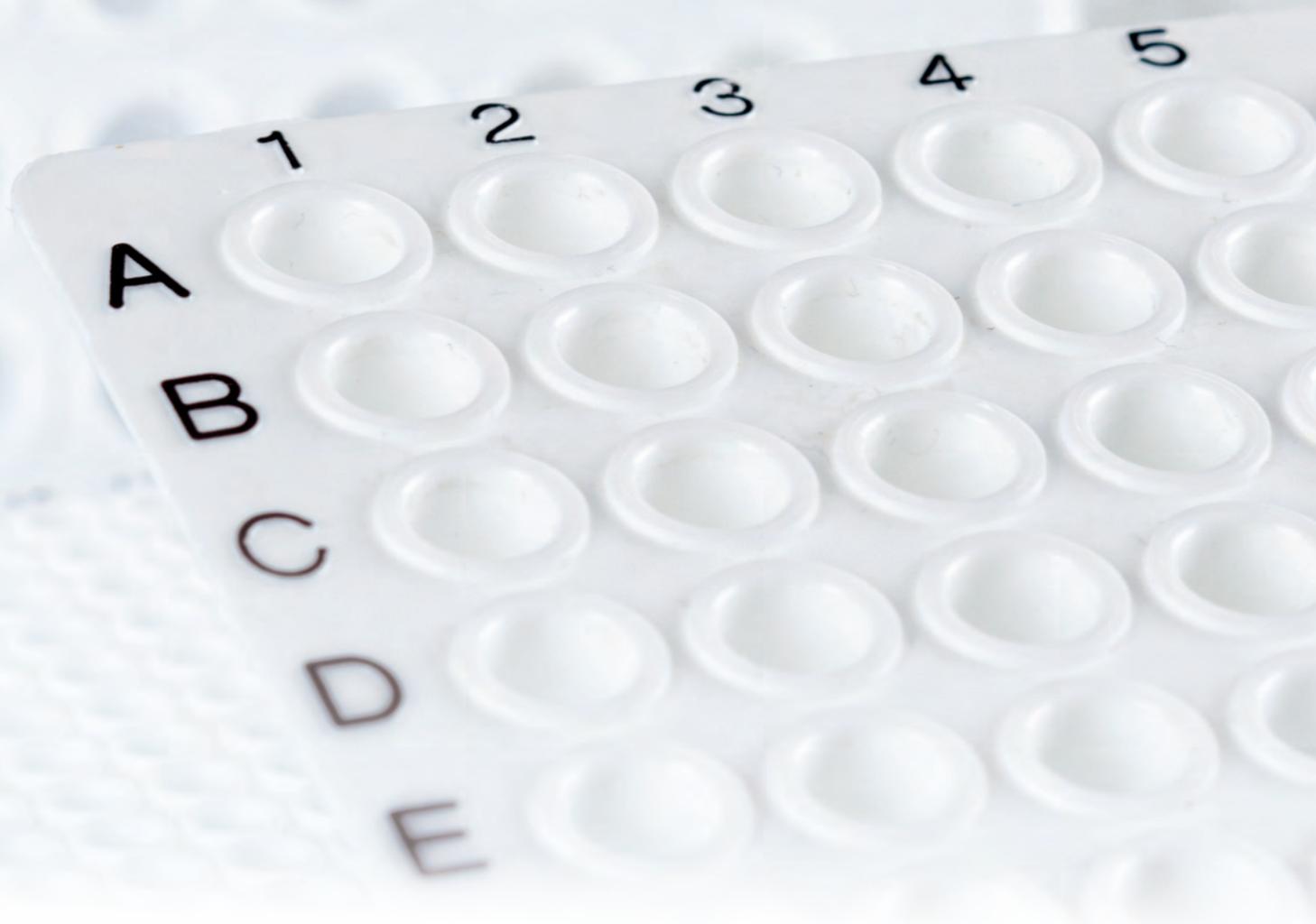


# Dica do mês

PCRs em tempo real mais precisas com os recipientes de PCR brancos

Melhor reprodutibilidade - Sensibilidade otimizada – Prevenção de contaminação cruzada (“crosstalk”)



# PCRs em tempo real mais precisas com os recipientes de PCR brancos

As aplicações baseadas em fluorescência, como a PCR em tempo real (qPCR), principalmente em caso de utilização de pequenos volumes, se beneficiam das propriedades de reflexão significativamente melhores dos consumíveis de PCR brancos. No entanto, muitas vezes ainda são utilizados consumíveis transparentes para a realização de qPCRs. Descubra aqui como é possível melhorar suas qPCRs de forma muito simples.

## De que forma a utilização dos recipientes de PCR brancos influenciam na reprodutibilidade?

Graças à reflexão de fluorescência máxima dos recipientes brancos, por um lado não se perde a luz de fluorescência através da migração dos poços e, por outro, a quantidade de luz de fluorescência que chega ao detector é mais constante do que com a utilização de produtos transparentes. Sendo assim, é possível obter uma menor dispersão na detecção de duplicados e triplicados, bem como na repetição de experimentos.



Placa de PCR transparente e branca em comparação

## Como é possível conseguir uma relação sinal/fundo melhor?

Devido aos níveis de fluorescência muito superiores dos consumíveis de PCR brancos e aos efeitos de fundo constantes graças ao fluoróforo usado, na detecção em recipientes de PCR brancos se consegue uma relação sinal/fundo melhor.

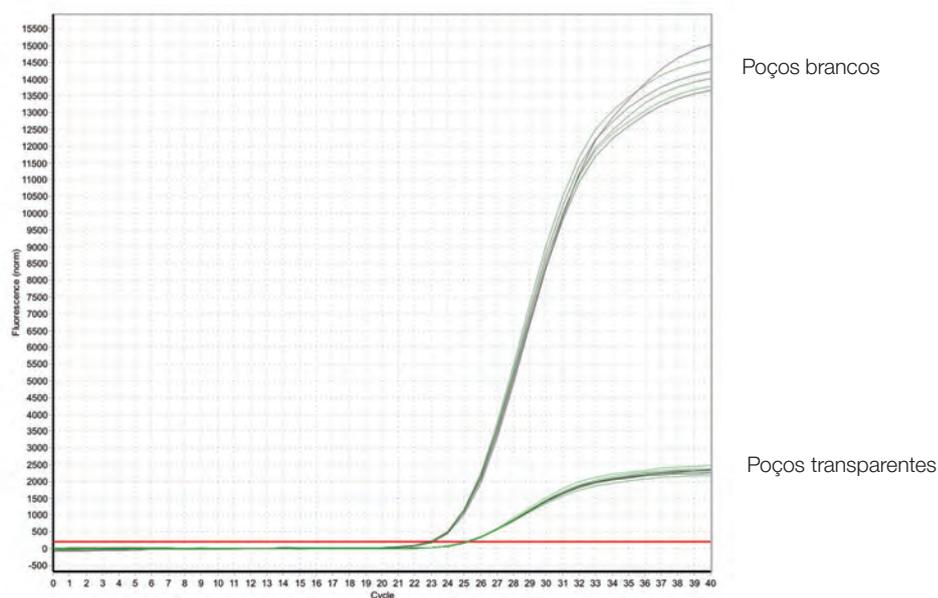
## A contaminação cruzada ("crosstalk") entre os poços pode ser prevenida?

Se forem usados poços transparentes, devido à dispersão da luz de fluorescência, é possível que seja detectada a fluorescência dos poços adjacentes. Devido à coloração completa e opaca dos consumíveis de PCR brancos, os detectores de fluorescência dos termocicladores não conseguem mais detectar sinais de fluorescência dos poços adjacentes.

## De que forma a utilização de recipientes de PCR brancos altera a sensibilidade da PCR?

Gostaríamos de representar esta pergunta de acordo com um experimento de qPCR comparativo. O resultado do experimento representado na fig. 1 começa por ilustrar que a intensidade de fluorescência medida com a mesma quantidade de modelo é significativamente maior em recipientes brancos do que em transparentes. O limiar para as cadeias de PCR transparentes e para as brancas na fig. 1 foi calculado automaticamente pelo termociclador, de forma independente para cada cadeia. Para a detecção das 1.000 moléculas do modelo nos recipientes transparentes, foi calculado um valor Cq médio (n = 8) de  $24,87 \pm 0,08$  e para os recipientes brancos, um valor Cq de  $23,40 \pm 0,07$ . Isto significa que nos recipientes brancos a detecção acontece mais cedo. Isto é vantajoso principalmente no caso de haver apenas pequenas quantidades de amostra. Assim, com a utilização de consumíveis brancos, é possível obter uma detecção ainda melhor quando já não é possível nenhuma corrida de PCR razoável com consumíveis transparentes.

## Comparação do nível de fluorescência de poços brancos e transparentes



**Fig. 1** Corrida de PCR comparativa das cadeias de PCR 72.985.002 (transparente) e 72.985.092 (branca) fechadas com cadeias de tampas altamente transparentes 65.989.002. Foi ampliado um fragmento de 100 bp do plasmídeo EmGFP (1.000 moléculas da quantidade do modelo) em um volume de 20 µl com o termociclador Eppendorf realplex 4S (n = 8).

## Como é possível uma redução econômica de volume dos lotes de experimentos?

Dado que com os consumíveis de PCR brancos é possível obter um nível de fluorescência muito superior, o volume dos lotes de experimentos e, assim, as quantidades dos reagentes usados (enzima, sonda, primer, etc.) podem ser substancialmente reduzidas. Isto permite economizar nos custos com reagentes.

**Conclusão:** A utilização de consumíveis de PCR brancos acarreta vantagens consideráveis, que não devem ser ignoradas. Não comprometa seus resultados apenas para conseguir realizar uma verificação visual dos poços lateralmente ou por baixo!

