

Título do estudo

Avaliação da expressão diferencial dos genes Oct4, Sox2, Nanog e Rex1 pela abordagem de quantificação absoluta por ddPCR

Identificação da Instalação de Teste

CROP Biolabs

Prudenciatti e Ribeiro Pesquisa e Desenvolvimento LTDA

38.286.342/0001-92

Unidade de Teste: Laboratório de Biotecnologia Aplicada, Avenida Professor Mário Rubens Guimarães, Av. Prof. Montenegro, S/N - Jardim Sao Jose, Botucatu - SP, 18618-970

Responsável Técnico

Dr. Lucas Gabriel Ribeiro

CRQIV: 04368883

Telefone: +55 19 99986-9383

E-mail: lucas@cropBiolabs.com

Identificação do cliente

Razão Social: **HemoCord Clínica Médica LTDA**

CNPJ: **24.797.131/0001-00**

Endereço: **Av. SAP, 151/114 – TECNOSINOS – Prédio UNITEC 3 - São Leopoldo (RS) CEP: 93022-718**

Telefone: **(51) 3019-3450**

E-mail: **liziane.raquel@hemocord.com.br**


Metodologia de estudo

Técnica de quantificação absoluta de expressão gênica por ddPCR (*Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*).

Declaração do Programa da Garantia da Qualidade

Este relatório técnico teve averiguação da garantia da qualidade da Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA (Crop Biolabs) para a verificação da conformidade. Os resultados declarados nesse relatório apresentam os dados brutos do estudo. O cronograma de inspeções do projeto está descrito abaixo:

Tipos de inspeções	Registro de inspeções
Descrição	Data de inspeção/relato
Início do experimento	01/04/2023
Término do experimento	20/04/2023
Início do estudo	15/03/2023
Término do estudo	02/05/2023



Lucas Gabriel Ribeiro

Gerente da Instalação de Teste

Responsável pelo Programa da Garantia da Qualidade

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: aru@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



Sumário

Declaração do Programa da Garantia da Qualidade	2
1. Introdução	5
1.1 Objetivos	5
1.2 Instalação teste e período de execução experimental	5
1.3 Pessoal envolvido no estudo	5
1.4 Armazenamento e retenção de registros e materiais	5
2. Materiais e métodos	6
2.1 Identificação das amostras (item teste)	6
2.3 Equipamentos, reagentes e soluções	6
2.4 Metodologia de estudo	7
2.4.1 Extração de RNA	7
2.4.2 Ensaios TaqMan e reação de RT-ddPCR	8
3. Resultados	9
4. Conclusão	12

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



Resumo

O projeto em questão visa a quantificação absoluta de expressão dos genes Oct4, Sox2, Nanog e Rex1 em amostras por ddPCR. As amostras de RNA utilizadas foram previamente extraídas utilizando o protocolo de extração por Trizol e tratadas com DNase. Para detecção dos alvos, as amostras foram diluídas na razão de 1/10 em água livre de nuclease para que ficasse com uma concentração inferior a 10 ng/μL. Para quantificação dos transcritos dos genes alvos, foi realizado protocolo de ddPCR (*Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*), que consiste em dividir cada uma das amostras em gotículas contendo um fragmento de material genético para que haja a amplificação e contagem precisa de moléculas-alvo presentes na amostra com base na fração de gotículas positivas e negativas.

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



1. Introdução

1.1 Objetivos

O objetivo do estudo foi de quantificar de forma absoluta a expressão dos genes Oct4, Sox2, Nanog e Rex1 em amostras por ddPCR

1.2 Período de execução experimental

Abaixo estão detalhadas as datas de condução experimentais e de elaboração dos relatórios técnicos.

Fase de estudo	Data de execução
Delineamento experimental	01/04/2023
Início da fase experimental	01/04/2023
Fim da fase experimental	20/04/2023
Emissão do Relatório Técnico Final	02/05/2023

1.3 Pessoal envolvido no estudo

Função	Responsável
Gerente da Qualidade e da Instalação de Teste	Lucas Gabriel Ribeiro
Pesquisador Principal	Leonardo Nazario

1.4 Armazenamento e retenção de registros e materiais

O formulário de envio de amostras referente aos equipamentos enviados, o relatório técnico final e outros documentos e materiais relacionados ao estudo são retidos no sistema informatizado da Prudenciatti e Ribeiro Pesquisa e Desenvolvimento LTDA e serão armazenados por um período de 05 (cinco) anos.

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



2. Materiais e métodos

2.1 Identificação das amostras (item teste)

Descrição	Identificação
Tipo de amostra ² :	Células criopreservadas
Identificação das amostras ² :	M2_IPSC3_C12 M2_IPSC3_K12 M2_IPSC3_P10 M2_IPSC3_R14 M2_IPSC3_M11 M2_IPSC3_A17 M2_IPSC3_O16 M2_IPSC3_B16 M2_IPSC3_L16 M2_IPSC3_N12
Proposta Comercial ¹ :	00170
Datas de fabricação ² :	-
Características ² :	Células pluripotentes
Condições de armazenamento ² :	Armazenamento em freezer -80°C
Data de recebimento das amostras ¹ :	09 de março de 2023

- 1) Informações fornecidas pela Crop Biolabs;
- 2) Informações Fornecidas pelo patrocinador **HemoCord Clínica Médica LTDA.**

2.3 Equipamentos, reagentes e soluções

Os equipamentos, reagentes e demais itens utilizados no estudo estão apresentados abaixo:

Equipamentos	
Código do equipamento	Descrição
EQ.HC.004	Micropipeta 10µL
EQ.HC.001	Agitador Vórtex
EQ.HC.005	Micropipeta 100µL
EQ.HC.007	Micropipeta 1000µL
EQ.HC.003	Centrífuga
EQ.HC.016	Droplet Generator QX200™

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



EQ.HC.015	PX1 PCR Plate Sealer
EQ.HC.014	T100 PCR Thermal Cycler
EQ.HC.017	Droplet Reader QX200™

Reagentes			
Descrição	Lote	Validade	Fabricante
Kit detecção ddPCR Supermix for probe (no dUTP)	L006621B	02/05/2023	Bio-Rad

2.4 Metodologia de estudo

Técnica de quantificação absoluta de expressão gênica por ddPCR (Droplet Digital Polymerase Chain Reaction).

2.4.1 Extração de RNA

As amostras de RNA utilizadas foram previamente extraídas utilizando o protocolo de extração por Trizol e tratadas com DNase. Para detecção dos alvos, as amostras foram diluídas na razão de 1/10 em água livre de nuclease para que ficasse com uma concentração inferior a 10 ng/μL. A identificação, grupos e concentração das amostras são indicadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Amostras de RNA.

Amostra	Grupo	Concentração em ng/μL
H1P56/05	Célula embrionária	5,56
MRC5	CN*	8,28
M2_IPSC3_C12	Amostra	3,56
M2_IPSC3_K12	Amostra	2,61
M2_IPSC3_P10	Amostra	6,28
M2_IPSC3_R14	Amostra	8,51
M2_IPSC3_M11	Amostra	5,18
M2_IPSC3_A17	Amostra	8,96
M2_IPSC3_O16	Amostra	6,3
M2_IPSC3_B16	Amostra	8,82
M2_IPSC3_L16	Amostra	8,45
M2_IPSC3_N12	Amostra	2,58

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | +55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



* Controle negativo para os genes em análise.

2.4.2 Ensaios TaqMan e reação de RT-ddPCR

A **Tabela 2** apresenta informações essenciais sobre os ensaios TaqMan utilizados para detecção dos alvos por ddPCR.

Tabela 2. Ensaios TaqMan utilizados para detecção dos alvos por ddPCR

Assay ID	Gene	Assay Design	Amplicon Length
Hs01938187_s1	Rex1 (ZPF2)	não exon–exon	146
Hs04260367_gH	OcT4 (POU5F1)	exon 4	77
Hs02387400_g1	NANOG	junção exon–1 e exon–2	109
Hs04234836_s1	SOX2	exon–1	89

Para quantificação dos transcritos dos genes alvos, foi utilizado o kit de detecção ddPCR Supermix for probe (no dUTP), cat. #1863023, lote L006621B, data de validade 02/05/2023, Bio-Rad, conforme especificações do fabricante. A reação de RT–ddPCR foi preparada com 1 µL de RNA em 20 µL de reação para cada amostra, para o controle *No Template Control* foi adicionado 1 µL de água em vez de amostra de RNA. As gotas foram geradas na geradora de gotas QX200™ Droplet Generator, Bio-Rad, posteriormente transferidas para placa de PCR e seladas a 180° C por 5 segundos com selo de alumínio. Em seguida, a placa com as amostras foi colocada no termociclador T100 PCR Thermal Cycler sob as seguintes condições de termociclagem: transcrição reversa 45°C por 1 hora, desnaturação inicial e ativação da DNA polimerase a 95°C por 10 minutos, desnaturação e amplificação em 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto, por fim, inativação da enzima a 98°C por 10 minutos. Após a amplificação, as amostras foram lidas na leitora de gotas QX200 Droplet Reader, Bio-Rad, seguindo o protocolo de quantificação absoluta provido pelo software QuantaSoft versão 1.7.4.



3. Resultados

O total de eventos lidos por análise foi superior a 10.000 gotas (eventos). Sendo a menor leitura de 13.846, a maior de 19.651, e com média de 17.009,56 eventos (**Tabela suplementar 01**). O *threshold* para cada alvo (o que separa as gotas positivas e negativas) foi definido em 8000, 4000, 2318 e 4000 para os genes Oct4, Nanog, Sox2 e Rex1, respectivamente, conforme **Figura 1**:

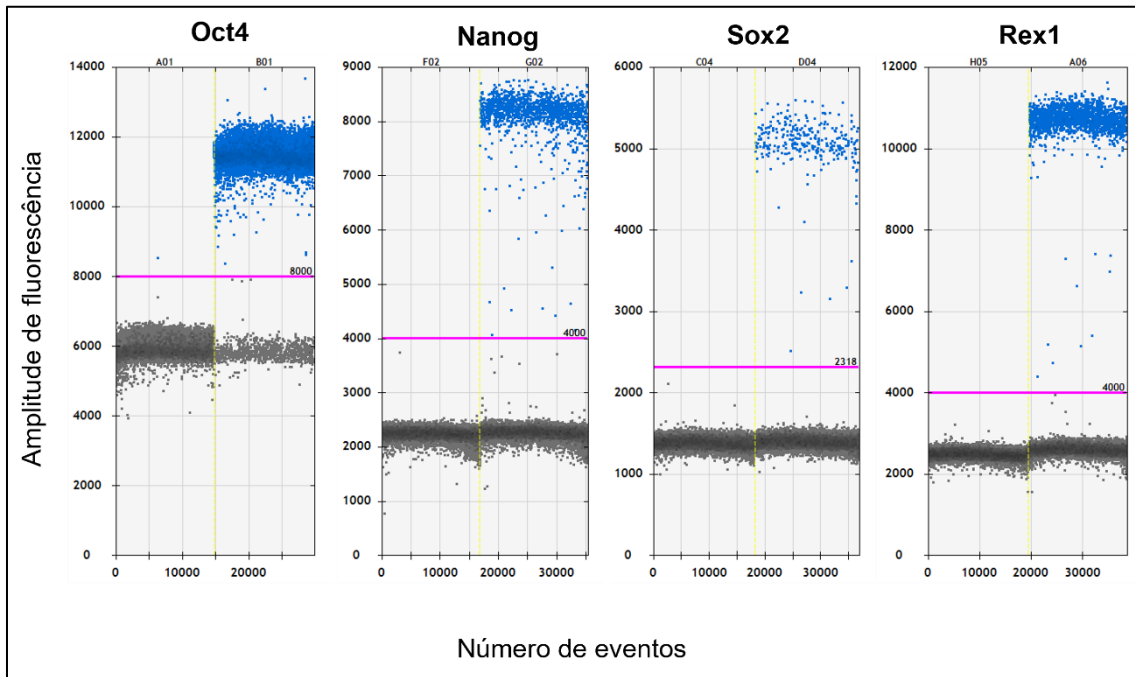


Figura 1. Separação entre gotas positivas e gotas negativas - ddPCR. Cada gráfico representa um dos genes analisados (Oct4, Nanog, Sox2 e Rex1), no eixo y são apresentados os dados de amplitude de fluorescência e no eixo x o número de eventos detectados, os pontos em azul são gotas (drops) positivas e as em preto negativas. A linha rosa representa o threshold que separa as gotas positivas das negativas.



A partir do número de gotas obtidas e com base na distribuição de Poisson, os valores de quantificação foram determinados para cada gene em cada amostra. Os dados em valores absolutos são apresentados na **Figura 2** e **Tabela 3** e os resultados em \log_{10} na **Figura 3**. Informações suplementares na **tabela suplementar 02**.

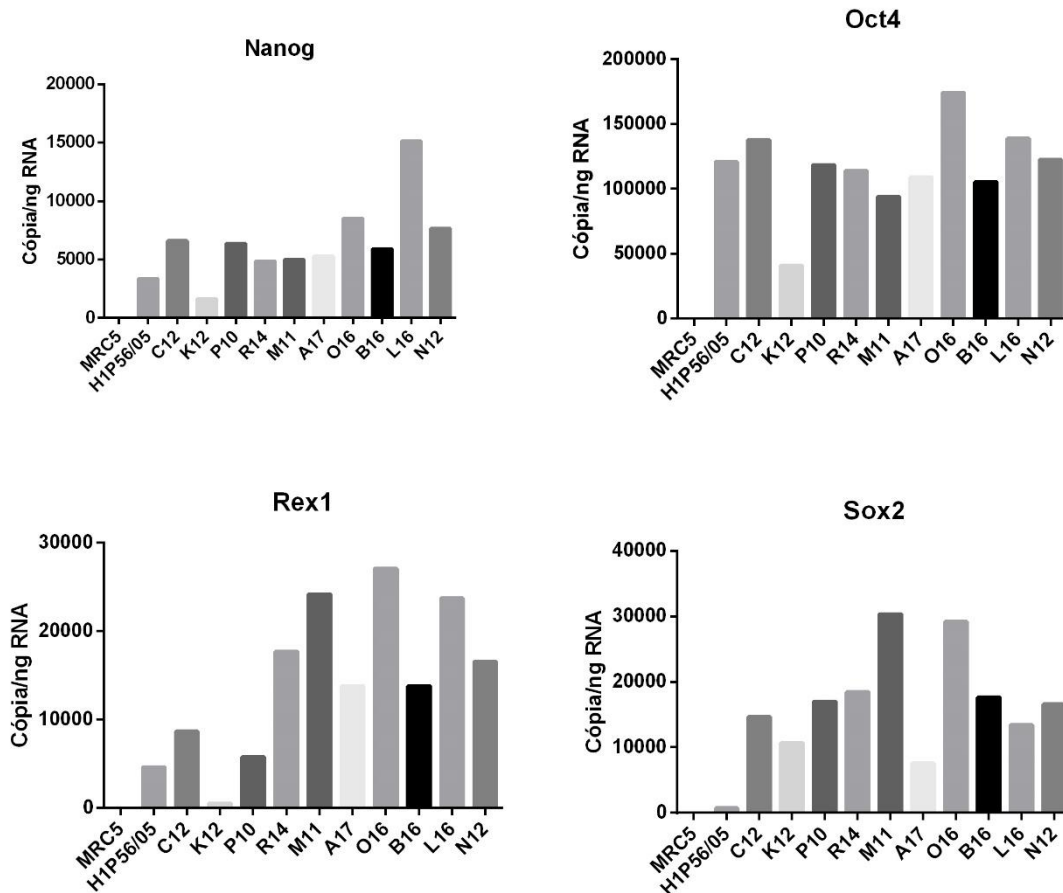


Figura 2. Quantificação absoluta da expressão de genes por ddPCR. Cada gráfico representa um dos genes analisados (Nanog, Oct4, Rex1 e Sox2). No eixo y são apresentados os dados de cópias por nanograma de RNA e no eixo x as respectivas amostras.



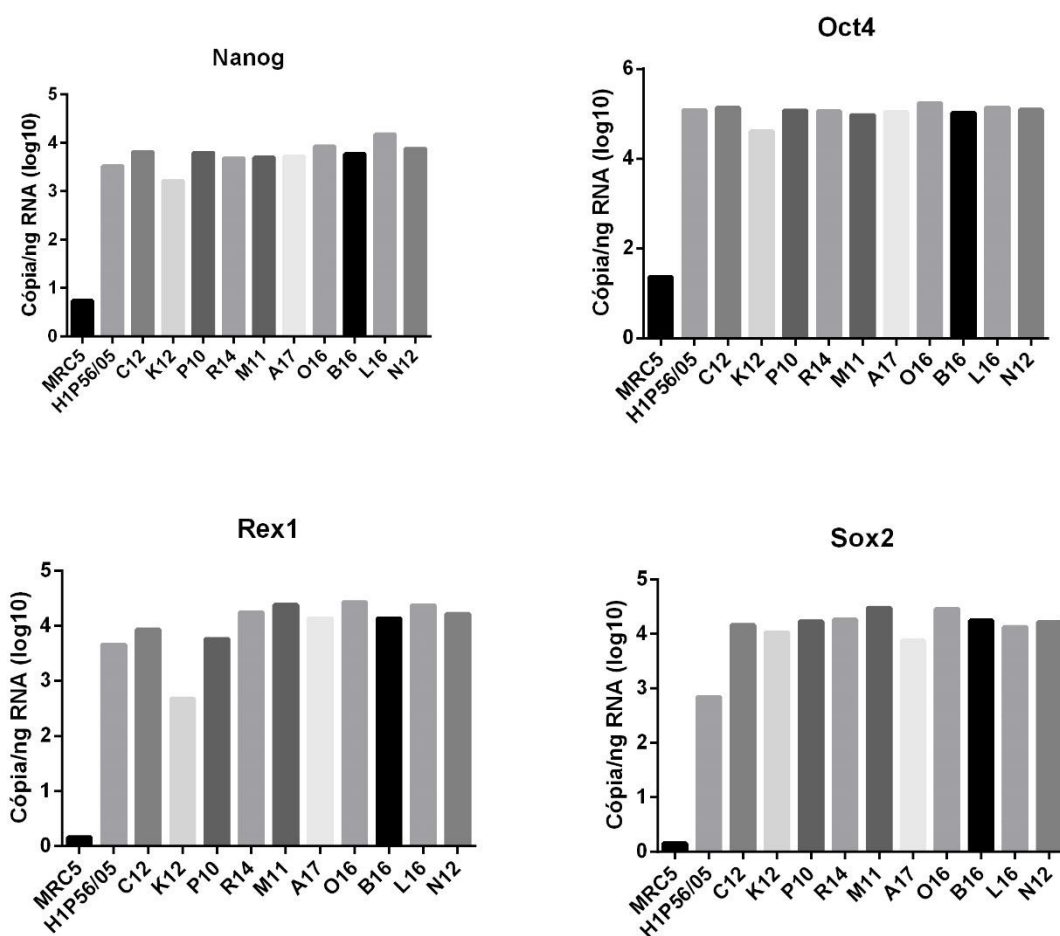


Figura 3. Quantificação absoluta da expressão de genes por ddPCR representado em Log_{10} . Cada gráfico representa um dos genes analisados (Nanog, Oct4, Rex1 e Sox2), no eixo y são apresentados os dados de cópias por nanograma de RNA e no eixo x as respectivas amostras.

Tabela 3 – Número de cópias de transcritos por nanograma de RNA total

Amostra	Cópia/ng de RNA total			
	Nanog	Oct4	Rex1	Sox2
MRC5	5,6	22,9	1,4	1,4
H1P56/05	3363,3	120863,3	4611,5	701,4
C12	6601,1	137752,8	8646,1	14662,9
K12	1639,8	40689,7	475,1	10720,3
P10	6369,4	118471,3	5732,5	17006,4

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: aru@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



R14	4864,9	113983,5	17696,8	18495,9
M11	5015,4	93938,2	24169,9	30347,5
A17	5290,2	108928,6	13794,6	7544,6
O16	8539,7	174285,7	27079,4	29174,6
B16	5918,4	105442,2	13786,8	17641,7
L16	15147,9	138934,9	23716,0	13443,8
N12	7651,2	122558,1	16511,6	16589,1

4. Conclusão

A análise de quantificação absoluta por ddPCR mostrou que as amostras C12, K12, P10, R14, M11, A17, O16, B16, L16 e N12 expressaram os genes Oct4, Nanog, Sox2 e Rex1 e a amostra controle MRC5 apresentou uma expressão muito baixa para os mesmos genes.

Em relação a amostra controle positivo (H1P56/05):

- Todas as amostras para o transcrito Nanog e Rex1, exceto a amostra K12, apresentaram expressão superior;
- Para o transcrito Sox2, todas as amostras apresentaram expressão superior;
- Já para o transcrito Oct4, apenas as amostras C12, O16 e L16 apresentaram expressão superior.

Este relatório refere-se às amostras analisadas, não sendo aplicável ou extensível a outros lotes.

Responsável técnico

Chief Scientific Officer (CSO)

Eng. de Bioprocessos e Biotecnologia

Dr.º Lucas Gabriel Ribeiro

CRQ: 04368883

Aviso Legal:

Os resultados apresentados nesse relatório técnico são referentes somente as amostras avaliadas. Os procedimentos e resultados foram executados de acordo com Boas Práticas Laboratoriais (BPLs). No entanto, além do que é expresso no relatório: (1) quaisquer usos pelo cliente dos resultados reportados devem ser de entendimento e concordância da Crop para verificação de uso correto de informações providos por esse relatório ou (2) que os resultados esperados pelos clientes podem ser alcançados ou (3) que o cliente pode livremente fazer uso desses resultados ou entregáveis desde que não infrinja nenhum direito ou propriedade intelectual de terceiros.

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



Tabela suplementar 01. Total de gotas/eventos lidos por amostra vs transcrito alvo.

Amotras	Genes alvos	Eventos positivos	Eventos negativos	Total de eventos	Threshold
H1P56/05	Oct4	14176	862	15038	8000
H1P56/05	Nanog	1409	17032	18441	4000
H1P56/05	Sox2	306	18349	18655	2318
H1P56/05	Rex1	1961	17038	18999	4000
MRC5	Oct4	13	16169	16182	8000
MRC5	Nanog	3	15625	15628	4000
MRC5	Sox2	1	18201	18202	2318
MRC5	Rex1	1	18591	18592	4000
M2_IPSC3_C12	Oct4	12940	1839	14779	8000
M2_IPSC3_C12	Nanog	1588	15114	16702	4000
M2_IPSC3_C12	Sox2	3582	14392	17974	2318
M2_IPSC3_C12	Rex1	2276	16287	18563	4000
M2_IPSC3_K12	Oct4	5978	10470	16448	8000
M2_IPSC3_K12	Nanog	268	14621	14889	4000
M2_IPSC3_K12	Sox2	2079	16465	18544	2318
M2_IPSC3_K12	Rex1	73	13773	13846	4000
M2_IPSC3_P10	Oct4	15032	665	15697	8000
M2_IPSC3_P10	Nanog	2623	14120	16743	4000
M2_IPSC3_P10	Sox2	6310	10976	17286	2318
M2_IPSC3_P10	Rex1	2525	15297	17822	4000
M2_IPSC3_R14	Oct4	15950	262	16212	8000
M2_IPSC3_R14	Nanog	2598	13489	16087	4000
M2_IPSC3_R14	Sox2	8656	9092	17748	2318
M2_IPSC3_R14	Rex1	8974	10014	18988	4000
M2_IPSC3_M11	Oct4	13150	1903	15053	8000
M2_IPSC3_M11	Nanog	1819	15579	17398	4000
M2_IPSC3_M11	Sox2	9190	9676	18866	2318
M2_IPSC3_M11	Rex1	7944	11306	19250	4000
M2_IPSC3_A17	Oct4	17061	273	17334	8000
M2_IPSC3_A17	Nanog	2633	11819	14452	4000
M2_IPSC3_A17	Sox2	4521	13603	18124	2318
M2_IPSC3_A17	Rex1	7363	10646	18009	4000
M2_IPSC3_A16	Oct4	16798	159	16957	8000
M2_IPSC3_A16	Nanog	3586	13968	17554	4000
M2_IPSC3_A16	Sox2	9985	8427	18412	2318
M2_IPSC3_A16	Rex1	9577	8993	18570	4000
M2_IPSC3_B16	Oct4	15772	309	16081	8000
M2_IPSC3_B16	Nanog	3302	13270	16572	4000
M2_IPSC3_B16	Sox2	8739	9322	18061	2318
M2_IPSC3_B16	Rex1	7001	10347	17348	4000

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: aru@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



M2_IPSC3_L16	Oct4	14437	99	14536	8000
M2_IPSC3_L16	Nanog	6986	9661	16647	4000
M2_IPSC3_L16	Sox2	6983	11245	18228	2318
M2_IPSC3_L16	Rex1	8952	6660	15612	4000
M2_IPSC3_N12	Oct4	10729	3786	14515	8000
M2_IPSC3_N12	Nanog	1215	13878	15093	4000
M2_IPSC3_N12	Sox2	3081	15460	18541	2318
M2_IPSC3_N12	Rex1	2556	12866	15422	4000
CN	Oct4	0	14861	14861	8000
CN	Nanog	1	16973	16974	4000
CN	Sox2	0	18311	18311	2318
CN	Rex1	0	19651	19651	4000

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP |
Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



Tabela suplementar 02. Valores absolutos e em log do número de cópias dos transcritos por nanograma de RNA total.

Amostras	Oct4	Oct4 (log10)	Nanog	Nanog (log10)	Sox2	Sox2 (log10)	Rex1	Rex1 (log10)
MRC5	22,95	1,36	5,56	0,74	1,45	0,16	1,45	0,16
H1P56/05	120863,31	5,08	3363,31	3,53	701,44	2,85	4611,51	3,66
M2_IPSC3_A17	108928,57	5,04	5290,18	3,72	7544,64	3,88	13794,64	4,14
M2_IPSC3_B16	105442,18	5,02	5918,37	3,77	17641,72	4,25	13786,85	4,14
M2_IPSC3_C12	137752,81	5,14	6601,12	3,82	14662,92	4,17	8646,07	3,94
M2_IPSC3_K12	40689,66	4,61	1639,85	3,21	10720,31	4,03	475,10	2,68
M2_IPSC3_L16	138934,91	5,14	15147,93	4,18	13443,79	4,13	23715,98	4,38
M2_IPSC3_M11	93938,22	4,97	5015,44	3,70	30347,49	4,48	24169,88	4,38
M2_IPSC3_N12	122558,14	5,09	7651,16	3,88	16589,15	4,22	16511,63	4,22
M2_IPSC3_O16	174285,71	5,24	8539,68	3,93	29174,60	4,47	27079,37	4,43
M2_IPSC3_P10	118471,34	5,07	6369,43	3,80	17006,37	4,23	5732,48	3,76
M2_IPSC3_R14	113983,55	5,06	4864,86	3,69	18495,89	4,27	17696,83	4,25

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br

