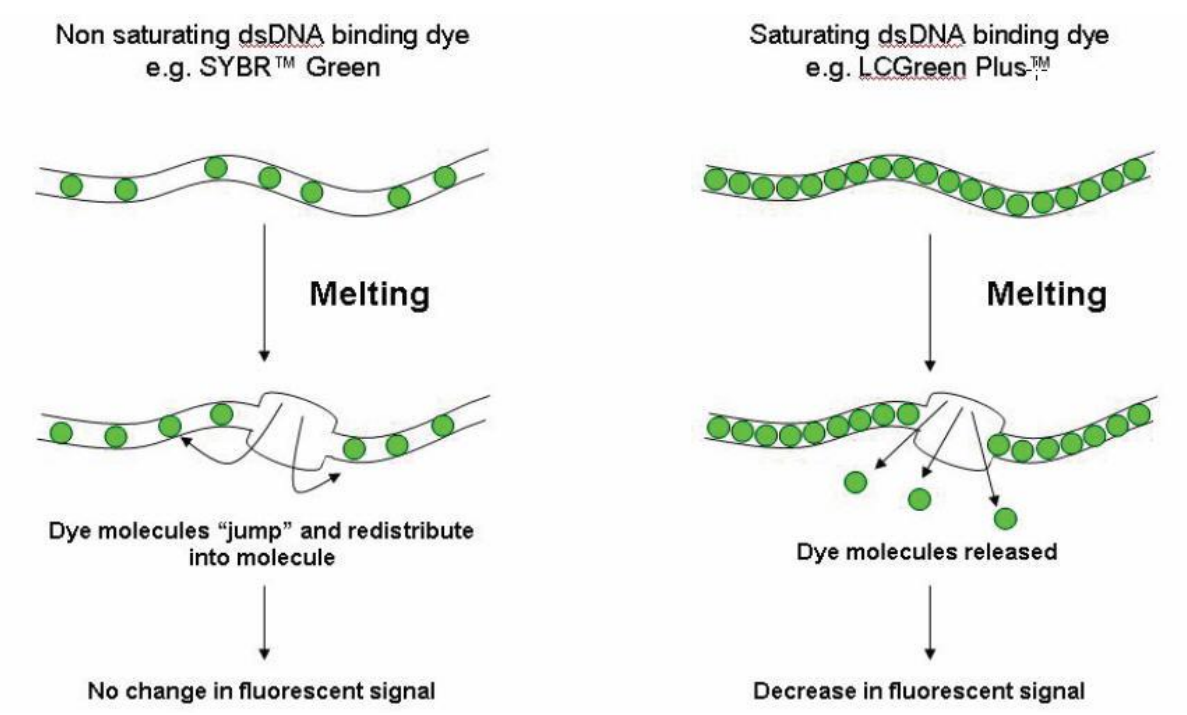


•Qualitativas

1.Genotipagem (SNPs)

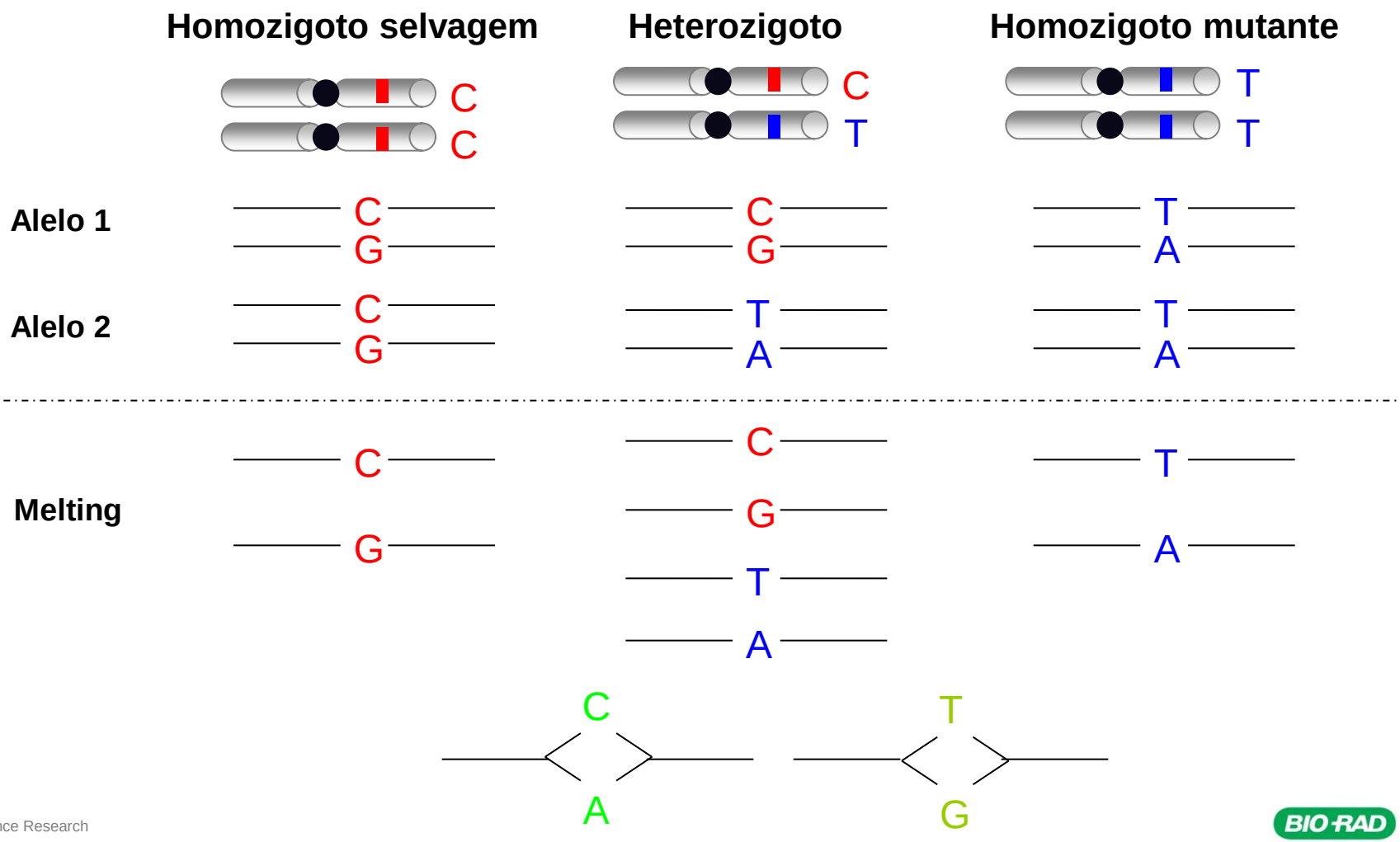
Curva de melting de alta resolução

•Utiliza intercalantes de DNA de alta saturação (Ex. EvaGreen, LCC Green, SYTO9)



•Qualitativas

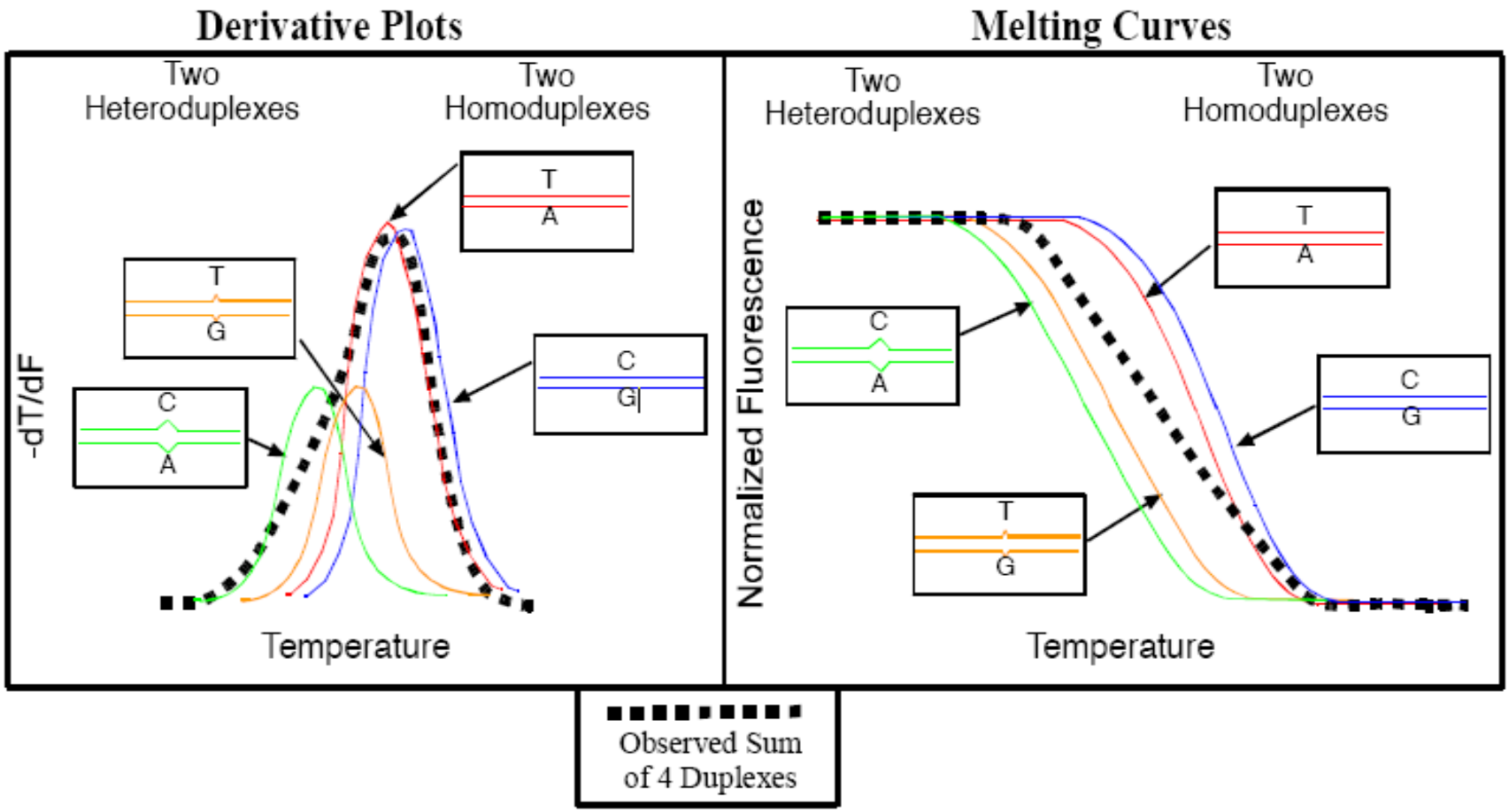
Curva de melting de alta resolução



•Qualitativas

Curva de melting de alta resolução

Gráfico da curva de melting | **Gráfico de HRM**

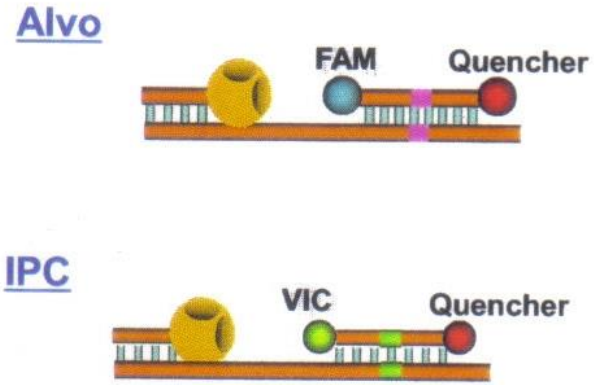


•Qualitativas

2.Detecção (+/-)

Aplicações :

- Detecção de patógenos
- Organismos geneticamente modificados



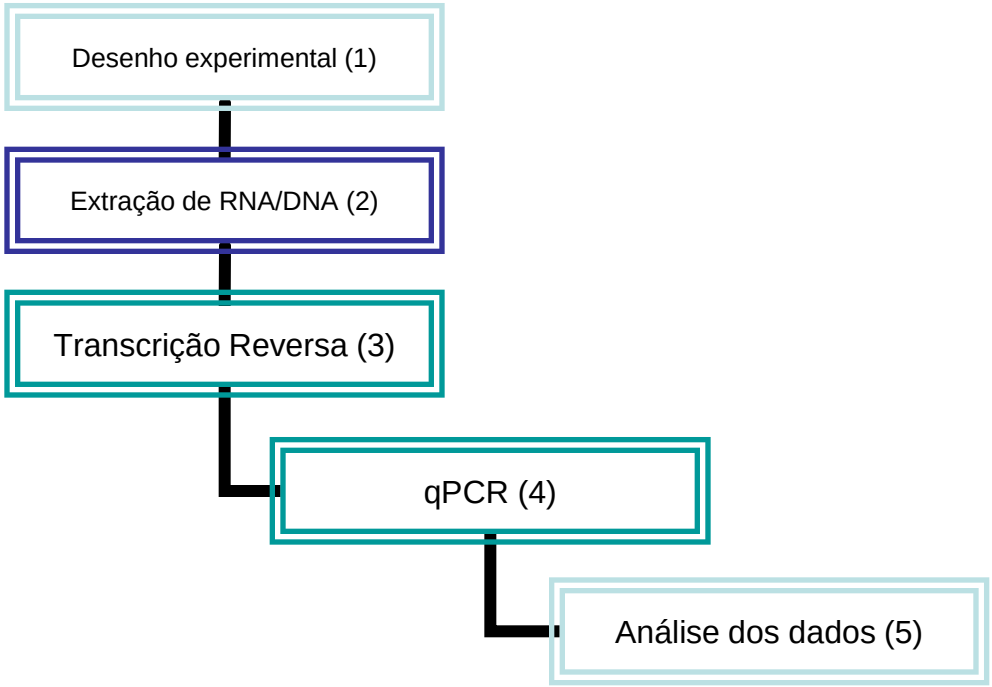
IPC: Internal Positive Control – Controle positivo da PCR.

Geralmente um DNA exógeno inserido na reação juntamente com um par de primers e sonda para amplificá-lo.

Desenho Experimental

qPCR técnica “gold” para quantificação da expressão gênica

- Técnica que exige vários passos:



- Deficiências em todos os passos podem afetar a performance de um experimento de qPCR

• Existe um artigo guia para a publicação de experimentos que envolvam qPCR – MIQE – Informação minima para a publicação de experiemtnos de qPCR

Clinical Chemistry 55:4
611–622 (2009)

Special Report

The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

Stephen A. Bustin,[1*] Vladimir Benes,[2] Jeremy A. Garson,[3,4] Jan Hellemans,[5] Jim Huggett,[6] Mikael Kubista,[7,8] Reinhold Mueller,[9] Tania Nolan,[10] Michael W. Pfaffl,[11] Gregory L. Shipley,[12] Jo Vandesompele,[5] and Carl T. Wittwer[13,14]

Desenho Experimental (1)

- Escolher se o experimento será single ou multiplex

  Quando fazer multiplex:
  1. Pouco material (RNA em pouca quantidade)
  2. Aumentar o rendimento sem aumentar o custo
  3. Minimizar o manuzeio de amostras, evitando contaminações

- Escolher o tipo de sistema de detecção que será utilizado

  -Intercalante de DNA = muitos genes, poucas amostras
  -Sondas = poucos genes, muitas amostras

- Seleção dos controles da reação e do experimento

Extração RNA (2)

Published online 11 February 2011

Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 9 ***e63***
doi:10.1093/nar/gkr065

Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR

Joëlle Vermeulen[1], Katleen De Preter[1], Steve Lefever[1], Justine Nuytens[1], Fanny De Vloed[1], Stefaan Derveaux[1,2], Jan Hellemans[1,2], Frank Speleman[1] and Jo Vandesompele[1,2,*]

[1]Centre for Medical Genetics, Ghent University Hospital, De Pintelaan 185, B-9000 Ghent, Belgium and [2]Biogazelle, Technologiepark 3, B-9052 Ghent, Belgium

Received August 13, 2010; Revised January 24, 2011; Accepted January 25, 2011

Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR

Simone Fleige · Vanessa Walf · Silvia Huch · Christian Prgomet · Julia Sehm · Michael W. Pfaffl

Extração RNA (2)

- As amostras devem ser estocadas em condições apropriadas (-80º)

- Processadas em pequenos grupos (10 a 20 amostras)

- Procedimento de extração de RNA deve incluir um passo de tratamento com DNase (remoção de contaminação com DNA genômico)

- Deve-se evitar ao máximo a contaminação com RNase (usar soluções com dietil pirocarbonato DEPC)

Extração RNA (2)

Soluções BIO-RAD para extração de RNA:

	Aurum™ Total RNA Kits			PureZOL™ RNA
	Mini	Fatty and Fibrous Tissue	96	Isolation Reagent
Format	Mini column Filtration (vacuum or spin)	Mini column Filtration (vacuum or spin)	96-well plate Filtration (vacuum or spin)	Single solution organic extraction
Maximum starting material amounts				
Cultured cells	2×10^6	1×10^7	1×10^6	1×10^7
Bacterial cells	2.4×10^9	2.4×10^9	8×10^8	2.4×10^9
Yeast cells	3×10^7	3×10^7	2×10^7	3×10^7
Hard animal tissue	20 mg	100 mg	–	100 mg
Soft to moderately hard animal tissue	40 mg	100 mg	–	100 mg
Plant tissue	40 mg	100 mg	–	100 mg
Isolation method	Silica membrane	Lysis with PureZOL reagent, purification on silica membrane	Silica membrane	Organic extraction
Number of preps	50 mini preps	50 mini preps	2 x 96-well plate	50 or 100 (1 ml/prep)
Number of washes	3	3	3	–
DNase I included*	Yes	Yes	Yes	No
DNase I digest time	15 min (animal tissue, 25 min)	15 min	10 min	–
Total preparation time**	<50–80 min (with DNase I digest)	<50–80 min (with DNase I digest)	<60 min (with DNase I digest)	<60 min
Binding capacity	>100 µg	>100 µg	>40 µg	–
Elution volume	2 x 40 µl	2 x 40 µl	80 µl	30–100 µl

* Removal not required.

** Total preparation time will vary depending on the tissue or cell type and on which format is used (vacuum or spin).
For sample-specific yield information, please visit **www.bio-rad.com/rna-isolation** and click the RNA Isolation Selection Guide.

BIO-RAD

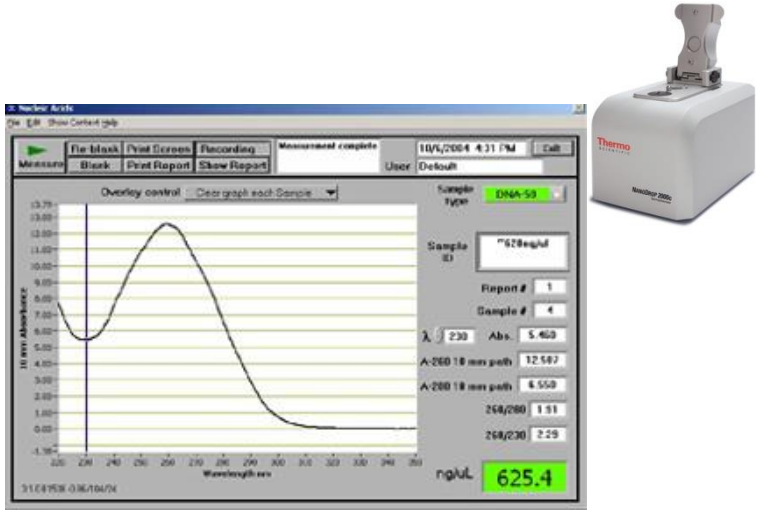
Extração RNA (2)

A qualidade do RNA extraído deve ser verificada nos seguintes aspectos:

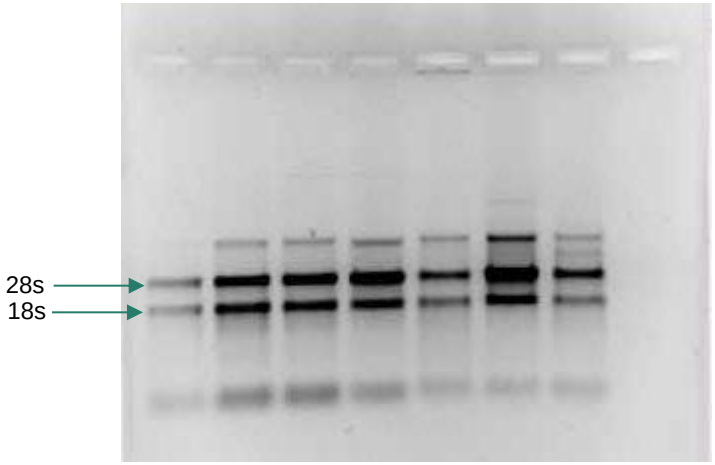
Pureza da amostra (Razão 260/280 = Entre 1,8 a 2,0)

Integridade da amostra

Pureza da amostra



Integridade da amostra

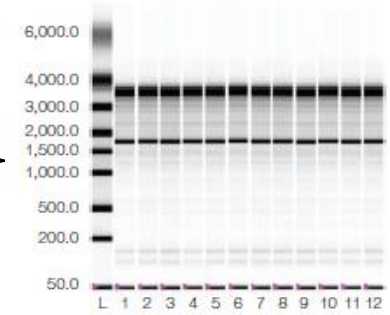


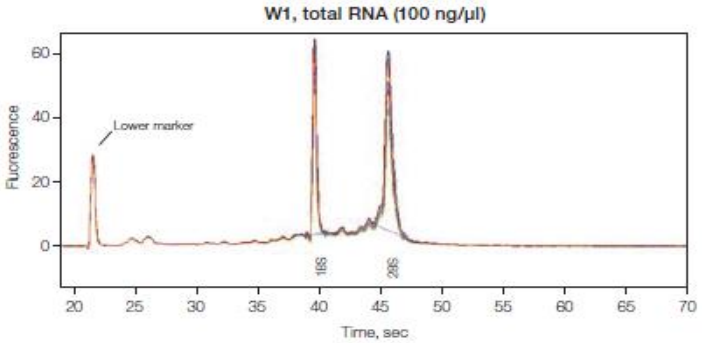
BIO-RAD

Extração RNA (2)

- Nem sempre ao se utilizar os métodos de quantificação e identificação da pureza por spectofotometro e verificação da integridade por gel são eficientes.
- Novas tecnologias trouxeram melhorias na quantificação e análise de integridade = Sistema de eletroforese em chip (Experion™)

Eletroforese





Transcrição Reversa (3)

- RNA ⟶ cDNA

- O principal nesse passo é garantir uma cobertura completa dos RNAs transcritos

Que tipo de primer será usado?

A conversão RNA=cDNA é eficiente?

BIO-RAD

Transcrição Reversa (3)

Que tipo de primer será usado?

Primers Randômicos

- Hexâmero de primers
- Todos os RNA servem como molde = A especificidade é dada pela qPCR
- Ótimo para gerar cDNA de RNAm longo

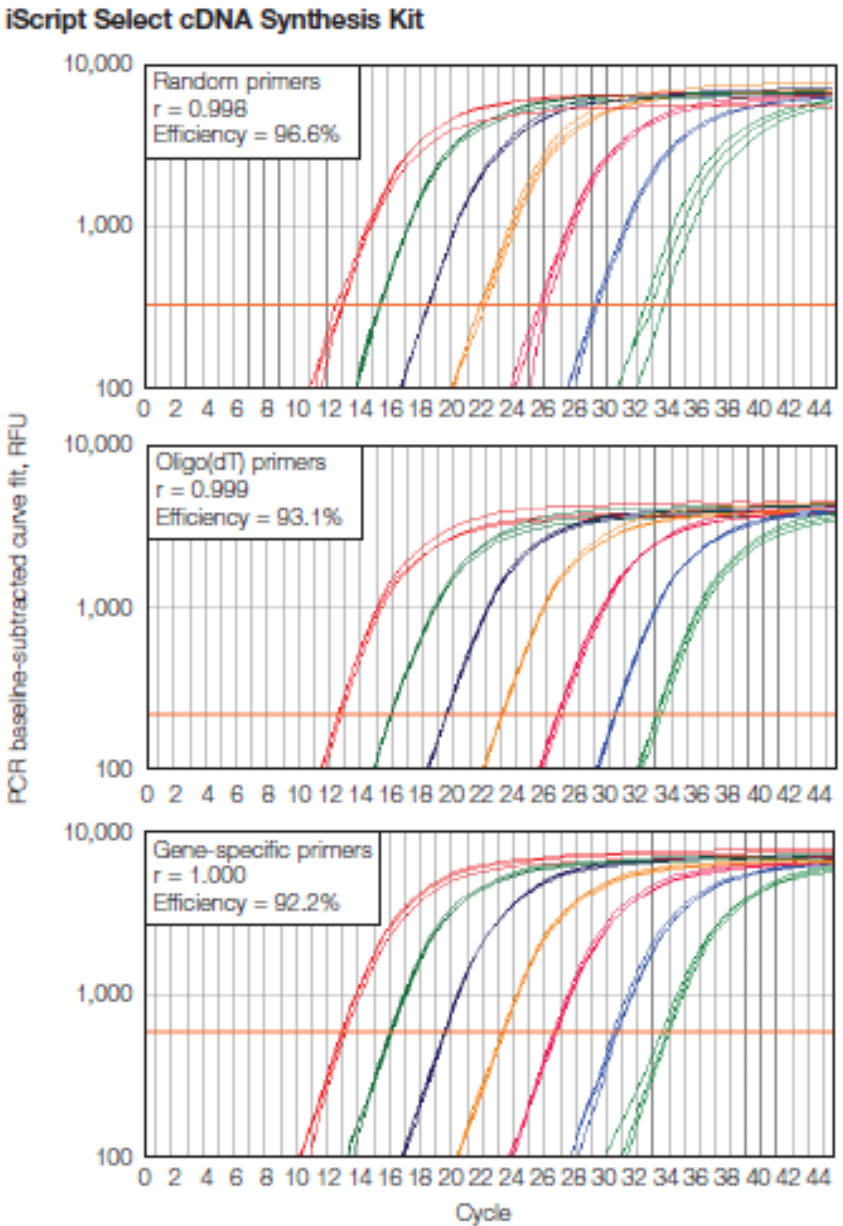
Oligo dT

- Primers que hibridam com a cauda poliA = Específico para RNAm

Ideal para qPCR

- Primer randômico + Oligo dT = Melhor sensibilidade e cobertura

Transcrição Reversa (3)

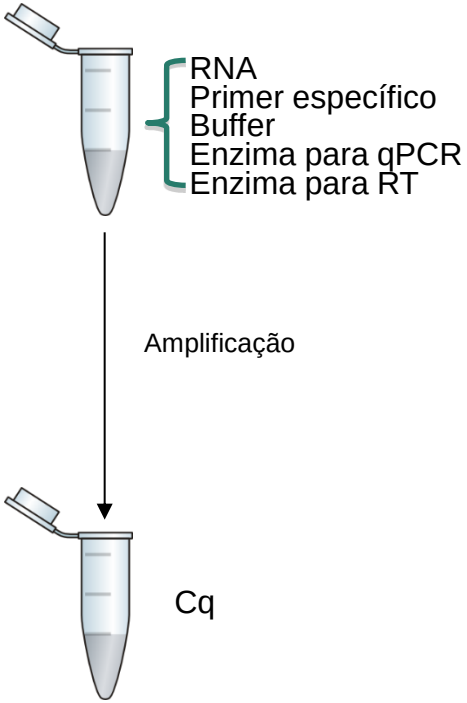


Transcrição Reversa (3)

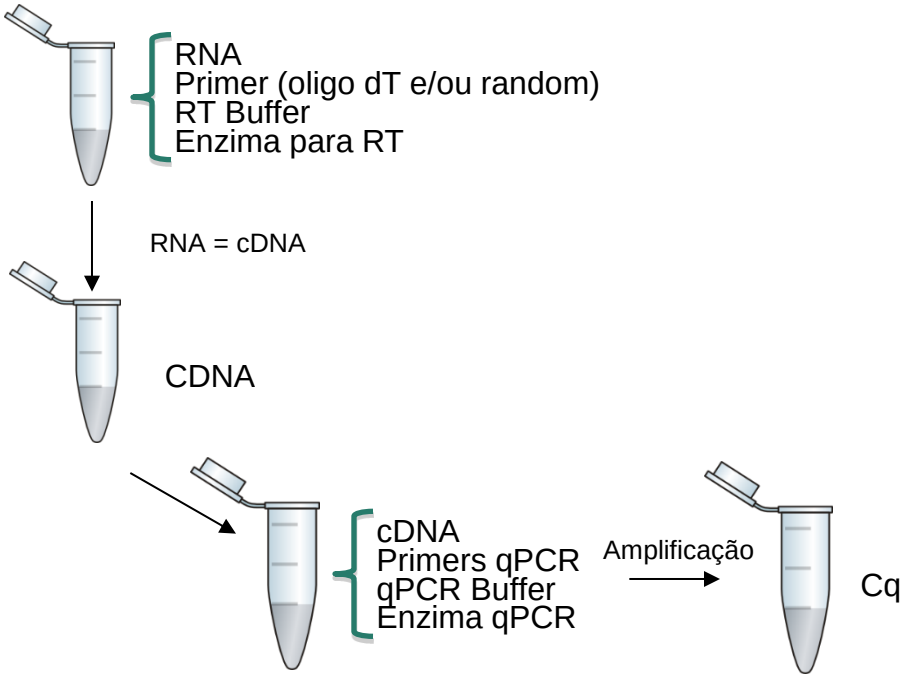
Eficiência na conversão RNA = cDNA

- 1 Step X 2 Step

1 Passo

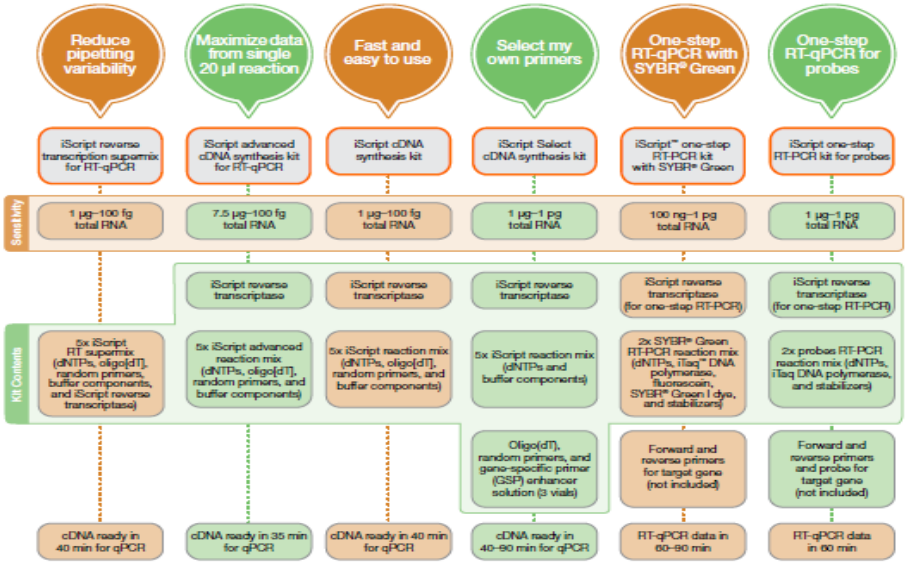


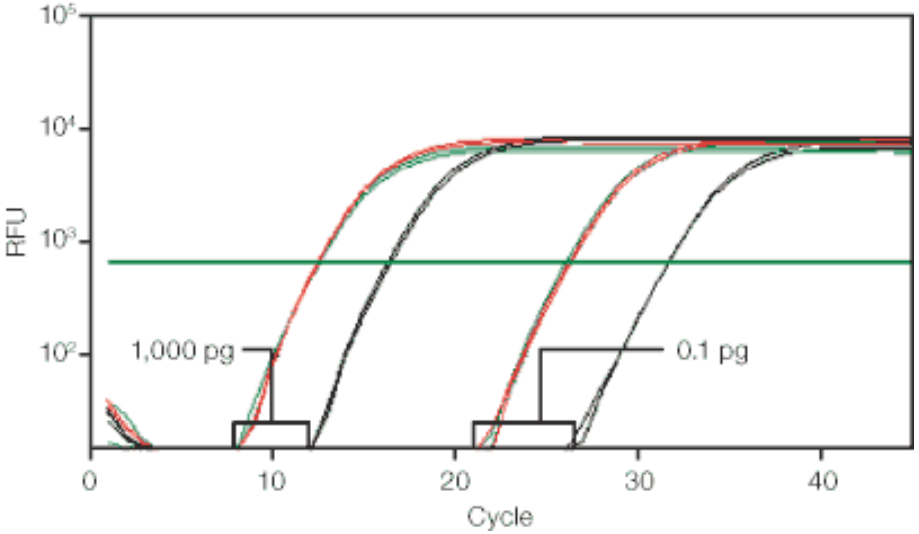
2 Passos



Transcrição Reversa (3)

Soluções BIO-RAD:





qPCR (4)

- Para resultados reprodutíveis e confiáveis deve-se levar em consideração:

A. Eficiência da reação = Relacionado com enzima e sistema de detecção
B. A eficiência do primer (e sonda) = Diretamente relacionado com o desenho

Property	SsoAdvanced™ Supermixes	iTaq™ Universal Supermixes	iQ™ Supermixes	Application-Specific Kits and Reagents
Tolerance for PCR inhibitors	•••	–	–	–
Sensitive detection of low-level target genes	•••	•••	••	•••
High efficiency even for difficult amplicons	•••	••	••	•••
Broad range of reaction conditions	•••	••	•	•
Standard and fast cycling	•••	•••	•	•
Compatibility with any real-time instrument	–	•••	–	–

qPCR (4)

Desenho dos primers para Real Time (SYBR/TaqMan)

Produto de PCR com no máximo 150pb → Produtos pequenos amplificados com mais eficiência

Conteúdo de GC → > de 50%

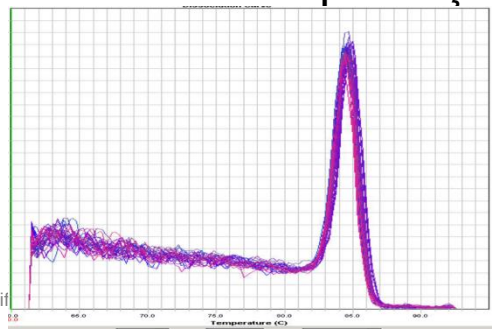
Começar e terminar o primer com C/G

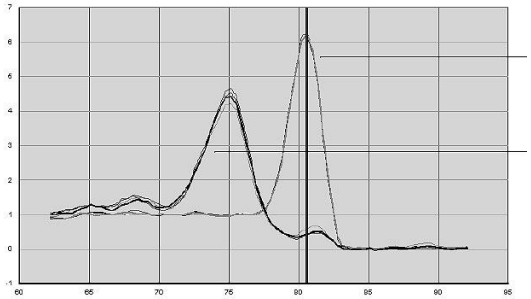
Evitar estruturas secundárias
- Self-dimer
- Hetero-dimer
- Hairpin temperatura de dissociação baixa

T annealing = 55 a 60ºC (se multiplex as temperaturas de todos devem ser iguais

Primer em éxons diferentes

Produto de amplificação único e específico (blast) (Super importante para SYBR)

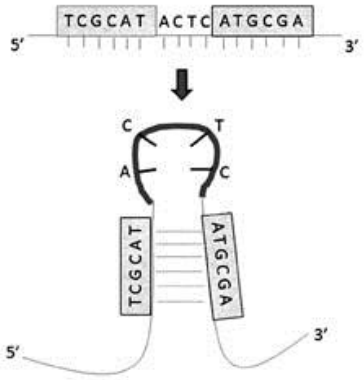




Formação de Dímeros de Primers

Possíveis Soluções:

- Reduzir a concentração dos primers
- Avaliar a complementaridade e a formação de estruturas secundárias
- Redesenhar os primers se necessário



Primer em Hairpin

```
1. ΔG = -10,36 kcal/mol
            5' CACCATATGGCAACTCTTAAG 3'
                 ||||||||
   3' GAATTCTCAACGGTATACCAC 5'

2. ΔG = -6,38 kcal/mol  (3' Dimer)
   5' CACCATATGGCAACTCTTAAG 3'
                      ||||||
                 3' GAATTCTCAACGGTATACCAC 5'
```

qPCR (4)

Desenho de Sonda (TaqMan)

T annealing = 5 a 10º maior que a do primer (se multiplex todas devem ser iguais)

Conteúdo de GC → > de 50%

Não possuir G no extremo 5'

Sonda tem que ter < 30nt

Desenhar a sonda sobre a fita que tenha mais Gs do que Cs

Fluoróforos e Quenchers

Filtro	Fluoróforo	Quencher
1	FAM	BHQ1
2	TET	BHQ1
2	HEX	BHQ1
3	TEXAS RED	BHQ2
3	ROX	BHQ2
4	CY5	BHQ2

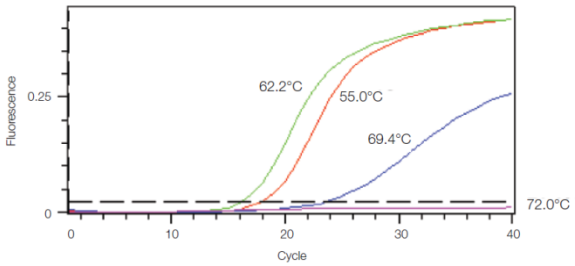
BIO-RAD

qPCR (4)

Otimização e Validação do Experimento

- Checar qual a melhor temperatura e concentração de anelamento dos primers (gradiente)

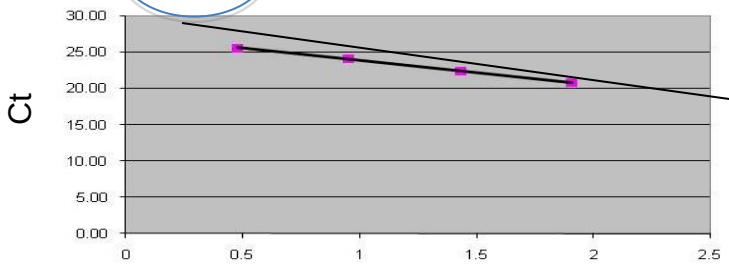
Produz os menores Ct, sem formação de dímero



- Checar a eficiência do primer na melhor condição

Diluições seriadas de um estoque de cDNA

$y = -3.3407x + 27.17 \quad R^2 = 0.9991$



Log [ ] DNA

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

BIO-RAD

qPCR (4)

Otimização e Validação do Experimento

- Checar a sensibilidade do experimento
  - Diluição de cDNA na ordem de 10X deveriam produzir Ct com uma ≠ de 3.3
  - Todas as amostras a serem quantificadas devem se encaixar na faixa de concentração onde essa premissa é mantida

- Checar a repetibilidade do experimento
  - Utilização de réplicas experimentais – As curvas de amplificação das réplicas devem se sobrepor

qPCR (4)

Otimização e Validação de experimentos multiplex

- Otimizar e validar cada reação individual (como explicado anteriormente)

- Testar na mesma placa se Cq de um experimento individual ≠multiplex

  Se não = Otimizado e validado

  Se sim = NÃO otimizado e validado

- **Para otimizar** = alterar condições da reação (Enzima, dNTP, Mg^{+2}) e testar novamente experimento individual Vs. multiplex

BIO-RAD

Dúvidas?!

Contato: juliana_giusti@bio-rad.com