

Princípios básicos da reação em cadeia da polimerase (PCR) – II



Programa

Princípios básicos da
PCR – Parte I

Princípios básicos da biologia molecular

Definição de PCR

As fases da PCR

**Princípios básicos da
PCR – Parte II**

Definição de PCR em tempo real

PCR em tempo real qualitativa

PCR em tempo real quantitativa

Princípios básicos da
PCR – Parte III

Definição de temperatura de fusão

Análise da curva de fusão

PCR em tempo real



PCR em tempo real (RT-PCR)

- A PCR em tempo real é uma reação de PCR normal que utiliza um oligonucleótido adicional, marcado com uma molécula fluorescente: designa-se por sonda.
- A sonda é uma molécula de ADN de cadeia simples, que corresponde à sequência-alvo
- A sonda fluorescente emite um sinal fluorescente quando é ativada por hibridização



Sonda

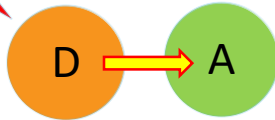
- Uma cópia do ADN alvo ativa uma molécula de sonda, e assim o sinal de fluorescência será diretamente proporcional ao número de cópias formadas do ADN alvo
- Exemplos de sondas utilizadas para PCR em tempo real: sondas TaqMan, Molecular Beacon, Scorpion, etc.

Tecnologia FRET:

- A tecnologia FRET (do inglês, Fluorescence Resonance Energy Transfer) é uma interação dependente da distância entre duas moléculas de corante.
- A energia de excitação é transferida de uma molécula dadora para uma molécula aceitadora sem emissão de fótons.
- A FRET tem muitas aplicações, incluindo em PCR.

D=Dadora/Repórter
A=Aceitadora/Quencher

Excitação



Juntas – A fluorescência é absorvida

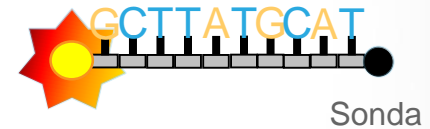
Excitação



Separadas – A fluorescência é emitida

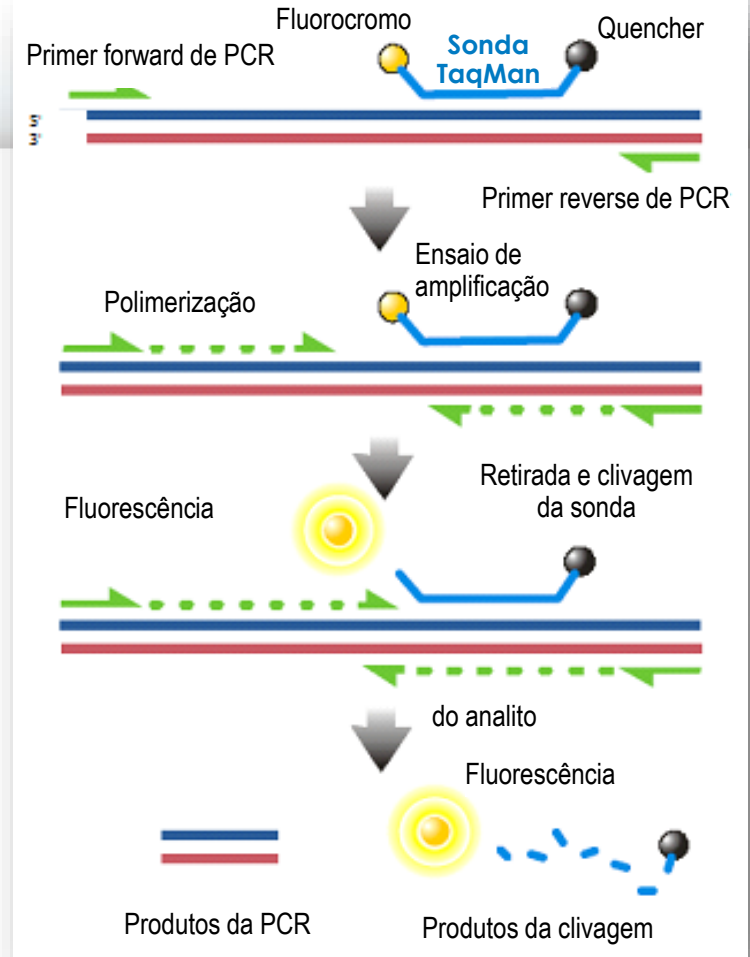
Sonda TaqMan

- Uma sonda Taqman é uma sonda de oligonucleótidos curta (15-30 bases de comprimento) marcada com um corante fluorescente na extremidade 5' e com um quencher na extremidade 3'.
- Desde que o repórter e o quencher estejam muito próximos, o quencher vai absorver a fluorescência do repórter
- A sonda tem uma sequência de ADN concebida para hibridar com o alvo
- Durante a fase de extensão da PCR, a Taq polimerase vai degradar a sonda
- Isto vai separar fisicamente o repórter e o quencher, permitindo a emissão e a quantificação da fluorescência



1 fluorocromo
livre/amplicão de
ADN

Sonda TaqMan



Sonda TaqMan

Repórter

Quencher



Sonda TaqMan



Primer forward



Sonda TaqMan

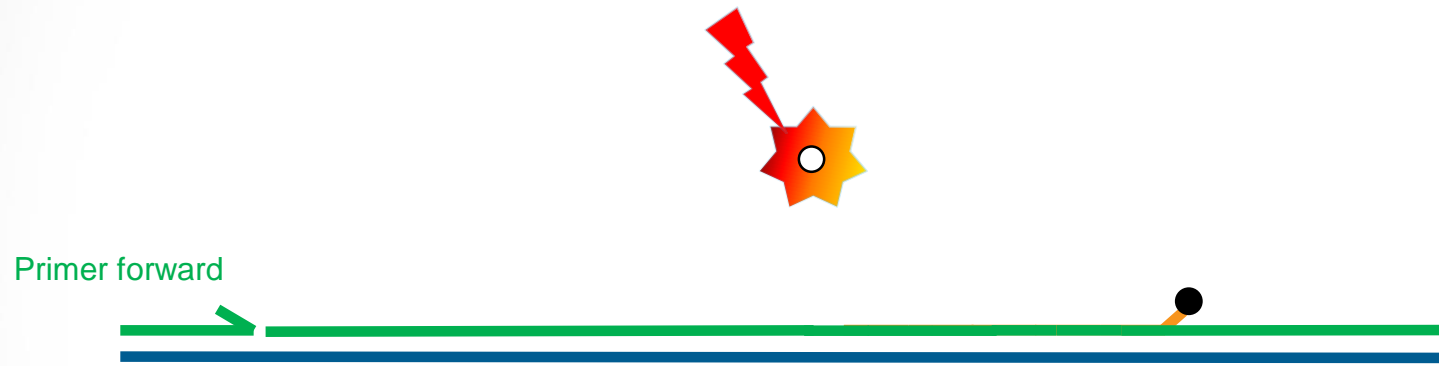
Primer forward

Repórter

Quencher



Sonda TaqMan



Sonda Molecular Beacon

- Uma sonda molecular Beacon é uma molécula em forma de gancho de cabelo composta por um fluorocromo (repórter) e um quencher
- A sequência da sonda tem cerca de 17–21 bases de comprimento. A sequência principal deve ser rica em GC (> 80% da sequência total) que forma uma cadeia dupla estável com 5-8 bases de comprimento.
- Quando livre em solução, as duas extremidades permanecem próximas, resultando no quenching da fluorescência.
- Na presença do ADN alvo, a sonda hibrida com o alvo e separa o fluorocromo do quencher, resultando na emissão de fluorescência

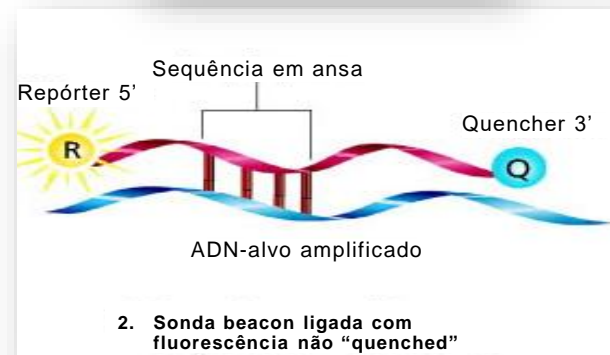
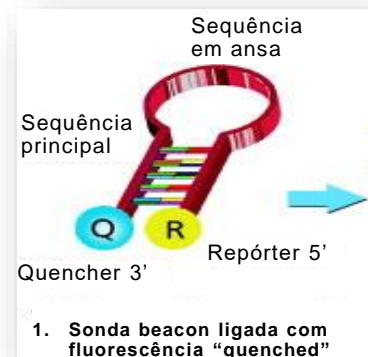
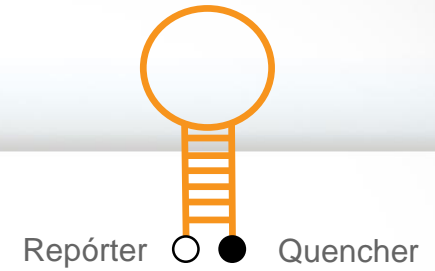


Imagem: Sigma-Aldrich

Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



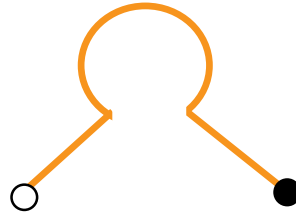
Sonda Molecular Beacon



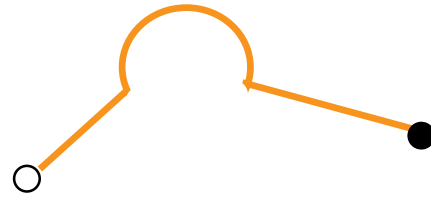
Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon

Primer forward



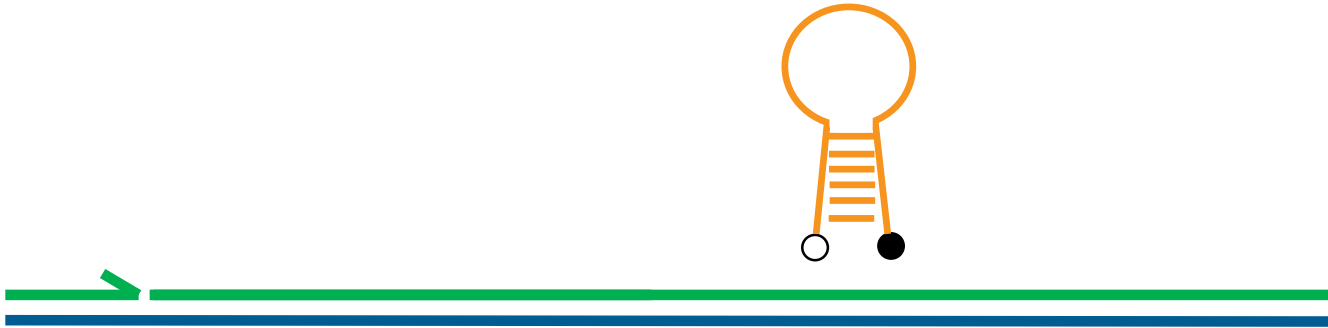
Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon



Sonda Molecular Beacon

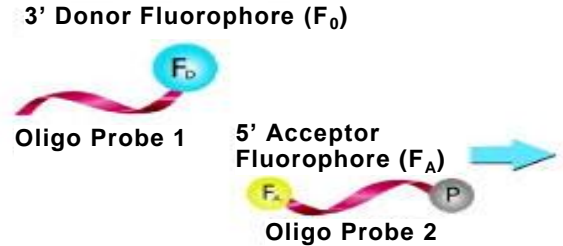


Sonda Molecular Beacon



Sonda FRET

- As sondas FRET são um par de oligonucleótidos com um fluorocromo dador e um fluorocromo aceitador
- O dador, quando excitado pelo instrumento, vai excitar o aceitador que, por sua vez, vai emitir fluorescência. Esta fluorescência será detetada pelo instrumento
- Quando as sondas estão livres em solução, este fenómeno não ocorre devido à falta de proximidade
- Durante a fase de emparelhamento da PCR, as sondas hibridizam quando muito próximas umas das outras, o que permite a transferência de energia e a emissão e quantificação da fluorescência



1. Probes in solution emit low fluorescence

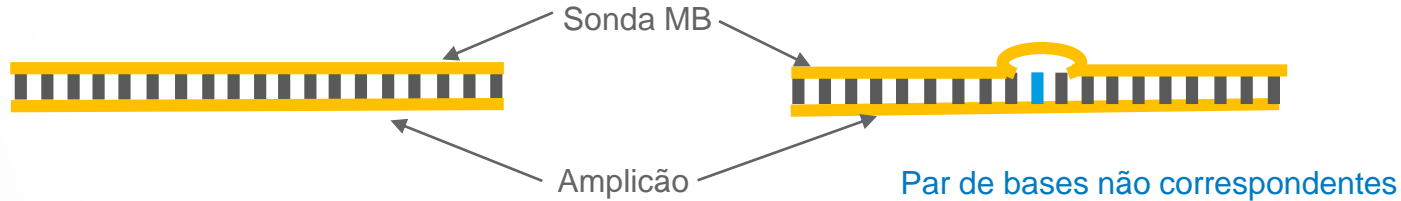


2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

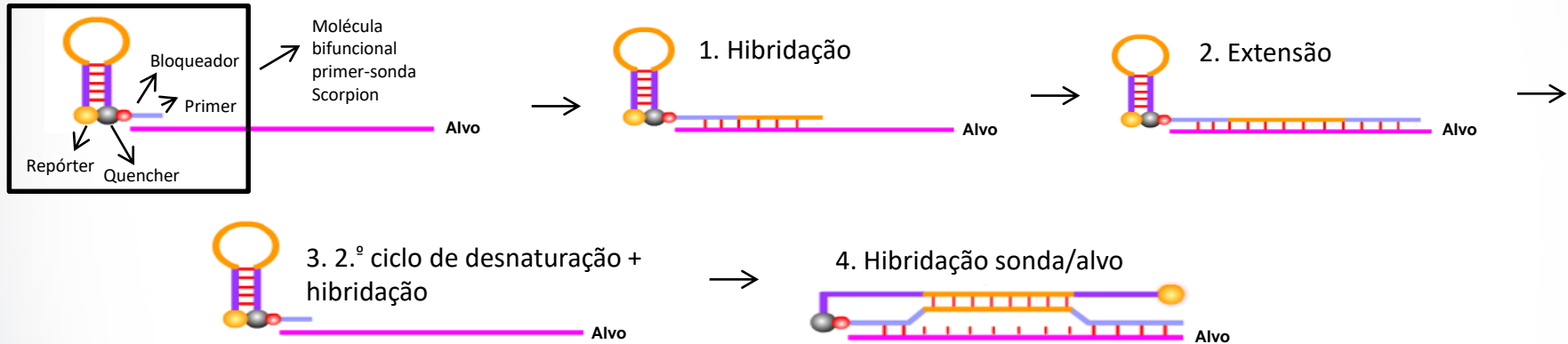
Imagem: Sigma-Aldrich

Marcador molecular Sloppy

- Os “marcadores moleculares sloppy” possuem sequências de sonda relativamente longas (cerca de 30-40 bases de comprimento), que lhes permitem formar híbridos com amplicões de muitas espécies diferentes, apesar da presença de **pares de bases desemparelhados**.



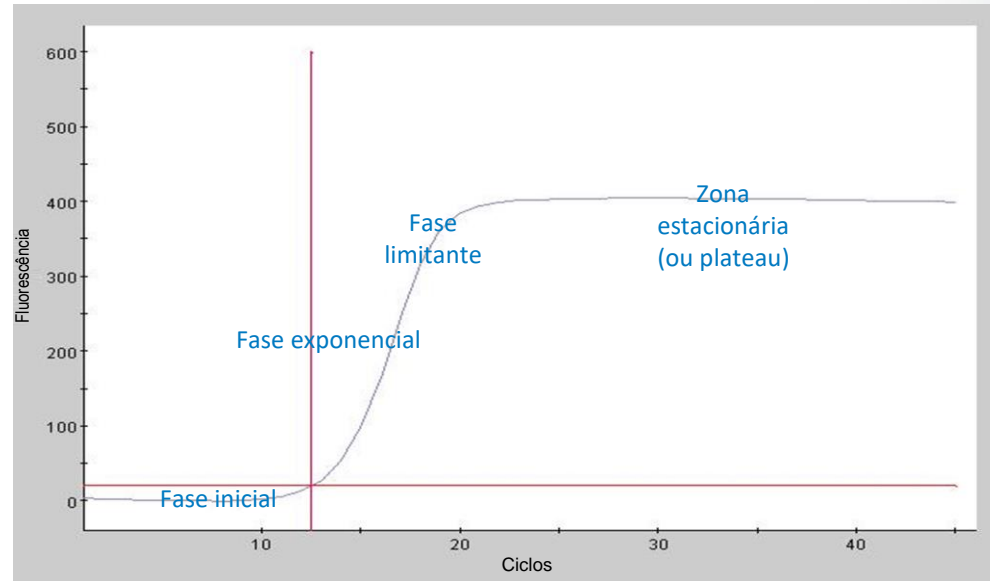
Sonda Scorpion



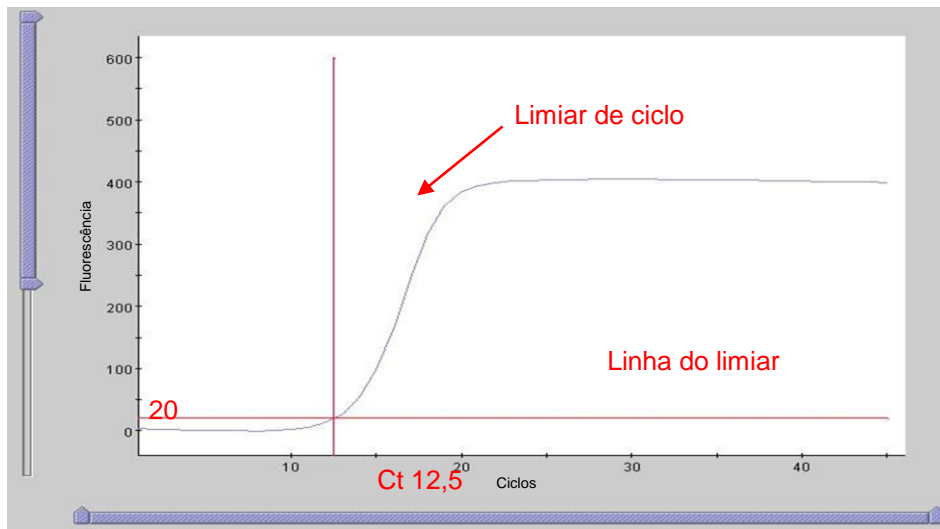
A sequência da sonda deve ter 17-27 bases de comprimento.

Alterações na fluorescência durante a PCR

- A curva de amplificação tem 4 fases:



Definição de Ct – baseado no limiar



- Limiar de ciclo (Ct): o primeiro ciclo que cruza um limiar de fluorescência definido
- O valor deste ciclo pode ser fracionário

Crítérios de validação de um ensaio de PCR: Intervalo de Ct e fluorescência do ponto final

- Intervalo de Ct
 - É o intervalo aceitável para um valor de Ct
 - É limitado pelo $Ct_{\text{mín}}$ e o $Ct_{\text{máx}}$
- Fluorescência do ponto final
 - O valor de fluorescência no final da PCR (fase estacionária)







Para os testes Xpert, fora do intervalo, a curva de amplificação não pode ser validada: não pode ser fornecido um resultado

PCR Multiplex

- A PCR Multiplex é a amplificação de **múltiplos alvos de ADN** simultaneamente
 - Cada alvo tem o seu próprio conjunto de primers
 - Cada alvo é detetado ou quantificado pela sua própria sonda, marcada com um corante diferente e detetada num comprimento de onda fluorescente específico
- Ao conceber uma PCR Multiplex, a competição entre alvos tem de ser evitada

Deteção de múltiplos corantes – 6 corantes até 2020

- São selecionados diferentes corantes (repórteres)
- São excitados e emitem em diferentes comprimentos de onda

Analito	Repórter	Excitação (nm)	Emissão (nm)
Alvo 1	Corante 1	375-405	420-480 
Alvo 2	Corante 2	450-495	510-535 
Alvo 3	Corante 3	500-550	565-590 
Alvo 4	Corante 4	630-650	665-685 
SPC	Corante 6		> 700 
Alvo 5	Corante 5	555-590	606-650 

Deteção de múltiplos corantes – 10 corantes agora

- São selecionados diferentes corantes (repórteres)
- São excitados e emitem em diferentes comprimentos de onda

		Deteção do iCore			
Canais óticos iCore		Azul + IV (420 nm-477 nm + > 700 nm)	Verde + Vermelho profundo (510 nm-535 nm + 660 nm-680 nm)	Amarelo (565 nm-585 nm)	Vermelho (620 nm-645 nm)
Excitação do iCore	UV (400 nm)	CF1			
	Azul (470 nm)		FAM	CF7 (FAM-CF3)	CF9
	Verde (520 nm)	CF10 (CF3-CF6)		A532 (CF3)	CF8 (CF3-CF4)
	Amarelo (574-584 nm)				TxR (CF4)
	Vermelho (635 nm)	CF6	A647 (CF5)		

Quantificação por PCR em tempo real

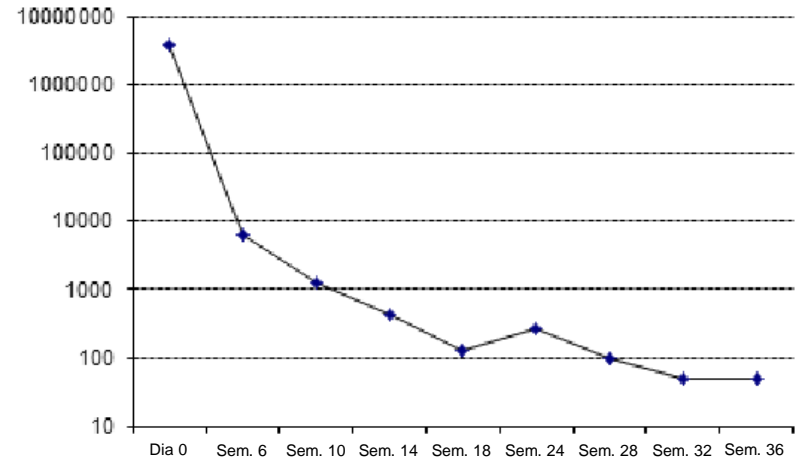


Quantificação

- Quantificação absoluta: resultado apresentado sob a forma de uma concentração (cópias/ml, UI/ml, etc.):

Xpert HIV-1 VL e Xpert HCV

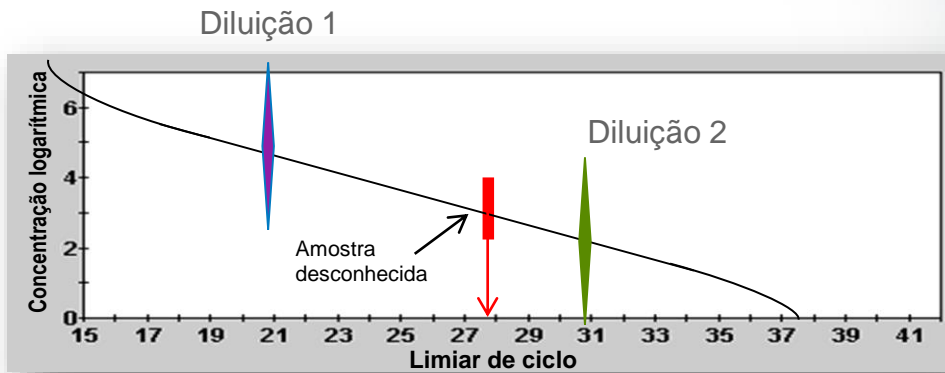
- Quantificação relativa: resultado apresentado sob a forma de um rácio: Xpert BCR-ABL



Diminuição da carga viral de VIH-1 com TAR
(outro método que não o GeneXpert).
Gráfico: hivbook.com

Quantificação absoluta com padrões externos

1. Prepare diluições de uma amostra contendo o ADN alvo com uma concentração conhecida.
2. Estas diluições serão ensaiadas em simultâneo com a sua amostra desconhecida, em tubos separados
3. Para cada diluição é indicado o Ct
4. É traçada a curva padrão: Ct versus concentração
5. O Ct da amostra desconhecida é utilizado para extrapolar a sua concentração a partir da curva padrão



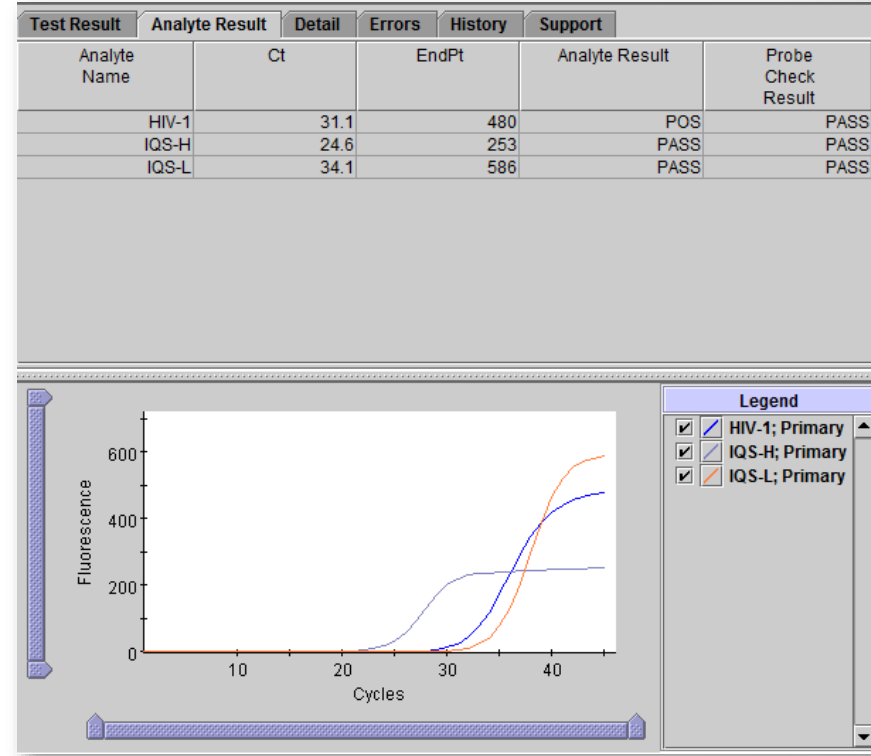
Dentro do intervalo linear da concentração, são suficientes 2 padrões

Quantificação absoluta com padrões internos.

Para o Xpert HIV-1 VL:

São utilizados 2 padrões para calcular a concentração da amostra:

- 1 padrão alto (IQS-H) = 10^6 cópias/ml
- 1 padrão baixo (IQS-L) = 10^3 cópias/ml
- Com base nos Ct e na concentração conhecida de cada padrão e no Ct da amostra desconhecida, a concentração da amostra desconhecida será calculada pelo software GeneXpert.



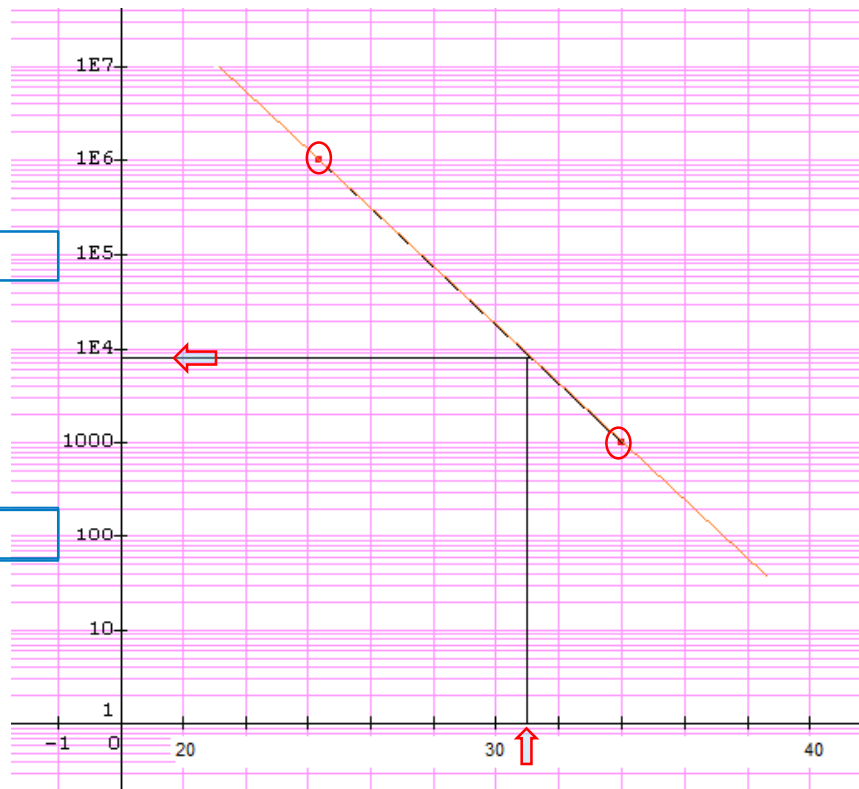
Cálculo da concentração da amostra

$y = \text{carga viral}$
(cópias/ml)

Analyte Name	Ct
HIV-1	31.1
IQS-H	24.6
IQS-L	34.1

IQS-H

IQS-L



$x = Ct$

Quantificação relativa com PCR em tempo real

(ex.: Xpert BCR-ABL)

- A quantificação relativa mede o nível de um alvo e expressa-o em relação ao nível de um controlo interno (gene de referência)
- O gene de referência pode ser endógeno. Como tal, também pode garantir que é utilizada amostra suficiente no teste.
- Devido à sua reduzida variabilidade, o controlo endógeno também pode ser utilizado para indicar inibição da PCR.



**POSITIVO [1,54% (IS) e MR1,81]
(POSITIVE [1.54% (IS) and MR1.81])**

Exemplo de um resultado do teste
Xpert BCR-ABL Ultra

Conclusão

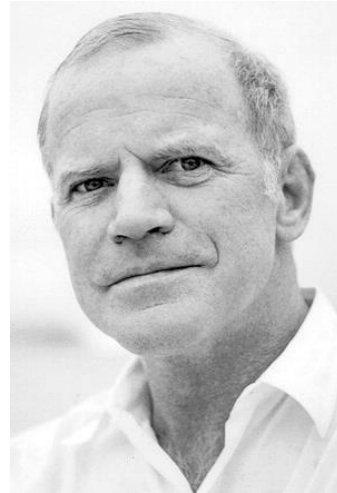
A RT-PCR é:

- Rápida
- Sensível
- Precisa
- Fácil de executar
- Pode ser quantitativa

“

A ciência produz consistentemente uma nova colheita de verdades miraculosas e de dispositivos espetaculares todos os anos.

Kary Mullis





Obrigado.

www.Cepheid.com

