

## PCR em Tempo Real / PCR quantitativa (qPCR)

Dra. Elisabet Marti Serrano  
emartiserrano@gmail.com



### PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplificação *in vitro* de uma sequência específica de DNA

- *Primers* o iniciadores
- DNA polimerase
- dNTP's
- Tampão e íones
- Amostra de DNA



PCR

### PCR (Polymerase Chain Reaction)

The diagram illustrates the PCR process in three stages: **Desnaturalització** (denaturation), **Hibridació** (annealing), and **Elongació** (extension). It starts with **DNA de doble cadena** (double-stranded DNA) and uses **Encebador sentit** (forward primer) and **Encebador antisentit** (reverse primer). The final stage shows the **PCR product** (1450 bp). To the right, a gel electrophoresis image shows a **Middle-Range DNA Marker** (M) and a **PCR product** (1) lane. The marker lane has bands at 3,000, 2,000, 1,500, 1,000, 700, 500, 300, and 100 bp. The PCR product lane shows a single band at 1450 bp.

30-40 ciclos → 2<sup>40</sup> moléculas de DNA → **electrofores** em gel de agarose ou de poliacrilamida.

PCR

### qPCR

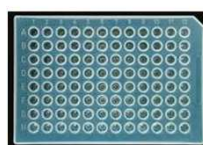
- Baseada na PCR convencional, com o monitoramento da amplificação em tempo real do fragmento de interesse.
- Monitoramento da **fluorescência** que aumenta proporcionalmente a quantidade de material genético amplificado

The diagram shows the **Real Time PCR** process. It starts with a **Primer** and **Old DNA**. The process involves the amplification of DNA, resulting in a large number of fluorescently labeled DNA molecules, indicated by yellow starburst symbols.

Real Time PCR

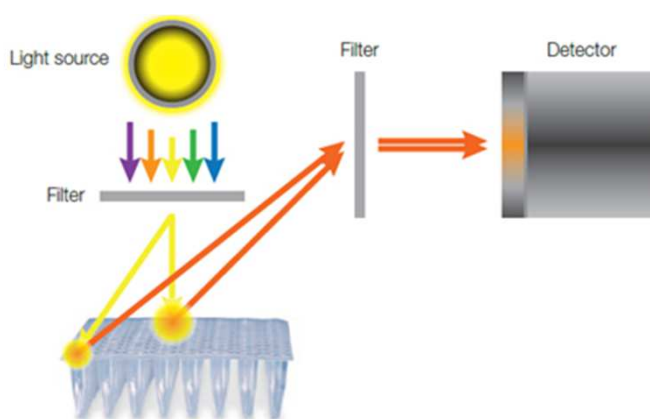
## COMPONENTES qPCR

- Amostra de DNA
- *Primers* o iniciadores
- DNA polimerase
- dNTP's
- Tampão e íones
- **Compostos fluorescentes**



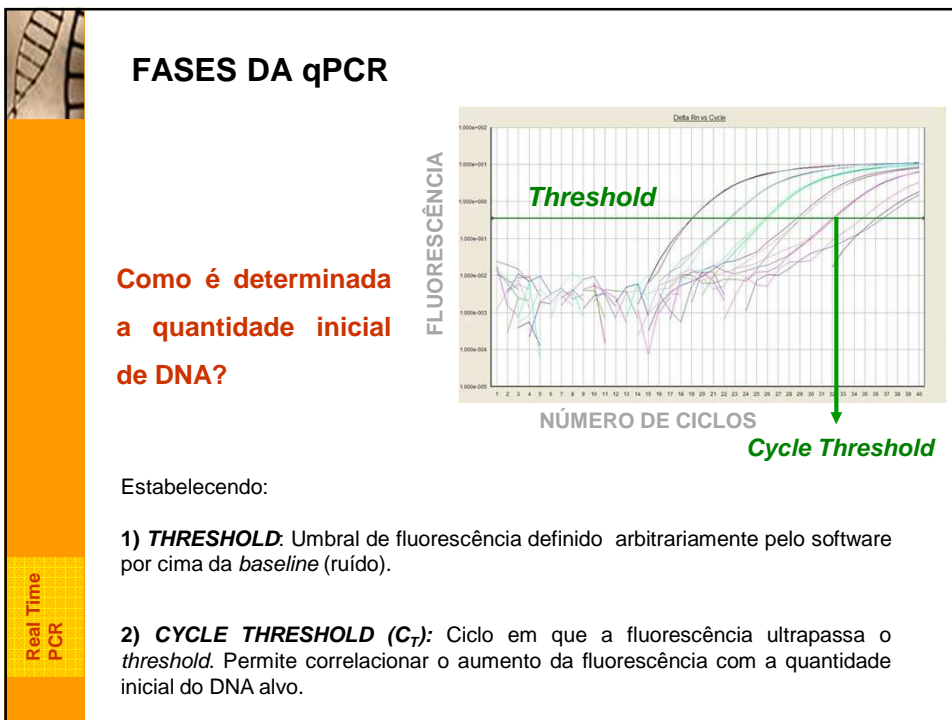
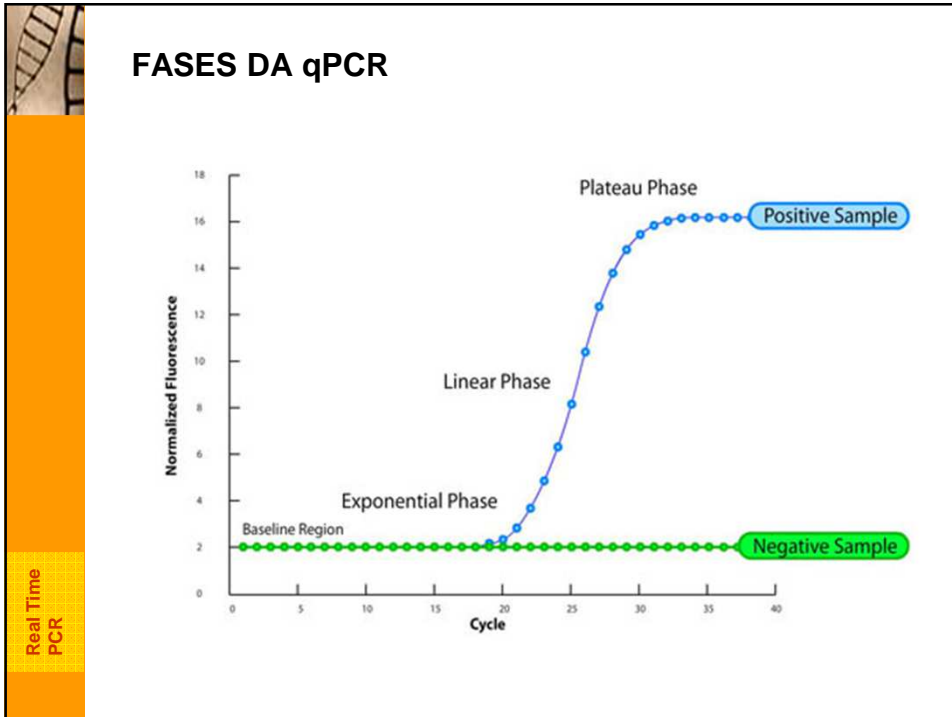
Real Time  
PCR

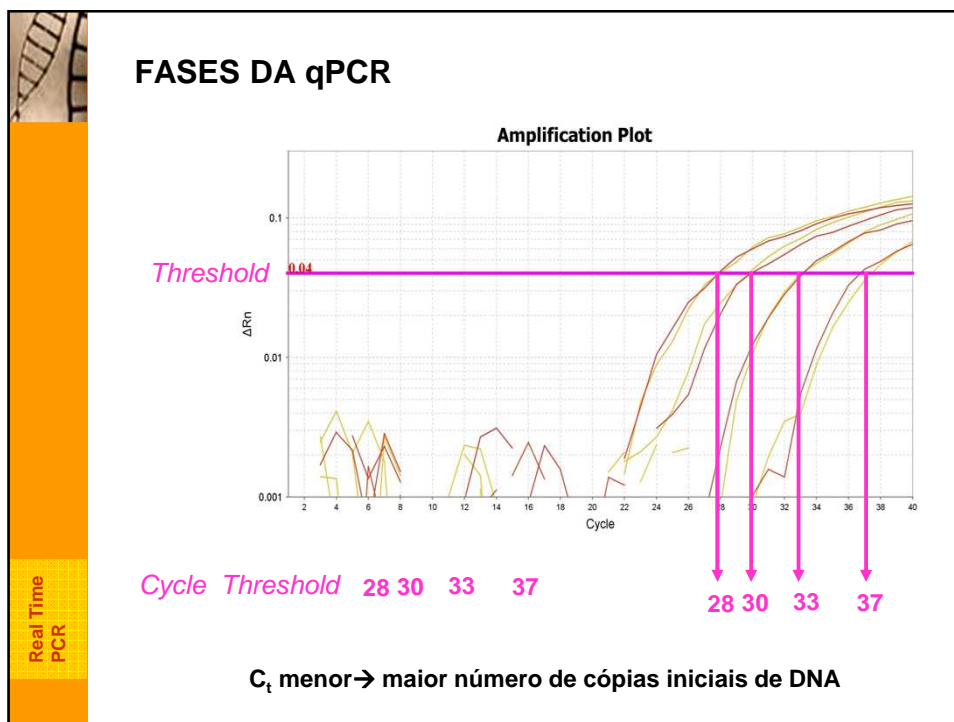
## TERMOCICLADOR qPCR



**Termociclador** com sistema óptico composto por uma fonte de iluminação ultra-violeta e um detector de **fluorescência** + um computador com *software* próprio para a aquisição de dados.

Real Time  
PCR





### QUANTIFICAÇÃO

1) **ABSOLUTA:**

Determinar o número exacto de moléculas (número de cópias de DNA ou nanogramas de DNA) em uma amostra.

**Método da curva padrão**

1) **RELATIVA**

Analisar alterações na expressão de um gene entre uma determinada amostra e uma amostra de referência.

**Método de  $C_T$  comparativo**

Real Time PCR

### QUANTIFICAÇÃO

1) **ABSOLUTA:**

- Amplificar padrões com quantidade do DNA alvo conhecida.
- Representar o  $C_T$  obtido com esses padrões num gráfico vs o logaritmo da quantidade de DNA → **CURVA PADRÃO**

**A**

Relative fluorescence intensity ( $\Delta Rn$ )

Number of cycles

**B**

Threshold cycle number ( $C_t$ )

### QUANTIFICAÇÃO

1) **ABSOLUTA:**

**GERAÇÃO PADRÕES**

gene de interesse → PCR convencional → 300 pb → VETOR (plasmídeo) 3015 pb → CLONAGEM → 3315 pb

TRANSFORMAÇÃO → MULTIPLICAÇÃO → EXTRAÇÃO PLASMÍDEO → QUANTIFICAÇÃO PLASMÍDEO (ng/ $\mu$ L)

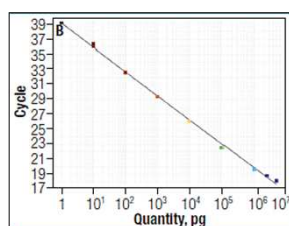
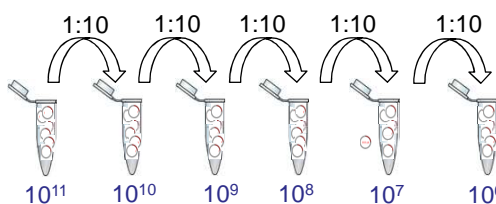
## QUANTIFICAÇÃO

### 1) ABSOLUTA:

#### GERAÇÃO CURVA PADRÃO

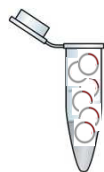
$$\text{Núm. copias} = \frac{[\text{DNA (g/}\mu\text{L)} \times 6'022 \cdot 10^{23} \text{ (pb/mol)}]}{[\text{lenght (pb)} \times 660 \text{ (g/mol)}]}$$

#### DILUIÇÕES SERIADAS



Real Time  
PCR

## PRÁTICA: qPCR HAdv



800 ng/uL  
Vetor + inserto: 11561 pb

Quantas cópias de plasmídeo (o gene alvo) temos?

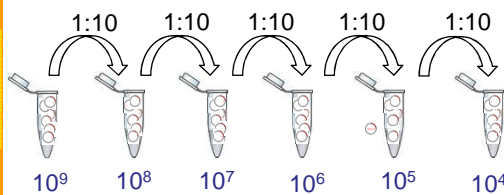
$$\text{Número de cópias} = \frac{\text{DNA (g/}\mu\text{L)} \times 6'022 \cdot 10^{23}}{\text{lenght (pb)} \times 660}$$

$$800 \cdot 10^{-9} \times 6'022 \cdot 10^{23} / 11561 \times 660 = 6,31 \cdot 10^{10} \text{ cópias/}\mu\text{L}$$

$$\begin{array}{l} 6'31 \cdot 10^{10} - 1 \mu\text{L} \\ 10^{11} - X \end{array}$$

$$X = 10^{11} \times 1 / 6'31 \cdot 10^{10}$$

$$X = 15'8 \text{ uL} \rightarrow 15'8 \text{ uL plasmídeo} + 984'2 \text{ tampão} = \\ = 10^{11} \text{ cópias} / 1000 \text{ uL} \\ = 10^9 \text{ cópias} / 10 \text{ uL}$$



CURVA PADRÃO HAdv

Real Time  
PCR

Real Time PCR

## QUANTIFICAÇÃO

**1) ABSOLUTA:**

**A**

Relative fluorescence intensity (RFI)  
Number of cycles

Amplificar padrões junto com amostras com quantidade do DNA alvo desconhecida.

**B**

Threshold cycle number (Ct)  
Log copy number

Comparar  $C_T$  de cada amostra com a curva padrão → quantidade de cópias iniciais da sequência alvo.

Real Time PCR

## EFICIÊNCIA

Condições ideais: **eficiência** da reação é 100% ( $E = 1$ ) com a quantidade de produto gerado aumentado exponencialmente, dobrando a cada ciclo.

Standard Curve

Ct values  
Log copy number

**Example:**  
Slope = -3.3386  
 $E = 10^{(-1/-3.3)} - 1$   
 $= 10^{(0.30)} - 1$   
 $= 1.995 - 1$   
 $= 0.995$  or 99.5%

Efficiency =  $10^{(-1/\text{slope})} - 1$

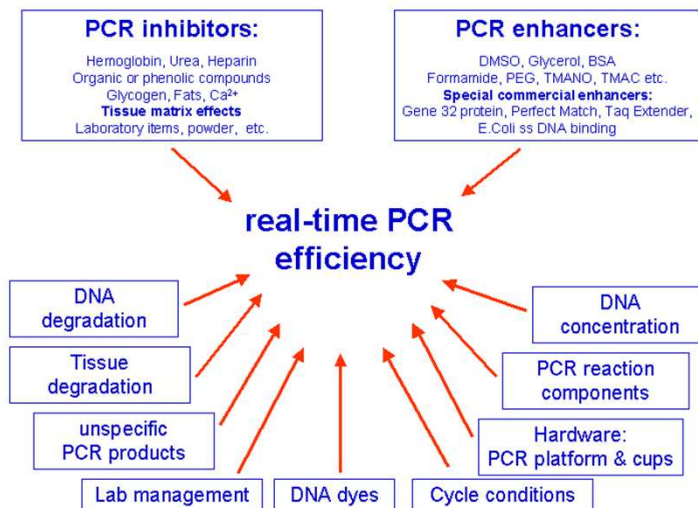
If slope = -3.32  
efficiency becomes 1

Slope	Efficiency
-3.32	100%
-3.5	93%
-3.6	90%
-3.8	83%
-4.0	78%



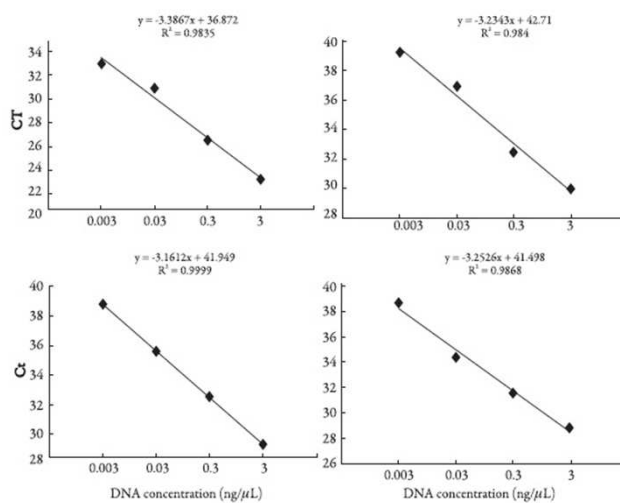
## EFICIÊNCIA

Na prática: eficiência 90-110% aceitável.



## COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R<sup>2</sup>)

- **Coefficiente de correlação:** medida de como os pontos se ajustam na curva padrão. Refleta a linearidade da curva padrão. R<sup>2</sup> ideal = 1.



## QUANTIFICAÇÃO

### 2) RELATIVA:

- Compara mudanças na expressão de genes.

- **Método  $C_T$  Comparativo:**

É necessária a amplificação de **genes de referência** (*housekeeping genes*): gene com expressão estável em diferentes situações testadas (Ex.: rRNA 18S, GAPDH, beta-actina, TBP, HPRT, beta-2-microglobulina).

- Resultados expressados em ordem de grandeza: *vezes, dobro, metade, fold-change*. Ex.: *gene x 5 vezes mais expressado no tratamento que no controle.*

Real Time  
PCR

## QUANTIFICAÇÃO

### 2) RELATIVA:

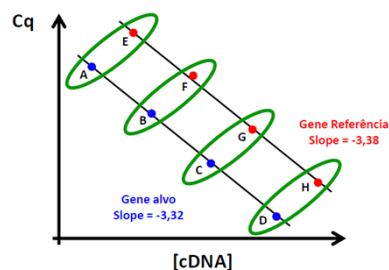
#### Método $C_T$ Comparativo (método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )

Comparação dos  $C_T$  das amostras com os  $C_T$  um controle, normalizados por  $C_T$  obtidos com a amplificação de genes de referência.

$$\Delta C_T = \Delta C_{T\text{alvo}} - \Delta C_{T\text{referência}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{amostra}} - \Delta C_{T\text{controle}}$$

$$\text{Expressão Relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$



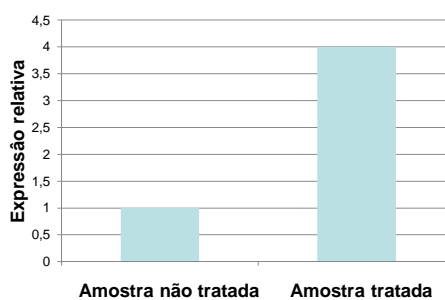
Para utilizar o método de  $C_T$  comparativo é necessário que a eficiência da reação do gene de interesse seja similar a eficiência da reação a do gene de referência.

Real Time  
PCR

## QUANTIFICAÇÃO

### 2) RELATIVA:

	$C_T$ Gene alvo	$C_T$ Gene referência	$\Delta C_T$	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
Amostra tratada	26	31	-5	0	1
Amostra não tratada	23	30	-7	-2	4

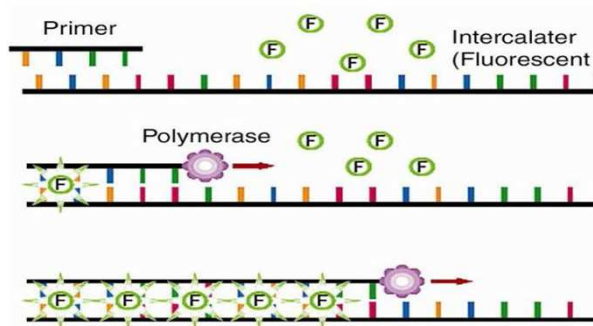


Real Time PCR

## SISTEMAS DE DETECÇÃO

### 1. CORANTES INTERCALANTES

Fluorocromos que emitem fluorescência quando se intercalam na dupla cadeia de DNA. **Inespecíficos de sequência.** Ex.: **SYBR Green®**, **LCGreen® Plus** e **EvaGreen®**



Real Time PCR

**SISTEMAS DE DETECÇÃO**

**1. CORANTES INTERCALANTES**

- **Curva de dissociação** (*melting curve*): permite verificar a especificidade do produto amplificado.

Real Time PCR

**SISTEMAS DE DETECÇÃO**

**1. CORANTES INTERCALANTES**

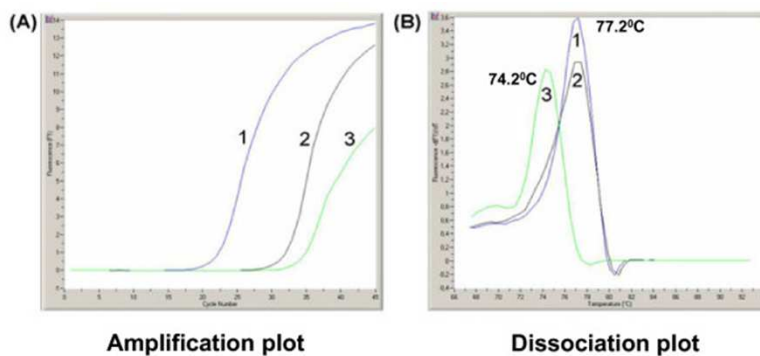
- **Curva de dissociação** (*melting curve*).

Real Time PCR

## SISTEMAS DE DETECÇÃO

### 1. CORANTES INTERCALANTES

- Curva de dissociação (*melting curve*).



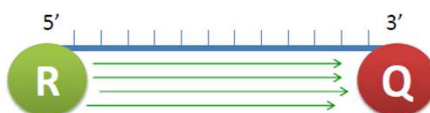
- **Temperatura de melting ( $T_m$ )**: temperatura na qual a metade do produto de PCR está dissociado e a outra metade está hibridado. Depende do conteúdo em guanina e citosina (G+C) e do tamanho de fragmento.

Real Time  
PCR

## SISTEMAS DE DETECÇÃO

### 2. SONDAS DE HIDRÓLISE

Sonda fluorescente linear com **especificidade** para uma sequência de DNA. Ex. **TaqMan**



- Fluorocromo “Reporter” – emite a fluorescência (região 5’)
- Molécula “Quencher” – absorve a fluorescência (região 3’)

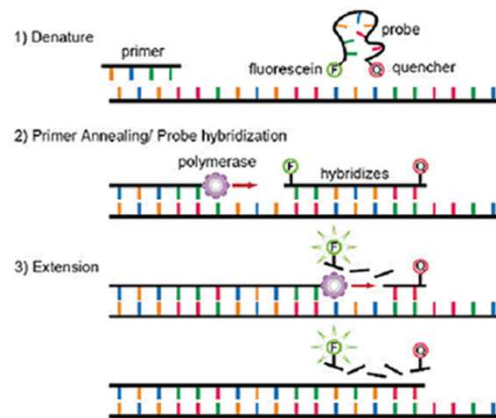
**Fluorescence resonance energy transfer (FRET)**: A transferência de energia de um marcador fluorescente para um segundo.

Real Time  
PCR

## SISTEMAS DE DETECÇÃO

### 2. SONDAS DE HIDRÓLISE

- Baseia-se na atividade 5'-3' **exonuclease** da DNA polimerase.



Real Time  
PCR