

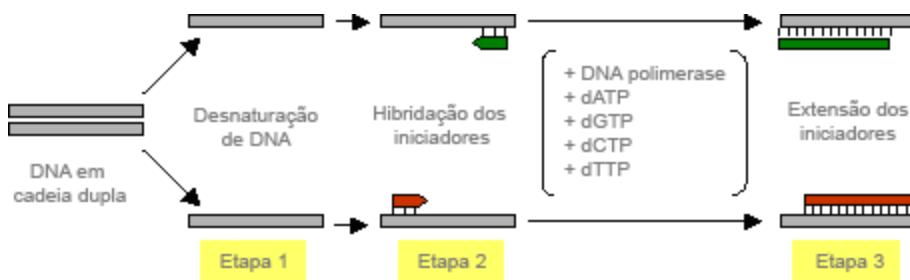
Clonagem independente de células vivas- PCR

Reação em cadeia da polimerase (em inglês Polymerase Chain Reaction - PCR) é um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucleico) sem o uso de um organismo vivo, por exemplo, *Escherichia coli* (bactéria) ou leveduras.

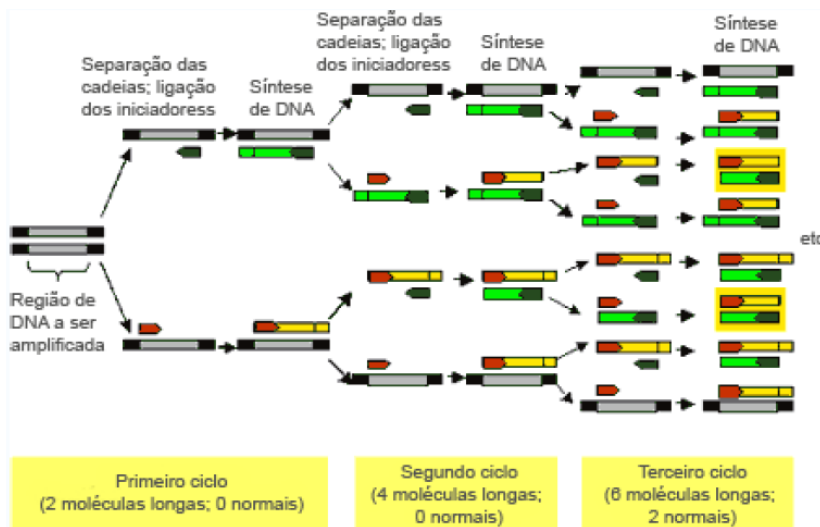
Em 1993, Kary Mullis, um geneticista ao serviço da Cetus, uma empresa de Biotecnologia da Califórnia, recebeu o prêmio Nobel da Química pelo desenvolvimento de um método que permite sintetizar, em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de DNA. Esta técnica faz parte integrante da moderna biotecnologia molecular, tendo trazido um enorme progresso a áreas como o diagnóstico de doenças, medicina forense entre muitas outras. A Reação em Cadeia da Polimerase é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado.

Em primeiro lugar, deve-se extrair o material genético da célula ou outro material a ser estudado sem danificá-lo, a este é adicionada uma mistura (também conhecida como pré-mix) que contém os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com um três fosfato, os *primers* também chamados de oligonucleotídeos (ou iniciadores) e a enzima DNA polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação (fragmento a ser amplificado).

Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada de 94 a 96°C por pouco tempo para que haja a separação da dupla cadeia de DNA (Desnaturação). Na segunda etapa, a temperatura é reduzida entre 50 a 60°C dependendo da quantidade de C e G encontrada no primer, para que os primers se anelem (pareiem) com a fita molde de DNA (anelamento). Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72°C para que a enzima possa funcionar sintetizando a nova molécula (extensão), em seguida um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos para cada reação. O resultado é analisado através de uma eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida.



<http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339>



<http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339>

Vídeo - PCR: http://www.youtube.com/watch?v=_YgXcJ4n-kQ

Entendendo os primers da PCR

Primers ou iniciadores são segmentos de ácidos nucleicos de sequência complementar ao DNA. Os primers são necessários para o início da replicação do DNA devido a DNA polimerase necessitar de uma extremidade 3'OH livre para iniciar a síntese de DNA. Durante a replicação do DNA em células, os primers são produzidos pela ação da RNA-polimerase especial (primase), que usualmente sintetiza RNA de transcrição 5'-3'.

Existem considerações importantes a serem avaliados para o **desenho** de *primers*, a saber:

- Comprimento do *Amplicon* – no qual recomenda-se não ultrapassar o tamanho de 2000 pb;

- Temperatura de Melting – quando metade de uma fita dupla de DNA está dissociada em fita simples, com bons resultados em temperaturas de 52 a 58°C;
- Temperatura de Anelamento de *Primers* – que deve ser em torno de 5°C abaixo da menor temperatura de Melting do par de *primer* utilizado;
- Estabilidade da Região 3' – quando a polimerase requer ligação de *primers* no final 3' par iniciar a extensão, onde as ligações não específicas nessa extremidade prejudicam a reação de PCR, já ligações não específicas na região 5' não prejudicam necessariamente a reação de PCR;
- Porcentagem de GC – para que se tenha uma boa estabilidade de ligação entre as fitas de DNA, 40 a 60% das bases nitrogenadas devem ser compostas de GC, sendo que 3 ou mais repetições da base nitrogenada G ou C deve ser evitado nas 5 bases da extremidade 3' do primer, pois poderia formar dímeros e atrapalhar a reação de PCR;
- Tipo de *Primers* – estes podem ser dos tipos específico ou degenerados (que se anela em diferentes locais);
- Comprimento dos *Primers* – estes devem conter de 18 a 30 bases e evitar anelamentos inespecíficos, já longos *primers* apresentam grandes possibilidades de hibridizações erradas, como também a formação de “Self-Dimer”, “Hairpin” ou “Cross-Dimer”;

Referência

Lodish, Harvey... [et al.]. Molecular Cell Biology. 6th ed.. New York : W. H. Freeman, c2008.