

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 07 Versão: 04 Página 1

REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

Introdução

A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica. O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação.

O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida que DNA dupla fita é gerado, em virtude da concentração do corante SybrGreen I entre as cadeias de DNA geradas. A presença de DNA em fita dupla na solução é capaz de aumentar essa emissão de luz em cerca de 100 vezes para uma mesma concentração de SybrGreen I. Ambos os sistemas de emissão de luz (sonda TaqMan e Sybr Green) podem ser utilizados para detecção e quantificação em PCR em tempo real. TaqMan aumenta a especificidade da reação, mas apresenta um maior custo pela utilização de um oligonucleotídeo modificado além dos *primers* habituais para PCR. Sybr Green é agente inespecífico e revela qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação. Em decorrência desse fato, os ensaios que utilizam esse agente devem ter desenho cauteloso para evitar-se possíveis resultados espúrios.

O Laboratório de Metabolismo e Lípidos possui a plataforma StepOnePlus Real-Time PCR System (*Applied Biosystems* Life Technologies).

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 07

Versão: 04

Página 2

O programa gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido automaticamente, no qual a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva apresenta a fluorescência da amplificação aumentando exponencialmente. O número do ciclo cuja fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (*cycle threshold*). Para a determinação do Ct, o software deste equipamento exige a confecção de uma curva de diluição seriada para determinação do grau de eficiência de amplificação da reação e utiliza como critério de validação eficiência maior que 90%, pois uma reação 100% eficiente produz um aumento de 10 vezes no amplicon da PCR a cada 3,2 ciclos durante a fase exponencial da reação.

Todas as reações devem ser realizadas em duplicata, no mínimo, e são consideradas aceitáveis quando o desvio padrão foi menor que 0,4 ou quando tiver um Ct de diferença < 1.

A quantificação da expressão gênica é realizada através do cálculo da expressão bruta demonstrado pelo algoritmo $2^{-\Delta Ct}$ ou pelo Ct comparativo (expressão gênica relativa) demonstrado pelo algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O valor de ΔCt equivale à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador. A diferença entre os valores de Ct (ΔCt) entre as amostras para cada gene alvo, após normalização pelo Ct do gene de expressão constante (*housekeeping gene* ou *endogenous control gene*), reflete sua expressão diferencial. O $\Delta\Delta Ct$ dá-se pela diferença do ΔCt da amostra alvo – o ΔCt da amostra controle. O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída nos tecidos estudados.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Revisado por: Carolina Graziani Vital

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	 <small>CIÊNCIA E HUMANISMO</small>
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 07 Versão: 04 Página 3

Preparo da reação de PCR em tempo real

Cabine de PCR

1. Limpar com etanol 70%, DNA Zap e ligar a luz UV por 15 minutos.
 2. Buscar as pipetas eletrônicas no armário da Sala de Cultura de Células e deixar na cabine com luz UV.
 3. Ligar a máquina de gelo.
 4. Usar luvas SEM talco ou qualquer outra substância que possa interferir na leitura do equipamento.
 5. Tudo o que está dentro da cabine é de uso exclusivo para a reação de PCR. Pipetas, ponteiras com filtro e microtubos não devem sair de lá de dentro e se acabar as ponteiras ou microtubos, pegar caixa/vidro novos e estéreis.
- OBS:** A reação de síntese de cDNA, por ser uma PCR, também pode ser realizada dentro da cabine de PCR.
6. Deixar os *primers* ou sondas descongelando no gelo protegidos da luz.
 7. Retirar o Master Mix da geladeira (dentro da caixa plástica com o nome “Priscila”)
 8. Retirar os cDNAs do freezer -20°C já diluídos em TE. A diluição vai depender da concentração do RNA transcrito.
 9. Calcular o volume final de reagentes (Master Mix, água ultrapura e sonda TaqMan ou *primer*) e fazer um mix de reação de acordo com a quantidade de amostras que receberão o mix, sempre estimando 2% ou 4 amostras a mais do volume calculado.
 10. Ligar o computador acoplado ao equipamento (vide POP Termociclador StepOne Plus) e deixá-lo pronto para montar o protocolo de corrida

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 07

Versão: 04

Página 4

11. Buscar água ultrapura, Milli-Q

12. Concluídos os 15 minutos de luz UV, desligar e ligar a luz branca e ventilação da cabine de PCR.

13. Iniciar o preparo da reação: as pipetagens para fazer o mix de reação devem, preferencialmente ir do maior para o menor volume, nas seguintes condições:

- TaqMan Master Mix ou SyBr Green Master Mix ----- 6 uL
- H₂O Milli-Q ----- 2,4 uL
- TaqMan Assay Mix (20x) ----- 0,6 uL

*Primers devem ter suas concentrações otimizadas, ajustando o volume final da reação para 12 uL.

14. Pegar uma microplaca dentro da caixa ao lado da cabine (abrir o saco plástico onde elas estão guardadas, dentro da cabine de PCR), tomando o cuidado para não tocar no fundo ou em cima dela.

15. Encaixar a microplaca no suporte azul que está dentro da cabine e tomar o cuidado de não ficar passando a mão com os reagentes por cima dela

16. Pipetar o mix feito no volume de 9 uL – usar a pipeta eletrônica (maior volume)

17. Adicionar 3 uL do cDNA (diluído ou não), completando um volume final de reação de 12 uL. Também usar a pipeta eletrônica, lembrando que a reação deve ser feita no mínimo em duplicata (pipeta de menor volume)

18. Selar a placa cuidadosamente com o filme óptico adesivo sem deixar formar vincos. Utilize o aparato adequado. Ambos, a caixa com filmes ópticos e o aparato de plástico, encontram-se dentro da cabine. Retire a proteção branca que vem no adesivo e sele a placa.

19. Coloque o suporte para a centrífuga de microplacas

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

Revisado por: Carolina Graziani Vital

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 07 Versão: 04 Página 5

20. Centrifugue por 2 minutos a 1.200 r.p.m. apenas para assentar o volume da reação no fundo do poço.

21. Leve a microplaca já selada e centrifugada até o equipamento. Sempre tomando cuidado em não tocar no fundo ou em cima dela.

22. Abra a gaveta do equipamento e coloque a microplaca

23. Empurre a gaveta de volta

24. Preencha as informações necessárias no software do equipamento para a corrida dar início, de acordo com o protocolo que está realizando. Salve a corrida e ela se iniciará.

25. Ao término da corrida, os resultados estarão salvos no computador, que permite exportar esse dados em planilha de Excel em USB.

26. O computador pode ser então desligado. O equipamento continua em Stand-by. Ele fica ligado no no-break.

27. A microplaca pode ser descartada em lixo branco, infectante.

28. Descarte ponteiros e microtubos utilizados no coletor de material perfuro-cortante.

29. Devolva as pipetas eletrônicas no armário da Sala de Cultura de Células.

30. Fechar todas as caixas e vidros de dentro da cabine. Não deixar nada aberto! Limpe com etanol 70% a cabine de PCR e apague a luz branca e ventilação.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	