

PCR Quantitativa

Alan Silva

PCR em tempo real

- Conceitos

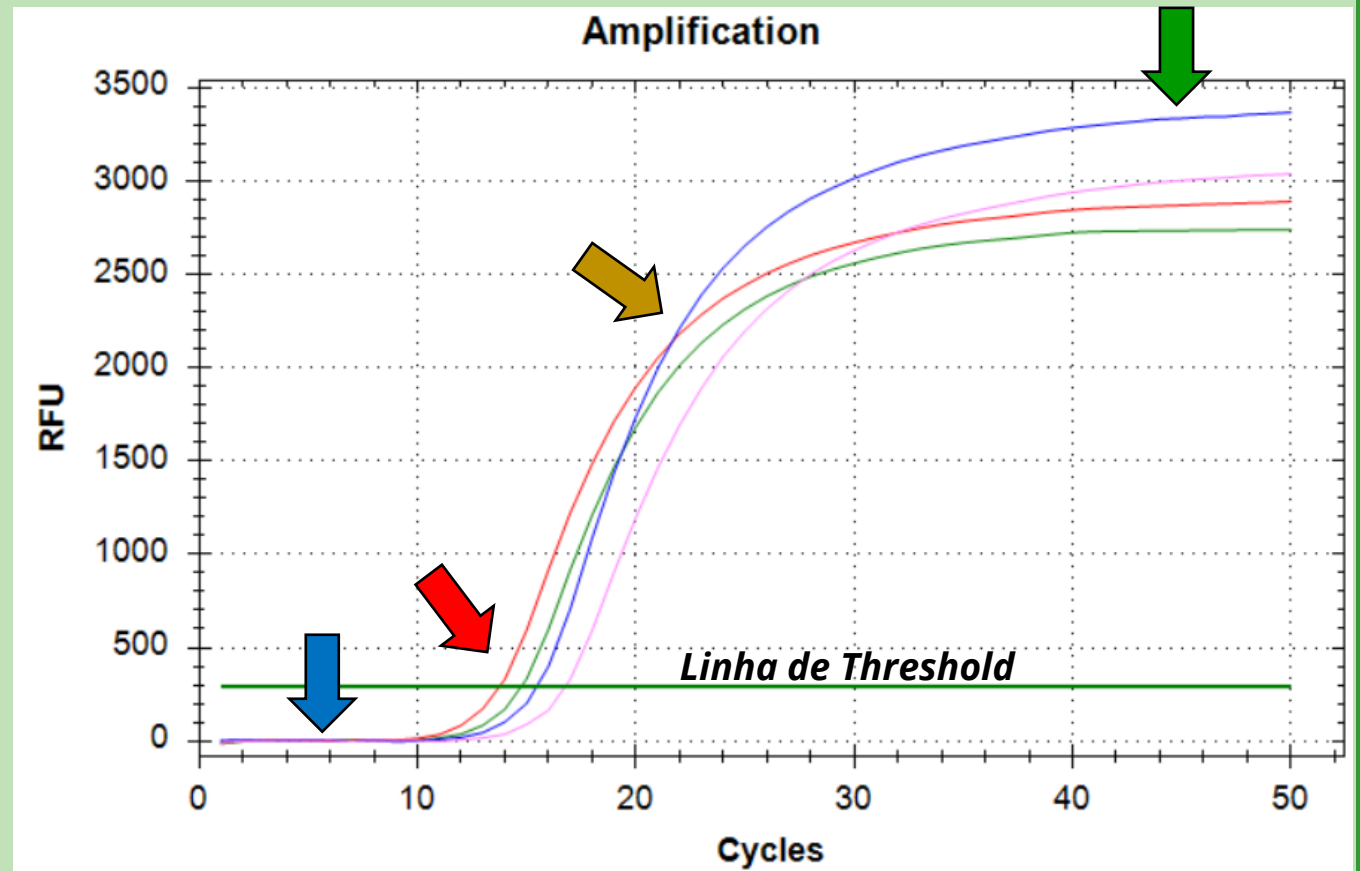
- Reação de PCR onde o acúmulo de produtos é medido em tempo real
- Medição dos produtos no final de cada ciclo
- Objetiva a quantificação do material inicial e não final
- Reação sensível, rápida, eficiente e reproduzível
- Permite uma enorme variedade de detecções

- Aplicações

- Quantificação de DNA específico em uma amostra
- Quantificação dos níveis de expressão de um gene (mRNA)
- Quantificação como parte de outra técnica (ex.: ChIP)

Fases de uma PCR

- Fase basal
 - Apenas ruído de DNA-molde e início de amplificação
- Fase Exponencial
 - Duplicação de produto
- Fase Linear
 - Decaimento da reação
 - Alta variabilidade
- Fase de Platô
 - Limite da reação
 - Alta degradação de produto

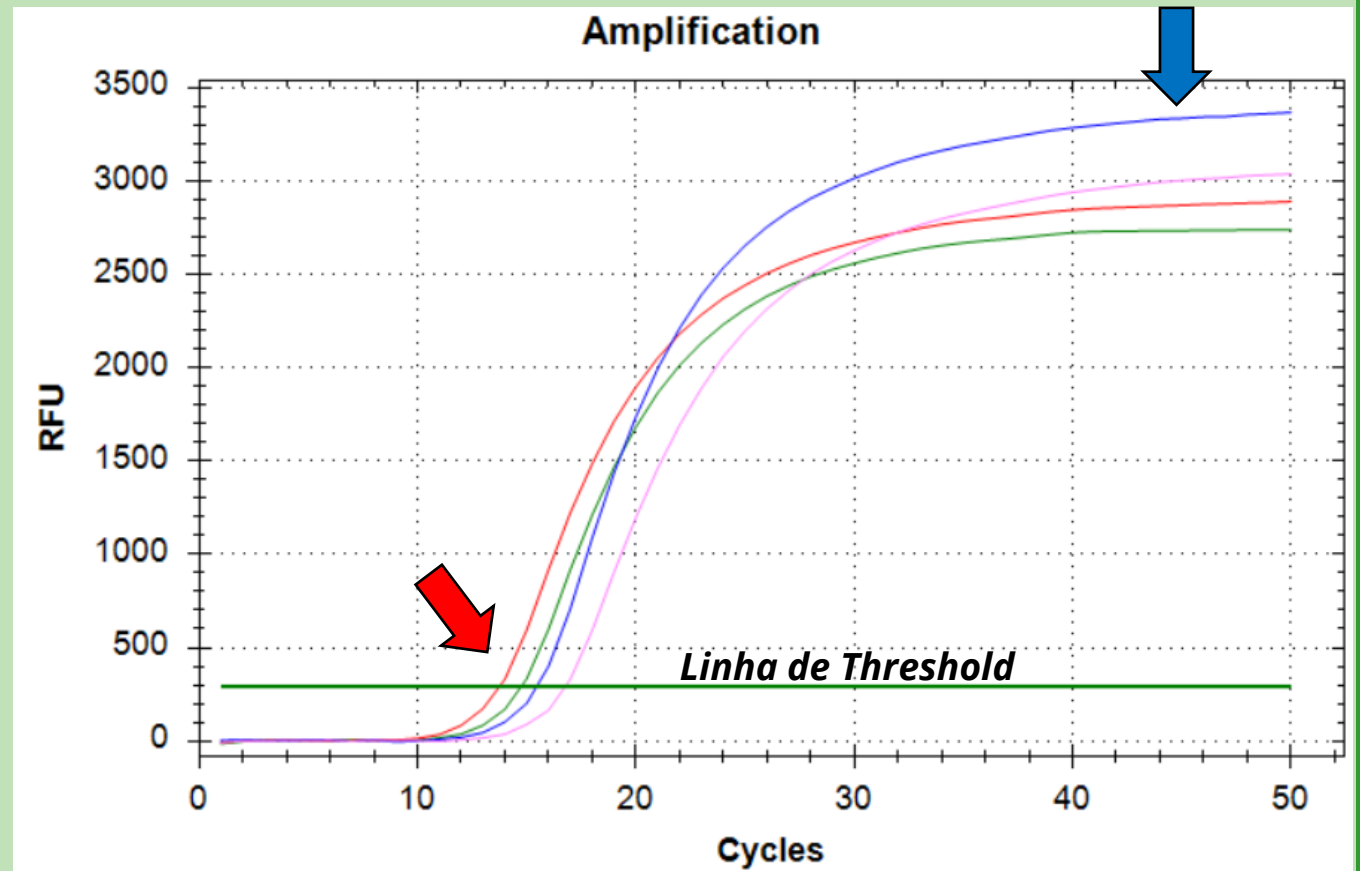


PCR: tradicional vs tempo real

- PCR tradicional (*end-point*)
 - Resultado coletado na fase de platô
- PCR em tempo real
 - Resultado coletado na fase exponencial

Efeito Platô

- As amostras no platô não refletem a quantidade de DNA/RNA molde inicial
 - Mais DNA molde
 - Mais produto final

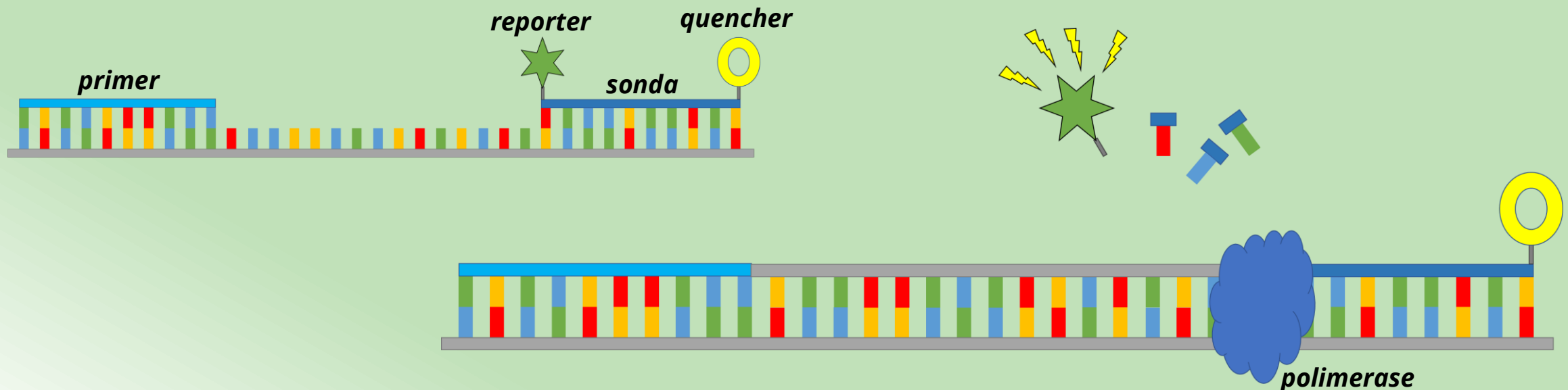


PCR em tempo real (quantitativa)

- Vantagens
 - Dados medidos na fase exponencial
 - Sem efeito platô
 - Quantificação precisa da quantidade de material inicial
- Componentes de uma PCR quantitativa
 - Reagentes:
 - Master mix: tampão de enzima, enzima e dNTPs
 - Primers
 - DNA/cDNA molde
 - água
 - Detecção: após cada ciclo de reação – fluoróforos

Detecção em qPCR: Sondas de Hidrólise

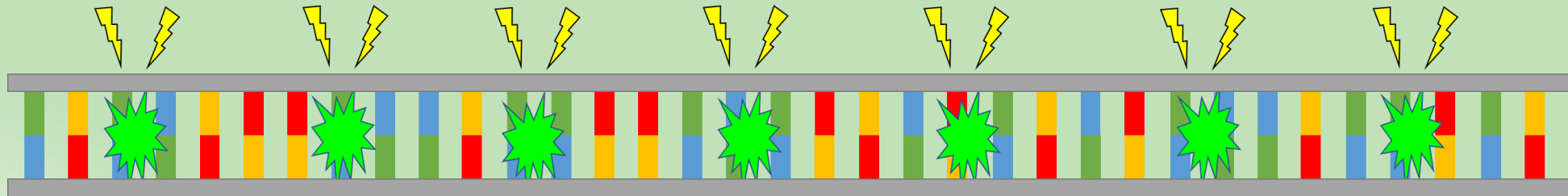
- Sistema TaqMan[®]
 - Necessita de uma sonda específica para a região alvo
 - A sonda possui um *reporter* e um *quencher* nas pontas
 - Na amplificação, a polimerase degrada a sonda (5'-3' exonuclease)
 - Separado do *quencher*, o *reporter* emite sinal fluorescente mais forte
 - Altamente específico porém exclusivo para um produto



Detecção em qPCR: Intercalante de DNA

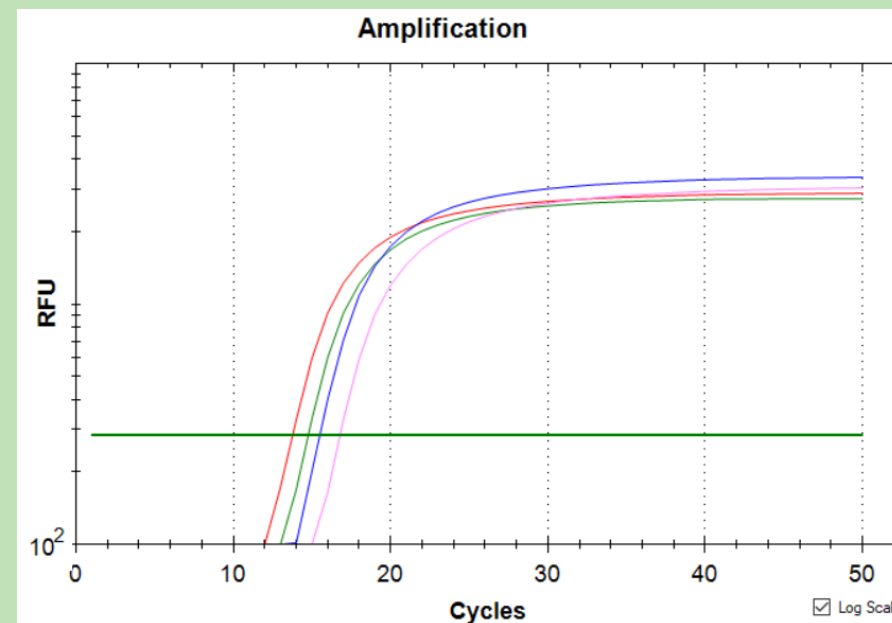
- SYBR[®] green

- Fluoróforo que se liga à qualquer DNA/cDNA dupla fita
 - Sinal muito mais forte quando conectado, permitindo a detecção
 - Quanto mais produto de PCR, mais sonda intercalada e mais sinal
- Altamente versátil mas pouco específico
 - Pode ser utilizado para qualquer produto, apenas mudando primers
 - Detecta produtos inespecíficos ou até dímeros de primers



Nomenclaturas e Siglas

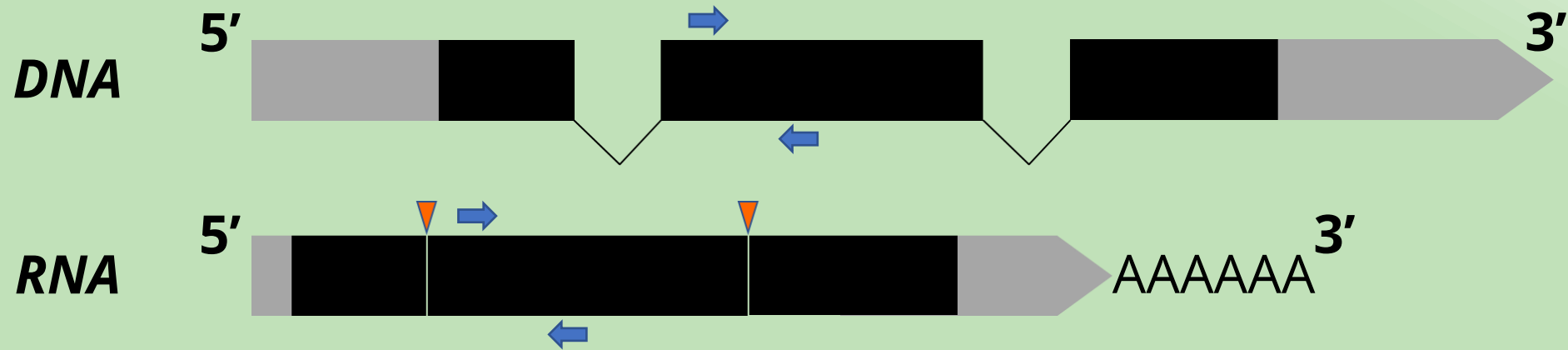
- **Baseline:** acúmulo de DNA-repórter abaixo do limite de detecção
 - Pode ser representado em forma de ruídos
 - Ruídos podem ultrapassar *threshold* se concentração de molde for alta
- **Threshold:** nível de detecção acima do sinal basal
 - Determinado automaticamente pelo equipamento (pode ser alterado)
 - Ao comparar diferentes placas, igualar os *threshold* antes de coletar dados
- **Cq:** Ciclo de PCR em que o sinal da amostra ultrapassa o *threshold*
 - Leitura que permite a análise dos dados
 - Quanto menor o Cq, mais DNA alvo na amostra inicial



Desenho de Primers para qPCR

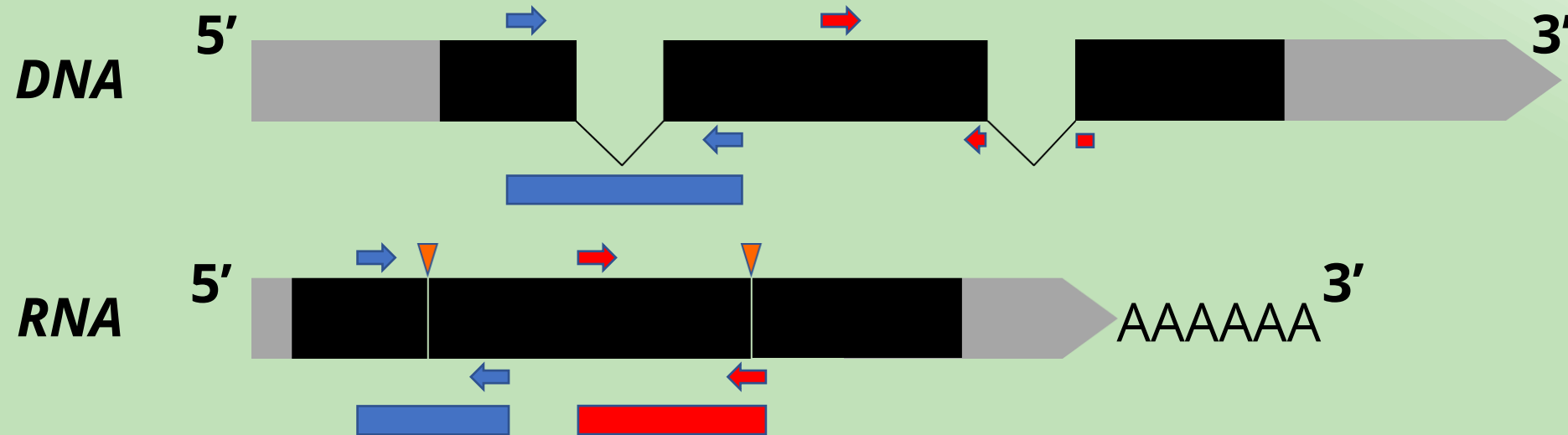
- **Critérios gerais:** mesmos dos primers comuns
 - 18-23 pb, $\Delta T_m \leq 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40-60 % CG, evitar repetições e estruturas secundárias
- **Critérios específicos:**
 - T_m de cada primer: $\approx 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (indicado pelos kits)
 - Tamanho do amplicon: 75 – 250 pb, sendo ideal 90 – 150 pb
 - Método de purificação: RP-OC, HPLC ou mesmo PAGE (evitar dessalinização)
- **Local de desenho dos primers:**
 - qPCR para biomassa:
 - gene multicópia, não presente no hospedeiro
 - RT-qPCR para expressão de genes:
 - evitar introns, priorizar exons diferentes para cada primers ou junção entre exons

Primers para biomassa



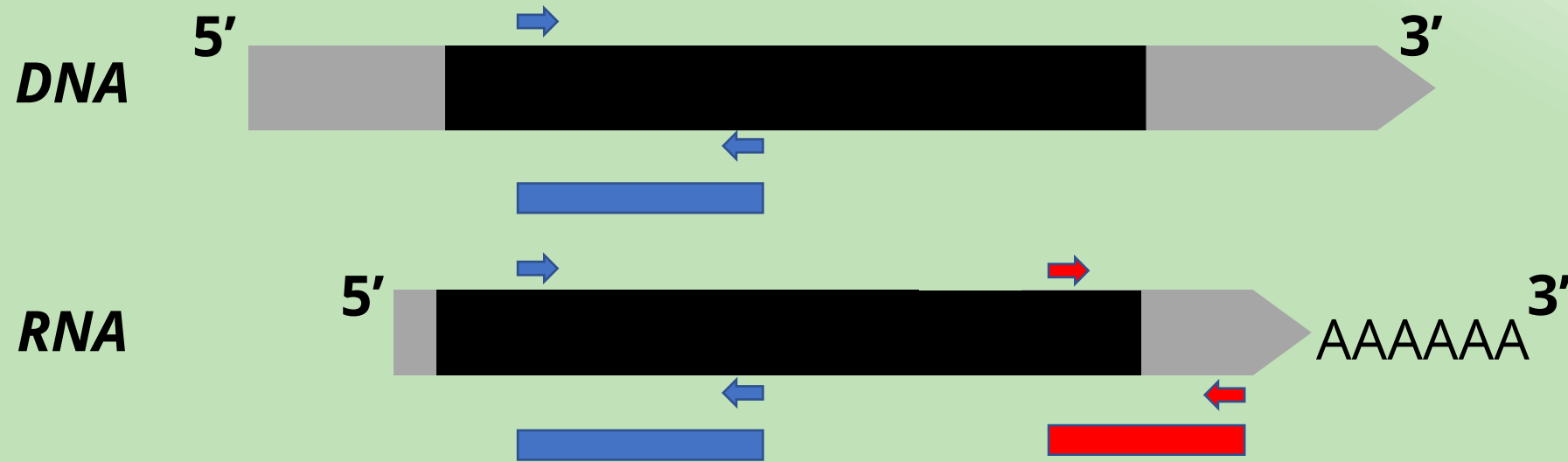
- Região conservada de gene com múltiplas cópias: ITS
 - Maior sensibilidade e detecção
- Extrair DNA puro sem RNA
 - Contaminação com RNA superestima concentração de DNA medida
- Verificar match em outras espécies
 - Se desejar medir quantidade de uma espécie em um hospedeiro
 - Para distinguir alvos muito semelhantes, talvez evitar Sybr[®] Green

Primers para expressão gênica: gene com intron



- Primers pulando íntron
 - DNA e RNA com amplicons de tamanhos diferentes (*Melting curve*)
 - DNA não amplifica se íntrons forem grandes (não é o caso de fungos)
- Primers na junção entre exons
 - Não amplifica a partir de DNA
 - Expressão de um mRNA variante em genes com *splicing* alternativo
 - Exige cDNA para o teste dos primers (expressão baixa / fase específica)

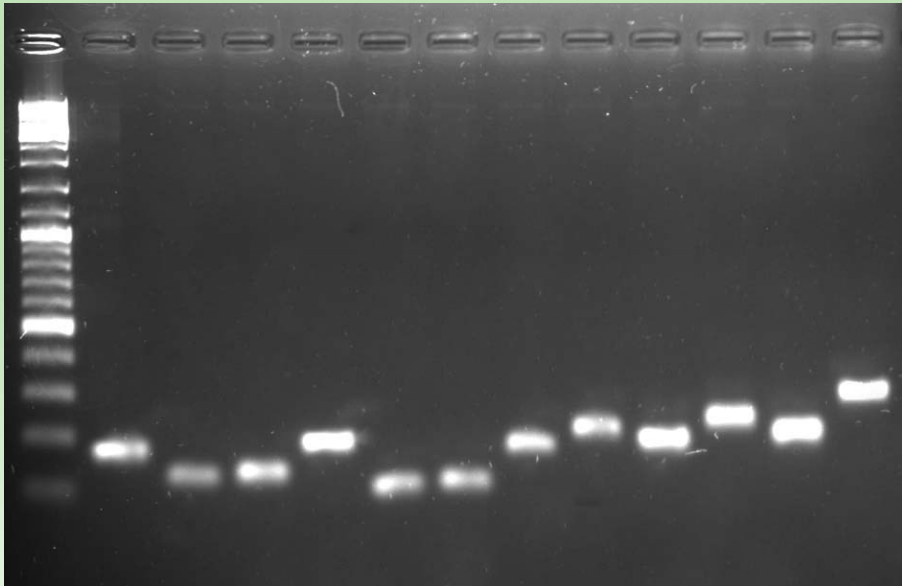
Primers para expressão gênica: gene sem íntron



- Garantir ausência de DNA contaminante
 - Colunas de kits costumam reter resíduos de DNA
 - Tratar com DNase na coluna ou após extração com Trizol
- Distinção de genes semelhantes: Primers na região UTR
 - Região UTR costuma ser menos conservada
 - mRNAs de diferentes espécies carregam maior ou menor região 3'-UTR

Especificidade dos Primers

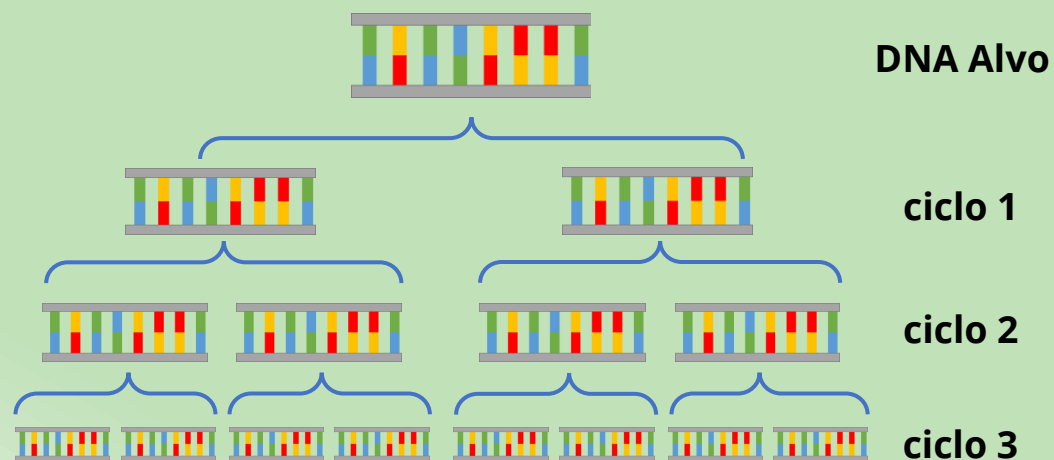
- Testar os primers em reação *end-point*
 - Incluir controles com gDNA e NTC
 - Verificar bandas esperadas e inespecíficas
 - Se necessário, sequenciar o produto para confirmar
 - Ao confirmar amplificação, fazer análise de eficiência



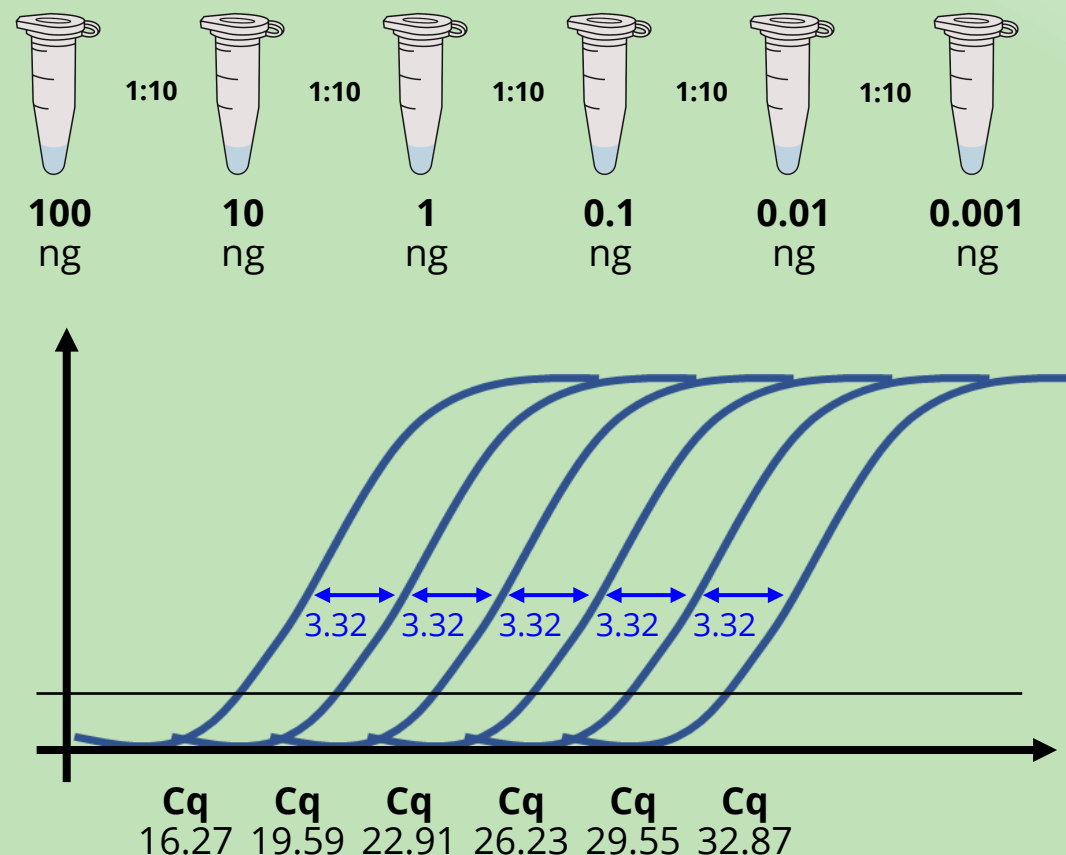
172 - 123 - 133 - 198 - 118 - 135 - 189 - 227 - 197 - 238 - 208 - 292

Eficiência dos Primers

- Definição:
 - 100% eficiência: 2^n
 - Eficiência qPCR: 90–105%



- Amplificação Exponencial:
 - Escala logarítmica
- $$2^n = 10 \rightarrow 2^n = 2^{3.321} \rightarrow \mathbf{n = 3.32}$$



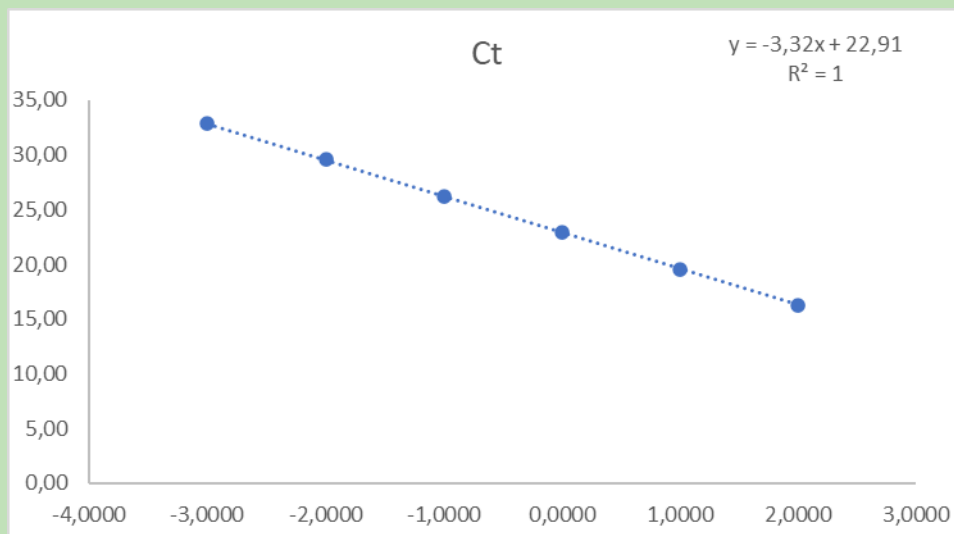
Eficiência = esperado x observado

Eficiência dos Primers: Simulação Ideal

- Passos

- Diluição seriada 1:10 de uma amostra
- Plotar o Log10 das diluições x Cqs
- Construir uma regressão linear

Conc.	Cq	Log10 DNA
100	16,27	2
10	19,59	1
1	22,91	0
0,1	26,23	-1
0,01	29,55	-2
0,001	32,87	-3



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

$$y = -3,32x + 22,91$$

X = Log10 concentração
Y = Cq

Ex: Amostra Cq = 18,15

$$\begin{aligned}x &= (y - 22,91) / -3,32 \\x &= (18,15 - 22,91) / -3,32 \\x &= -4,76 / -3,32 \\x &= 1,43373\end{aligned}$$

$$10^{1,43373} = 27,14 \text{ ng}$$

Eficiência dos Primers

- Princípio:
 - 100% eficiência: dobro de produto em cada ciclo (2^n)
 - Eficiência aceita para qPCR: 90–105%
 - Amplificação exponencial = escala logarítmica
 - Diluição seriada = amplificação constante → alta eficiência
 - Ex.: DNA de concentração conhecida a 100 ng
 - Diluição seriada 1:10 (100ng – 10ng – 1ng – 0,1ng – 0,01ng – 0,001ng)
 - $2^n = 10$ ou $\text{Log}_2 10$; $n = 3,321928$
 - qPCR: Ct baixo = alvo detectado antes = amostra mais concentrada
 - A diferença de Ct das diluições será exatamente 3,32 ciclos
 - Ex: 100ng – Ct 16,27, se o primer é 100% eficiente, a amostra de 10ng terá Ct $18,27 + 3,32 = 19,59$
 - Valores de Cts plotados em uma Regressão linear

Alvos ideais para teste de eficiência

Questões importantes:

- 1) Eficiência: entre 90 e 105 %
- 2) Limites da eficiência: entre a menor e maior diluição da série
- 3) Possibilidade de conhecimento da quantidade de alvo

Target location	Copies in 1 ng	Conditions
genomic DNA	17,682	<i>C. graminicola</i> , single copy gene, 51.6 Mb genome
Plasmid	130,344,108	One gene copy in a 7 Kb plasmid
PCR product	760,353,535	1200 bp PCR product purified
cDNA specific primers	760,353,535	Pure 1200 bp cDNA product/ high RT efficiency
cDNA oligo-dT/random	X	Depends on gene expression/ RT efficiency
RNA	X	Depends on gene expression and total RNA quantity

Cálculo do número de cópias

- Número de cópias em um plasmídeo ou DNA genômico

F1: Massa do Genoma (ng)

$$\text{genoma haplóide (bp)} \times 1.096 \times 10^{-18}$$

F2: Massa por cópia

$$F1 \div \text{n}^\circ \text{ cópias por plasmídeo/genoma}$$

F3: Número total de cópias

$$\text{amostra em ng} \div F2$$

Ex: Quantas cópias do gene H3 (1 por genoma) em 50 ng de *Cg* gDNA

F1: $51600000 \times 1.096 \times 10^{-18} = 0.0000565536$ ng (peso do genoma)

F2: $0.0000565536 / 1 \text{ copy por genoma} = 0.0000565536$ ng por cópia do gene

F3: $50 \text{ ng} / 0.0000565536 \text{ ng/cópia} = \mathbf{884,117 \text{ cópias}}$

- Número de cópias em um preparado puro (PCR)

$$\frac{\text{Quantidade (ng)} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{Tamanho (pb)} \times 1 \times 10^9 \times 660}$$

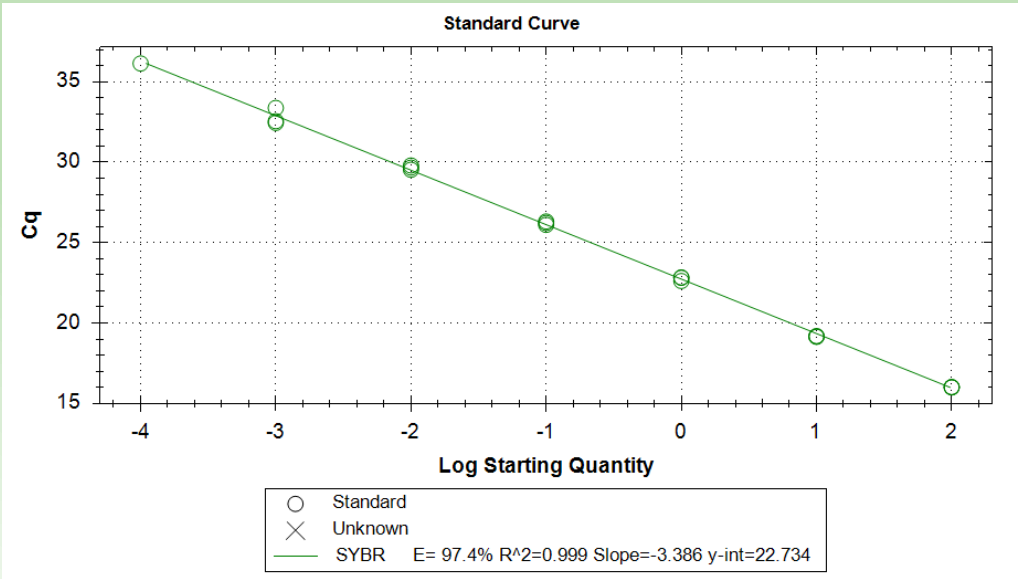
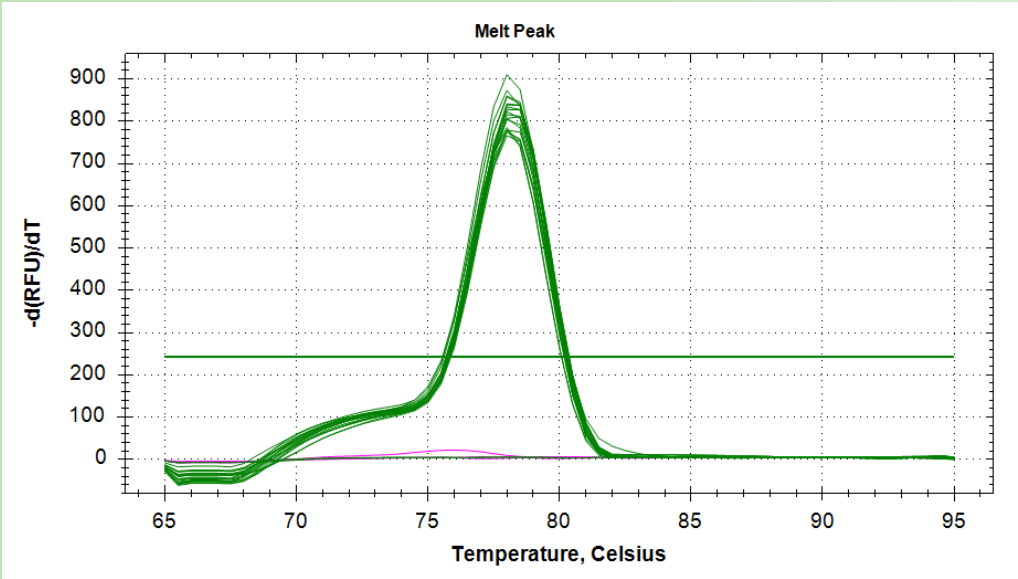
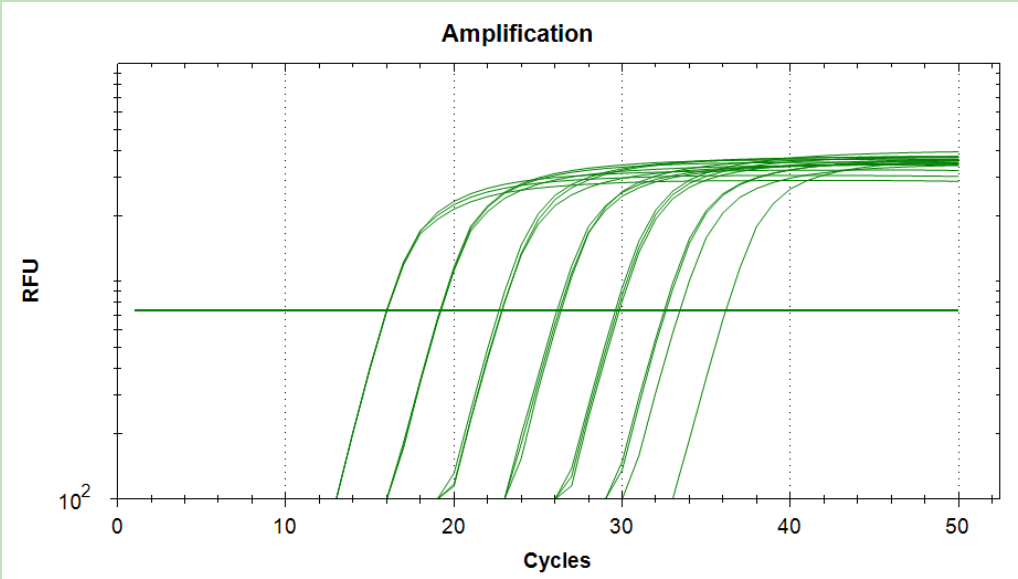
Em 50ng de H3 purificado de produto de PCR (522 bp):
87,400,000,000 copies

Outros aspectos da Eficiência dos Primers

Alguns fatores que podem afetar a quantificação

Situation	Solutions
Maior diluição da série com curva ruim	Confira se ela não veio direto da extração sem diluição, pois mesmo com kit existem inibidores que atrapalham a qPCR. Nem a primeira concentração da série pode vir direto da extração sem diluição. Procure uma amostra mais concentrada pra diluir ou exclua essa diluição.;
Última diluição da série sem amplificação ou com variação	Primers não são eficientes para essa concentração de alvo em amostra: Tenha certeza que só acontece após o ciclo 30 Aumente a concentração de DNA/RNA do experimento para garantir a detecção do alvo.
Amostras com Cq fora dos limites de eficiência dos primers	Aumente ou diminua a concentração de DNA/RNA da reação Todas amostras devem ter o Cq dentro dos limites em que a eficiência dos primers foi testada
Primers testados em gDNA x experimentos em planta	Testar primers em uma mistura de DNA fixo de planta e variável do fungo Usar controle só com a planta para excluir amplificação de alvos nela
Primers testados em gDNA x Experimentos com RNA	Faça uma reação <i>end-point</i> com kit de qPCR com DNA e RNA Genes com íntrons: desenhe primers antes e depois do íntron para diferenciar amplificação a partir de DNA e RNA com base na curva de dissociação (<i>melting</i>) ou em gel de agarose
Primers testados em plasmídeo x Experimento em gDNA/cDNA/RNA	Calcular quanto de gDNA corresponde ao mesmo número de cópias Testar amplificação com máximo e mínimo de amostra dos experimentos
Primers testados em gDNA/plasmídeo x Experimento com amostra mista	Testar primers contra outros possíveis alvos da amostra como controle negativo Talvez preferir <i>Taqman</i> ao invés de Sybr Green

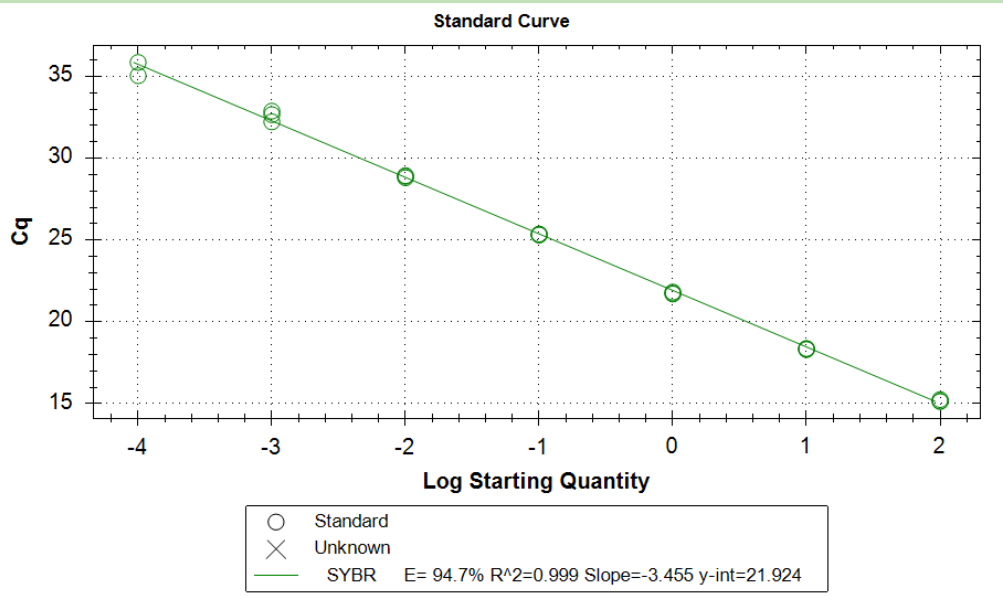
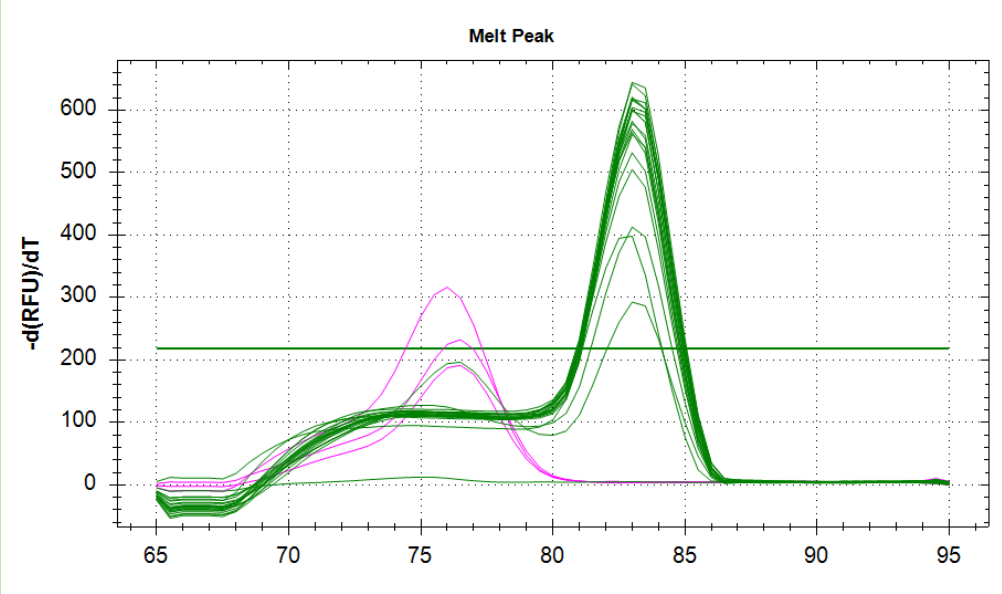
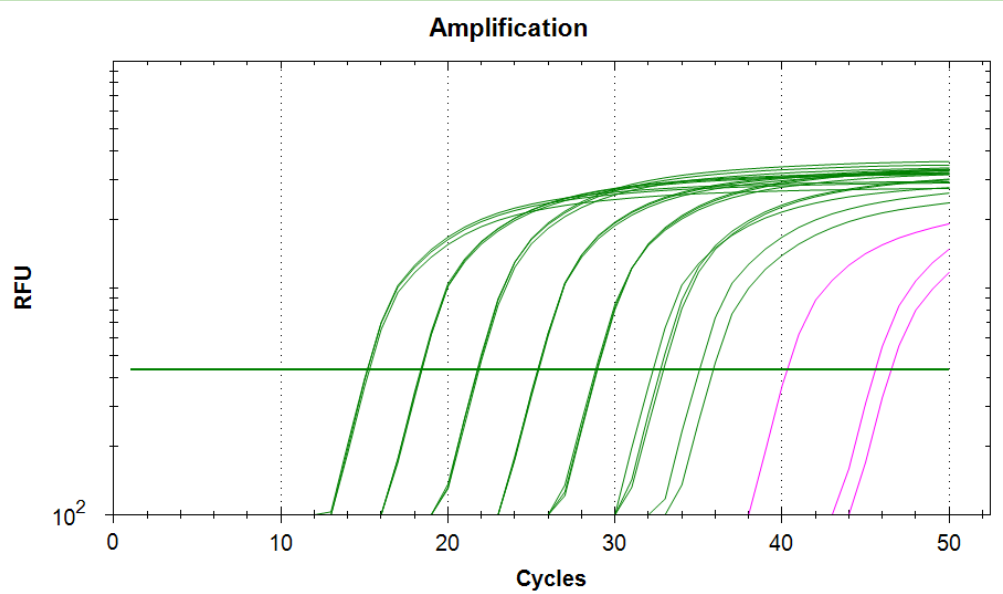
Teste de Primers: *Xln1* de *C. graminicola*



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	SQ
A04	SYBR	Xln1	Std-08		16.02	1.000E+02
A05	SYBR	Xln1	Std-08		16.00	1.000E+02
A06	SYBR	Xln1	Std-08		16.02	1.000E+02
B04	SYBR	Xln1	Std-09		19.17	1.000E+01
B05	SYBR	Xln1	Std-09		19.14	1.000E+01
B06	SYBR	Xln1	Std-09		19.19	1.000E+01
C04	SYBR	Xln1	Std-10		22.81	1.000E+00
C05	SYBR	Xln1	Std-10		22.62	1.000E+00
C06	SYBR	Xln1	Std-10		22.84	1.000E+00
D04	SYBR	Xln1	Std-11		26.11	1.000E-01
D05	SYBR	Xln1	Std-11		26.32	1.000E-01
D06	SYBR	Xln1	Std-11		26.23	1.000E-01
E04	SYBR	Xln1	Std-12		29.67	1.000E-02
E05	SYBR	Xln1	Std-12		29.53	1.000E-02
E06	SYBR	Xln1	Std-12		29.80	1.000E-02
F04	SYBR	Xln1	Std-13		32.55	1.000E-03
F05	SYBR	Xln1	Std-13		32.44	1.000E-03
F06	SYBR	Xln1	Std-13		33.38	1.000E-03
G04	SYBR	Xln1	Std-14		N/A	1.000E-04
G05	SYBR	Xln1	Std-14		36.14	1.000E-04
G06	SYBR	Xln1	Std-14		N/A	1.000E-04
H04	SYBR	Xln1	NTC		N/A	N/A
H05	SYBR	Xln1	NTC		N/A	N/A
H06	SYBR	Xln1	NTC		N/A	N/A

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
A06	SYBR	Xln1	Std-08		78.00
B04	SYBR	Xln1	Std-09		78.00
B05	SYBR	Xln1	Std-09		78.00
B06	SYBR	Xln1	Std-09		78.00
C04	SYBR	Xln1	Std-10		78.00
C05	SYBR	Xln1	Std-10		78.00
C06	SYBR	Xln1	Std-10		78.00
D04	SYBR	Xln1	Std-11		78.50
D05	SYBR	Xln1	Std-11		78.00
D06	SYBR	Xln1	Std-11		78.00
E04	SYBR	Xln1	Std-12		78.00
E05	SYBR	Xln1	Std-12		78.00
E06	SYBR	Xln1	Std-12		78.00
F04	SYBR	Xln1	Std-13		78.00
F05	SYBR	Xln1	Std-13		78.00
F06	SYBR	Xln1	Std-13		78.00
G04	SYBR	Xln1	Std-14		None
G05	SYBR	Xln1	Std-14		78.00
G06	SYBR	Xln1	Std-14		None
H04	SYBR	Xln1	NTC		None
H05	SYBR	Xln1	NTC		None
H06	SYBR	Xln1	NTC		None

Teste de Primers: *Xln2* de *C. graminicola*



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	SQ	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
A07	SYBR	Xln2	Std-15		15.14	1.000E+02	A07	SYBR	Xln2	Std-15		83.00
A08	SYBR	Xln2	Std-15		15.25	1.000E+02	A08	SYBR	Xln2	Std-15		83.00
A09	SYBR	Xln2	Std-15		15.15	1.000E+02	A09	SYBR	Xln2	Std-15		83.00
B07	SYBR	Xln2	Std-16		18.37	1.000E+01	B07	SYBR	Xln2	Std-16		83.00
B08	SYBR	Xln2	Std-16		18.31	1.000E+01	B08	SYBR	Xln2	Std-16		83.00
B09	SYBR	Xln2	Std-16		18.35	1.000E+01	B09	SYBR	Xln2	Std-16		83.00
C07	SYBR	Xln2	Std-17		21.71	1.000E+00	C07	SYBR	Xln2	Std-17		83.00
C08	SYBR	Xln2	Std-17		21.75	1.000E+00	C08	SYBR	Xln2	Std-17		83.00
C09	SYBR	Xln2	Std-17		21.82	1.000E+00	C09	SYBR	Xln2	Std-17		83.00
D07	SYBR	Xln2	Std-18		25.31	1.000E-01	D07	SYBR	Xln2	Std-18		83.00
D08	SYBR	Xln2	Std-18		25.37	1.000E-01	D08	SYBR	Xln2	Std-18		83.00
D09	SYBR	Xln2	Std-18		25.33	1.000E-01	D09	SYBR	Xln2	Std-18		83.00
E07	SYBR	Xln2	Std-19		28.90	1.000E-02	E07	SYBR	Xln2	Std-19		83.00
E08	SYBR	Xln2	Std-19		28.94	1.000E-02	E08	SYBR	Xln2	Std-19		83.00
E09	SYBR	Xln2	Std-19		28.81	1.000E-02	E09	SYBR	Xln2	Std-19		83.00
F07	SYBR	Xln2	Std-20		32.23	1.000E-03	F07	SYBR	Xln2	Std-20		83.00
F08	SYBR	Xln2	Std-20		32.88	1.000E-03	F08	SYBR	Xln2	Std-20		83.00
F09	SYBR	Xln2	Std-20		32.67	1.000E-03	F09	SYBR	Xln2	Std-20		83.00
G07	SYBR	Xln2	Std-21		35.05	1.000E-04	G07	SYBR	Xln2	Std-21		83.00
G08	SYBR	Xln2	Std-21		35.86	1.000E-04	G08	SYBR	Xln2	Std-21		83.00
G09	SYBR	Xln2	Std-21		N/A	1.000E-04	G09	SYBR	Xln2	Std-21		None
H07	SYBR	Xln2	NTC		46.48	N/A	H07	SYBR	Xln2	NTC		None
H08	SYBR	Xln2	NTC		45.53	N/A	H08	SYBR	Xln2	NTC		None
H09	SYBR	Xln2	NTC		40.27	N/A	H09	SYBR	Xln2	NTC		76.50

Tipos de Quantificação

- **Relativa (Comparativa)**

- Quantidade de DNA/RNA inicial em relação a um controle
- Controle: exógeno, endógeno, lista de referências
- Não necessita de curva padrão ou quantidades conhecidas
- Amostras normalizadas em relação ao controle
- Amostras normalizadas comparadas:
 - Tratamento x controle
 - Selvagem x mutante
 - Indivíduos saudáveis x doentes

Tipos de Quantificação

- **Absoluta**

- Quantidade de DNA/RNA inicial “relativa” a uma curva padrão
- Curva padrão na mesma placa ou feita nas mesmas condições
 - Mesmo kit, mesmo aparelho, mesma *threshold*
- Amostras comparadas com a curva padrão
- Quantificação relacionada a um parâmetro biológico
 - Massa de tecido coletado
 - Quantidade de células
 - Número de cópias de um gene
 - Massa total de DNA do alvo na amostra (em μg , ng, pg...)

Desenho Experimental: Réplicas ou Repetições

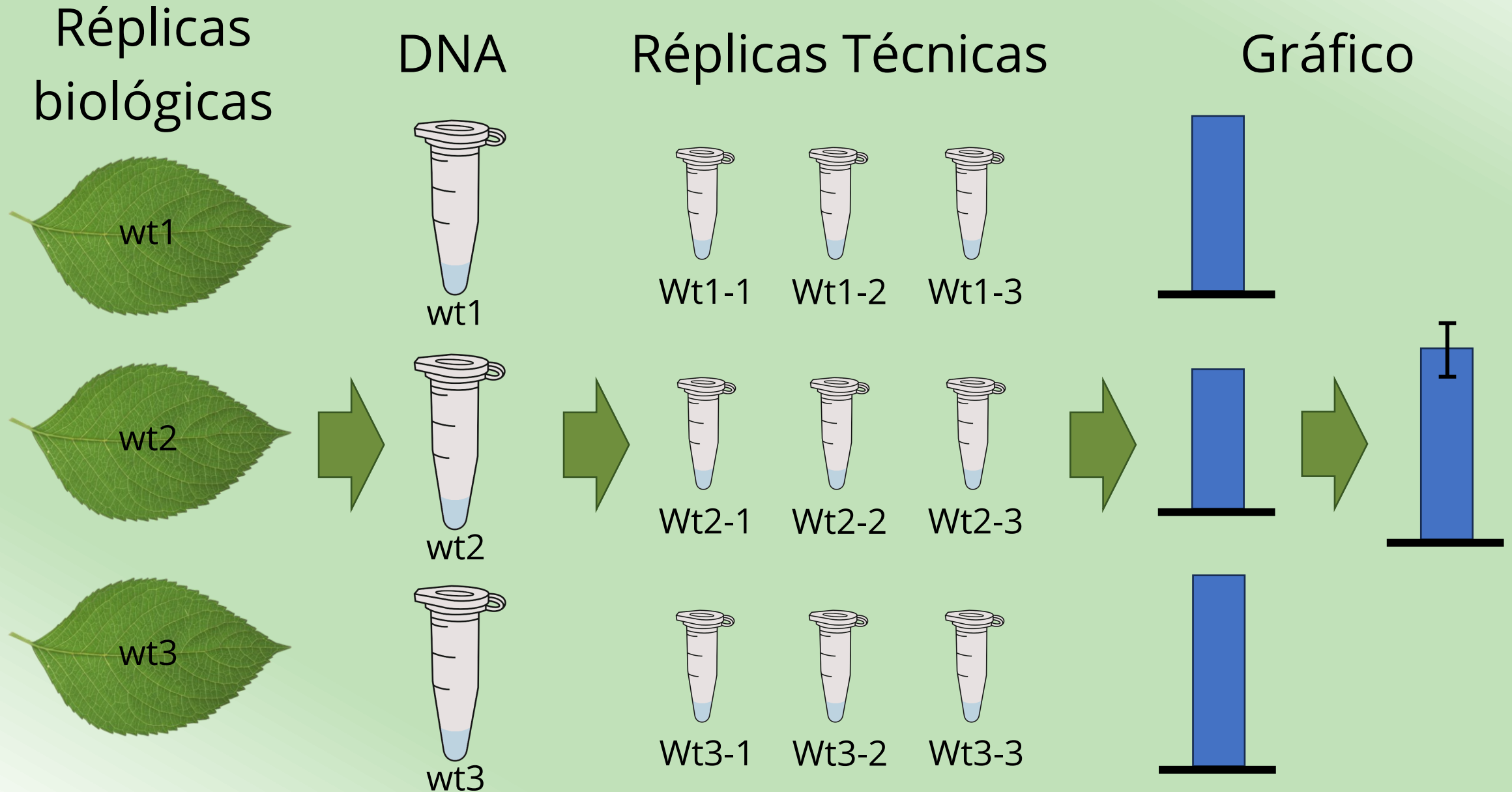
- **Réplica biológica**

- Repetições experimentais da mesma amostra
- Importante para avaliar variações biológicas do experimento
 - 3 coletas independentes no mesmo local
 - organismo selvagem inoculado 3x independentemente
 - 3 plantas independentes tratadas com o promotor de crescimento

- **Réplica técnica**

- Repetições de uma amostra experimental durante a análise
- Importante para avaliar variações de manuseio/pipetagem
 - DNA da mesma amostra biológica em 3 poços da placa de qPCR

Desenho Experimental: Réplicas ou Repetições



Outros Tipos de Réplicas (menos utilizadas)

- **Réplica de extração**

- Mesma amostra biológica submetida a mais de uma extração de DNA/RNA independentes
- Importante para avaliar variações da extração

- **Réplica de conversão RNA → cDNA**

- RNA extraído de uma amostra convertido em cDNA mais de uma vez independentemente
- Importante para avaliar variações de eficiência de conversão

Como controlar variações

- **Variação biológica**

- Variação real existente entre amostras
- Aquela que queremos analisar e comparar

- **Variação técnica**

- Variações introduzidas em qualquer etapa:
 - Coleta: peso, número de células ou fragmentos coletados
 - Processamento: armazenamento, transporte, resfriamento, extração
 - Análise: tipo de detecção (TaqMan ou SybrGreen), primers eficientes, repetições técnicas, controles positivo, negativo, NTC e NRT.
- Maior fonte de variação: Extração de DNA/RNA
- Podemos reduzir por meio da **NORMALIZAÇÃO**

Normalização

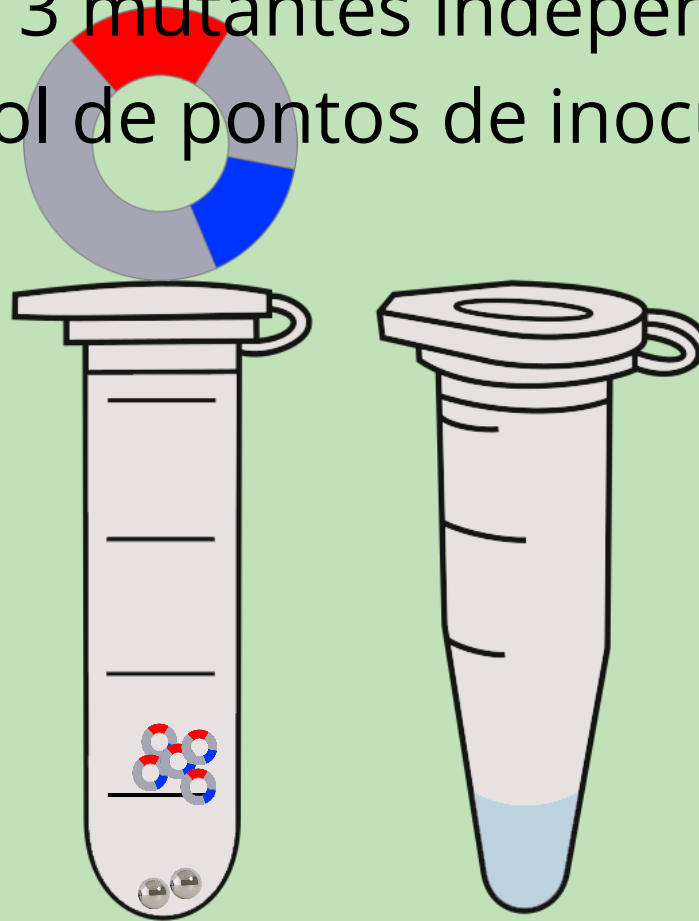
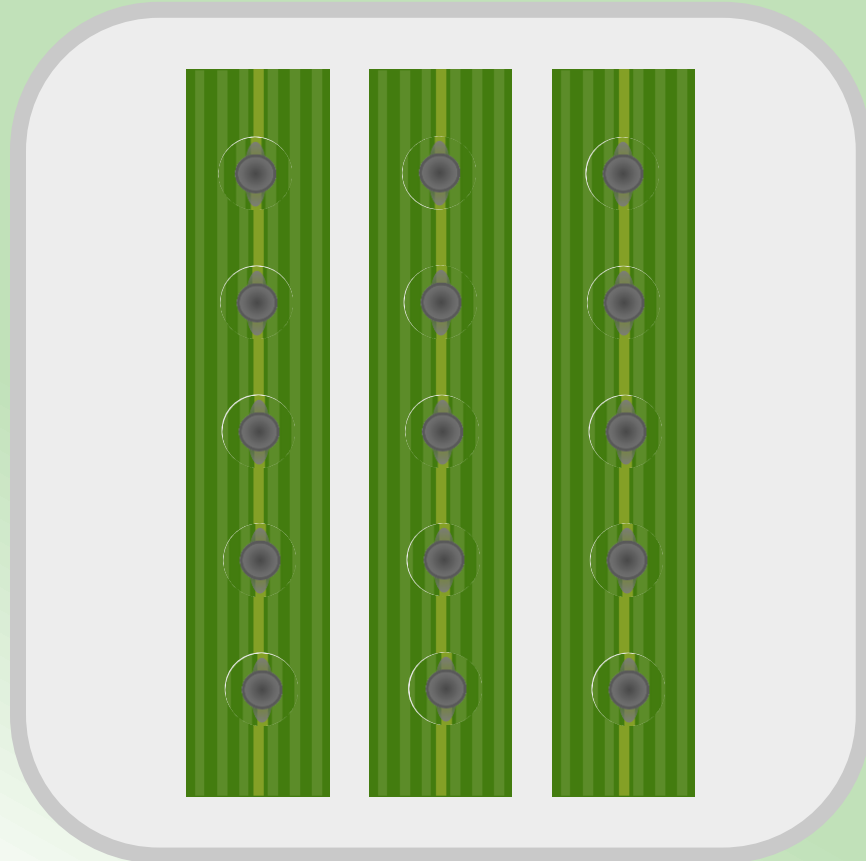
- Concentração e qualidade do DNA/RNA
 - Nanodrop, gel de agarose, bioanalyzer, qbit...
- Controle de amplificação
 - DNA/RNA externo ou alvo interno de valores constantes
 - **Controle exógeno:** DNA conhecido (plasmídeo) adicionado imediatamente antes de iniciar a extração, em quantidade igual para todas amostras. Amplificar por qPCR o alvo na amostra e o alvo no plasmídeo, usado para normalizar.
 - Desvantagens: não valida as fases anteriores (lise de células)
 - **Controle endógeno:** Outro alvo na mesma amostra de expressão constitutiva, sendo usado para normalizar a quantificação do alvo principal.
 - Desvantagens: gene não pode ser afetado pelo experimento

Estudo de Caso: Biomassa de *C.g. in planta*

- Objetivo: Avaliar patogenicidade de linhagens mutantes
- Método: quantificar a colonização do fungo por sua biomassa
- Desenho experimental
 - Linhagens: WT, Ec e 3 mutantes independentes
 - Repetições Biológicas: 3
 - Cada repetição biológica= pool de pontos inoculados = 1 tubo de extração de DNA
 - Repetições técnicas: 3
 - Cada repetição técnica = 1 repetição biológica em 3 poços da placa de qPCR
 - Prevenção de erros:
 - Mesmo volume e concentração de inoculação (10 μ L, 10^6 spores/mL)
 - Mesmo número de fragmentos no *pool* (cobrindo toda a área da lesão)
 - Usar normalizador para a extração de DNA (plasmídeo adicionado à amostra)
 - Alvos:
 - ITS2 para o fungo (~60 cópias no genoma de *C. graminicola*)
 - M13 para o plasmídeo pUC18: normalização de variação durante extração de DNA

Desenho Experimental

- Repetições: mínimo 3
- Linhagens: WT, Ect and 3 mutantes independentes
- Cada repetição: um pool de pontos de inoculação

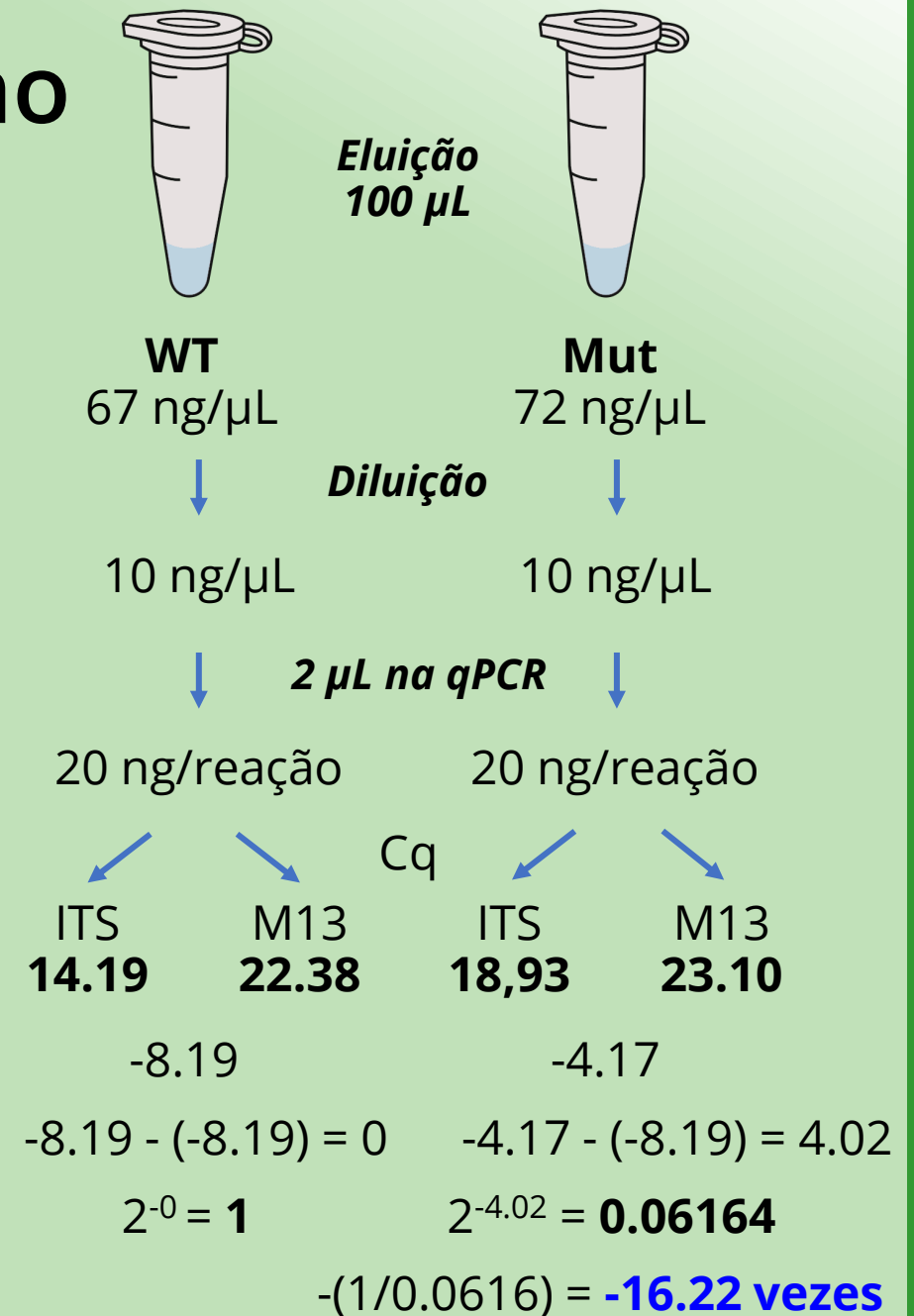


Alvos para detecção	
DNA genômico	
Fungus	ITS
Plant	X
DNA de plasmídeo	
pUC18	M13

qPCR: Biomassa de *C.g.* em milho

• Quantificação Relativa

- Valores de Quantificação:
 - Relativo a um controle (valor 1 or 100%)
- Não precisa de curva de calibração
- Cálculo via método Livak ou $\Delta\Delta C_t$:
 - $\Delta C_q = C_q \text{ alvo} - C_q \text{ normalizador}$
 - $\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ tratamento} - \Delta C_q \text{ controle}$
 - Expressão Relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$
 - Expressão em relação ao controle (fold):
 - ≥ 1 : = Expressão Relativa
 - < 1 : - (1/Expressão Relativa)



qPCR: Biomass of *C.g.* em milho

• Quantificação Absoluta

- Valores para quantificação:
 - Massa de DNA do fungo por amostra (ng, µg)
 - Número de cópias do gene por amostra
 - Massa/cópias de DNA por mg vegetal
- Precisa de curva de calibração atualizada

Standard Curve:

ITS: $\text{Log}_{10}: =(\text{Ct} - 17,889)/-3,3897$

pUC18: $\text{Log}_{10}: =(\text{Ct} - 28,946)/-3,2442$

