



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

QBQ0317 – 2020

Aula 16

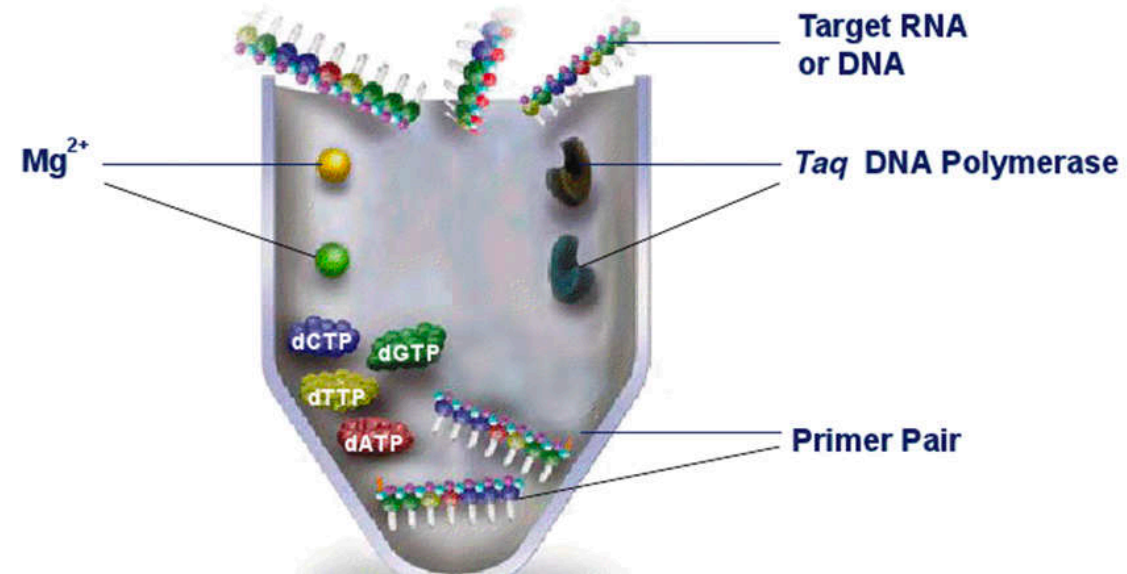
Reação em cadeia de polimerase (PCR)
e algumas aplicações

Regina Baldini

Amplificação (replicação) de DNA

- O que é necessário?

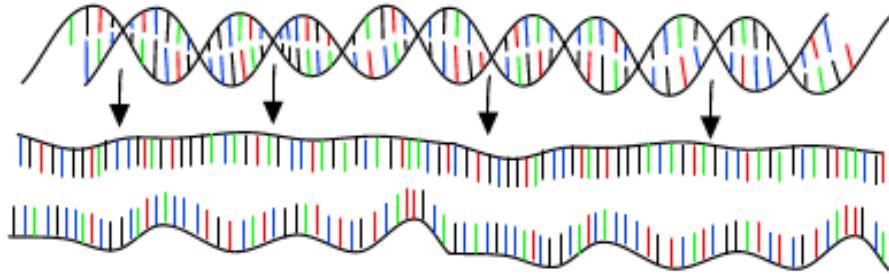
- DNA molde para ser copiado
- enzima: DNA polimerase
- uma extremidade 3'-OH livre: primer
- substrato: dNTPs
- condições ideais para a enzima (pH, Mg^{+2} , temperatura)



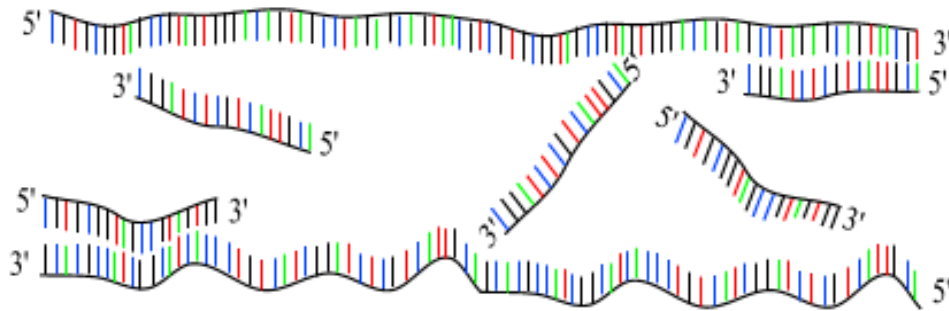
Reação em cadeia de polimerase (PCR)

- Método *in vitro* rápido, sensível e versátil para a amplificação seletiva de cadeias de DNA a partir de amostras complexas
- Gera quantidade de DNA suficiente para análises subsequentes
- Abriu muitas possibilidades de aplicações técnicas para a biologia molecular
- Kary Mullis, 1983

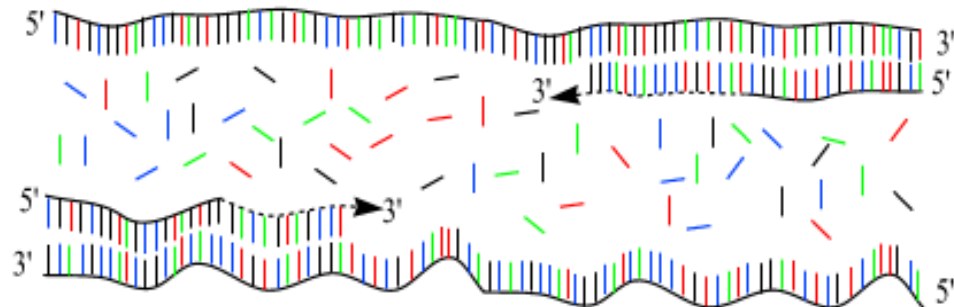
Passos da PCR



1. Desnaturação do DNA
(93-95°C)



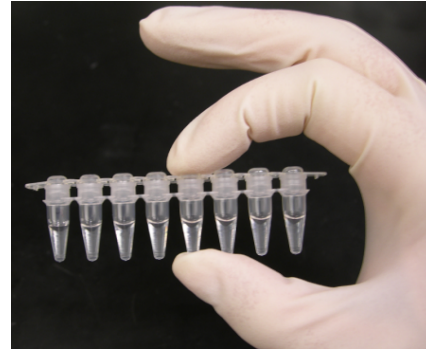
2. Anelamento dos primers
(37-72°C)



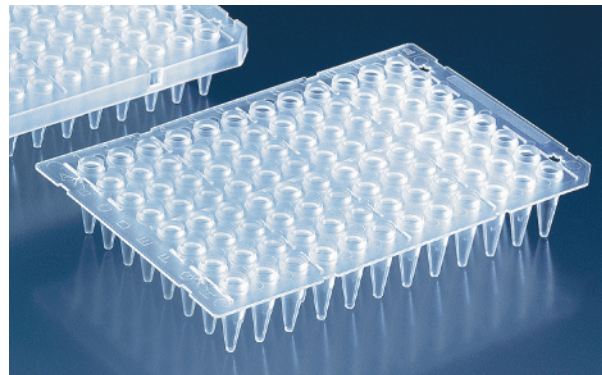
3. Amplificação do DNA (72°C)

ciclos repetidos várias vezes...

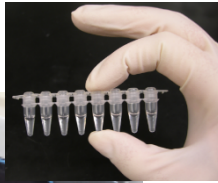
Equipamento: termociclador



Tubos de 0,2 mL



PCR



Análise do resultado através de eletroforese em gel de agarose



Termociclador

3-4 horas

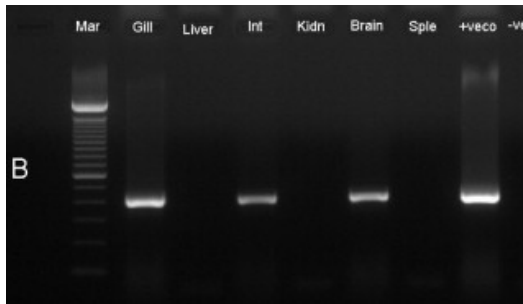
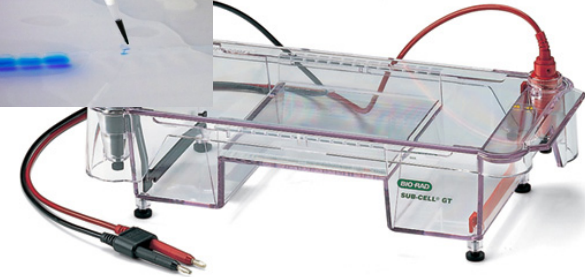
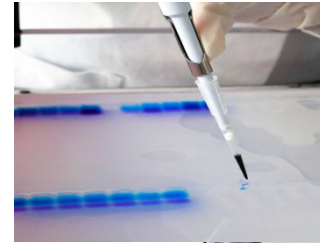
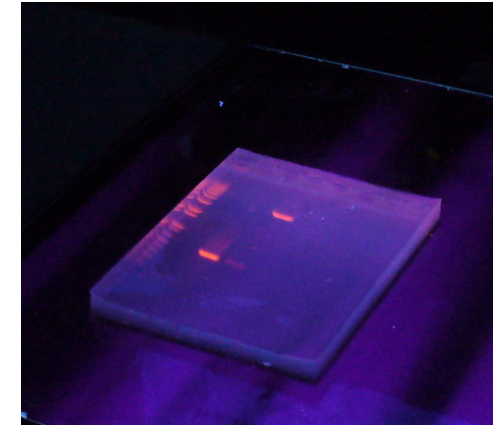


Imagem do gel mostrando os produtos de PCR obtidos



Visualização do DNA com luz UV (gel corado com brometo de etídio)

Video

- <http://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIwoZKU&feature=related>

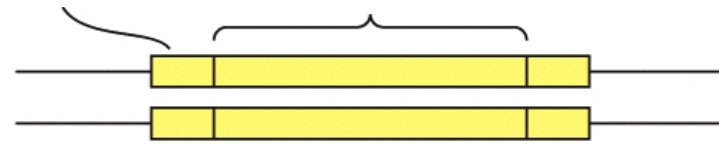
Taq DNA polimerase

- Termoestável
- Isolada da bactéria *Thermus aquaticus*
- Possibilitou o desenvolvimento da PCR
- Temperatura ótima: 72°C
- Não tem atividade revisora: 1-2 erros a cada 10^4 bases
- Atualmente, enzimas mais eficientes e com alta fidelidade estão disponíveis



Yosemite Park

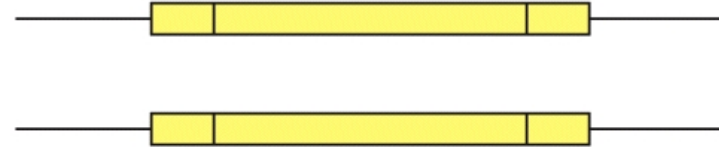
Primeiro ciclo



①

Adicionar excesso de primers e desnaturar a dupla fita

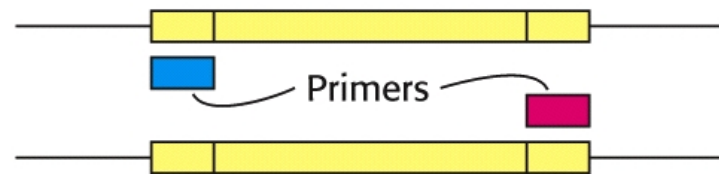
95°C



②

Esfriar para ocorrer o anelamento dos primers a fita molde

60°C



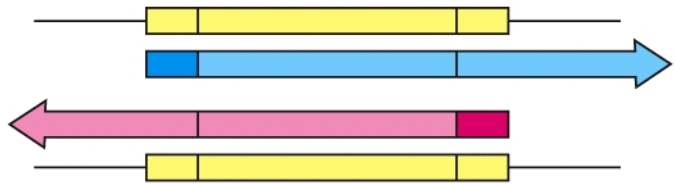
③

Síntese de nova cadeia de DNA pela DNA polimerase

72°C

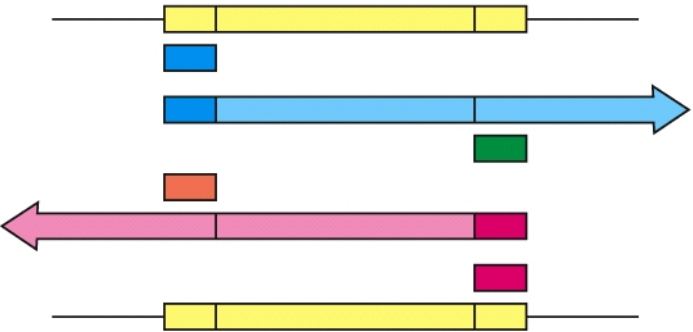


Segundo ciclo



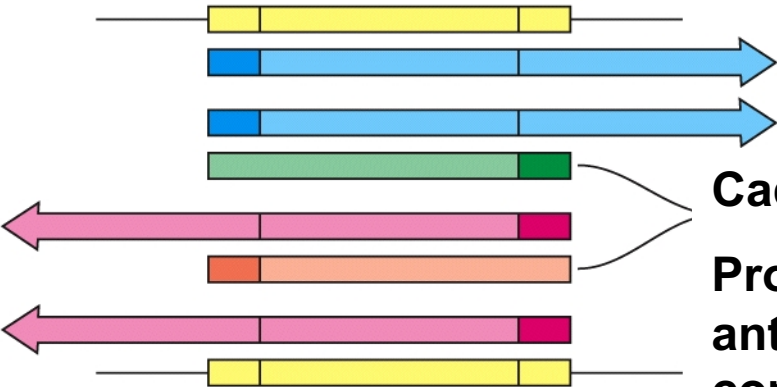
95°C

Aquecer para separar as cadeias



60°C

Esfriar, anelamento dos primers, síntese de DNA



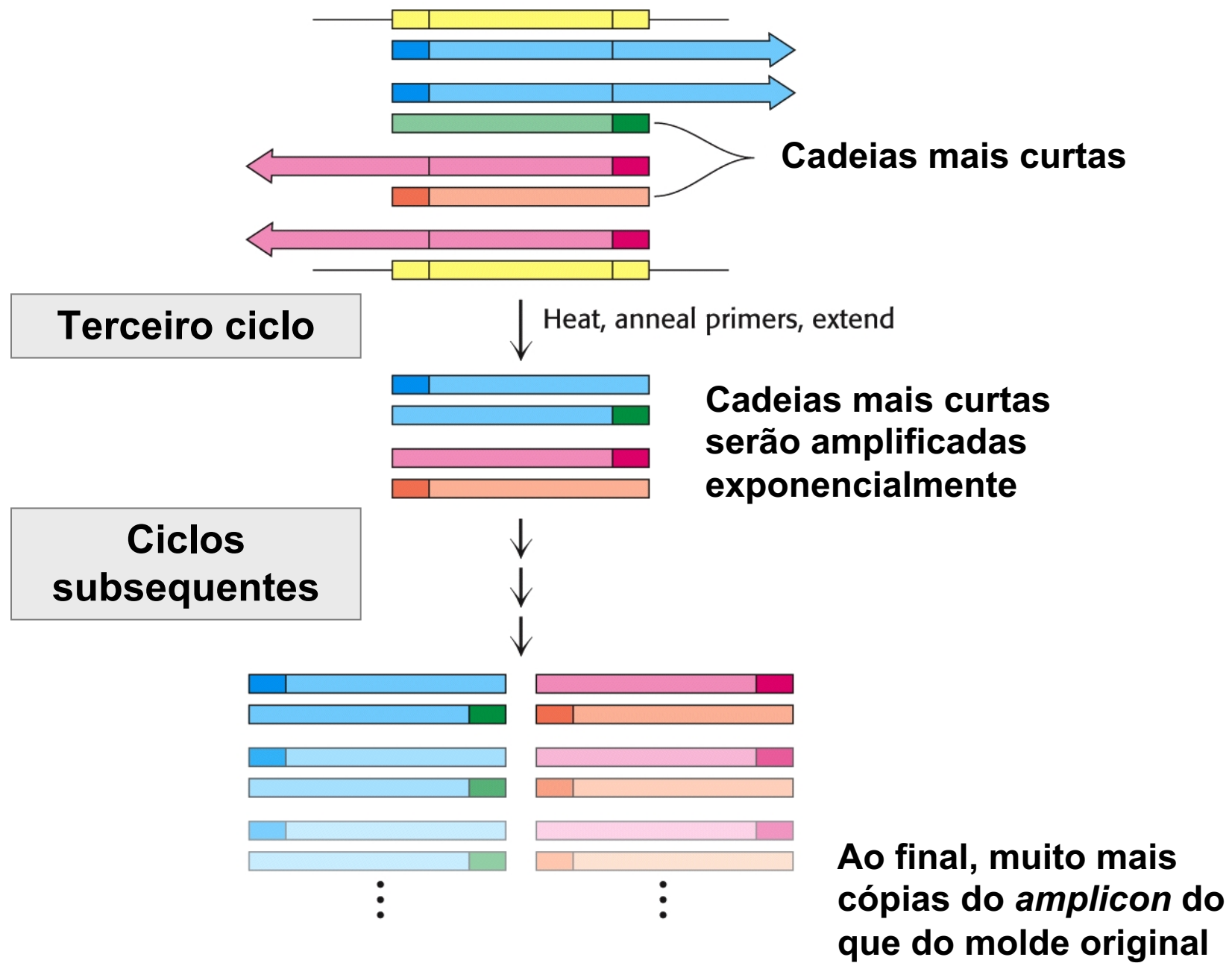
Cadeias mais curtas:

Produto do ciclo

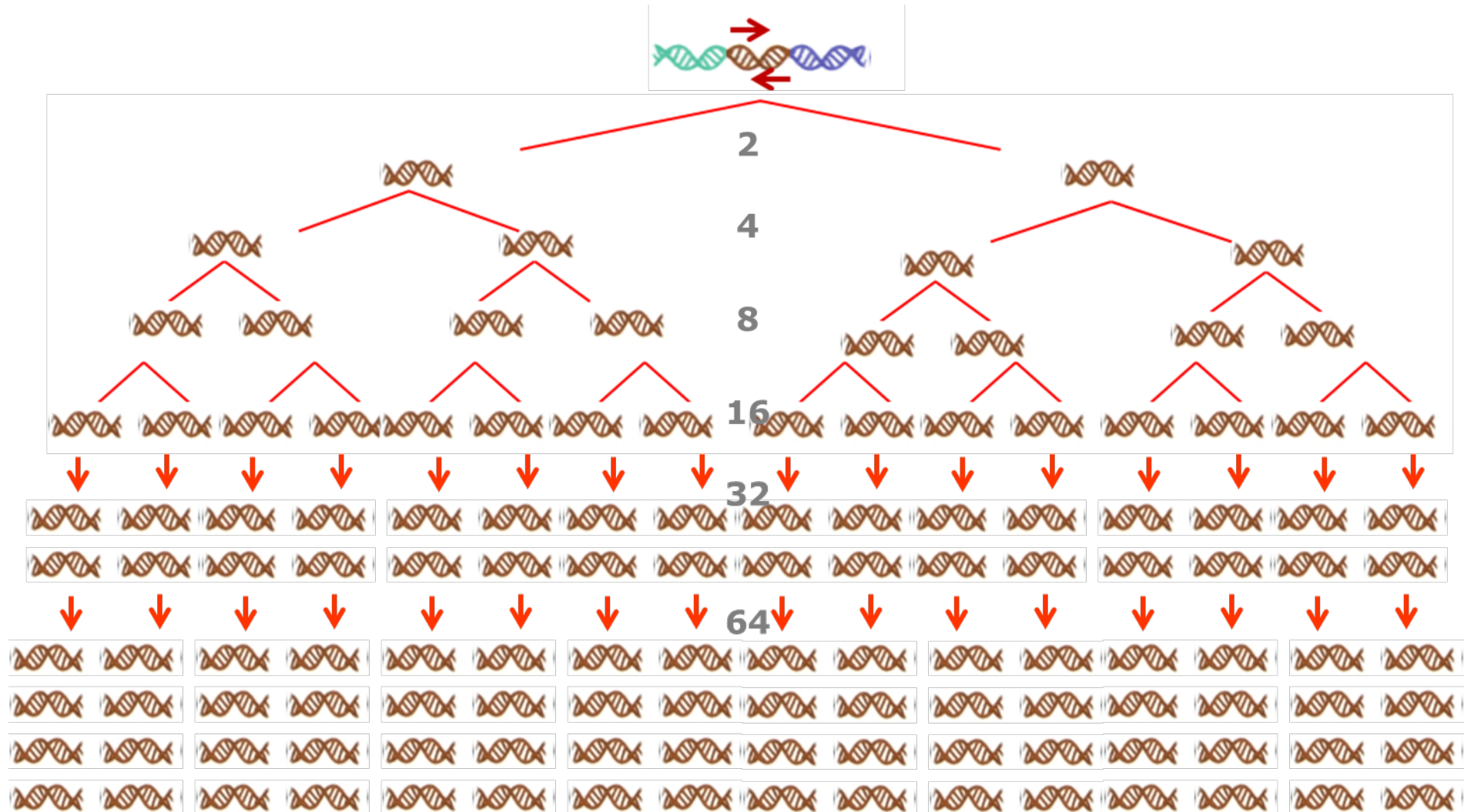
anterior também serve

como molde

72°C



Amplificação é exponencial



Passos da PCR

1. Desnaturação do DNA

- Aquecimento a 93-95°C – 30s-1min
- A enzima tem que ser estável e não perder a atividade: Taq DNA polimerase

2. Anelamento dos primers

3. Amplificação do DNA

Passos da PCR

1. Desnaturação do DNA

2. Anelamento dos primers

primers = oligonucleotídeos = iniciadores

- Um para cada fita do DNA
- Sequências específicas e conhecidas
- Tm parecido: temp. $\sim 5^{\circ}\text{C} < T_m$
- 18-24 bases complementares ao alvo
- Evitar estruturas secundárias
- Programas para desenho: ex: Primer3

3. Amplificação do DNA

Passos da PCR

1. Desnaturação do DNA
2. Anelamento dos primers
3. Amplificação do DNA
 - Incorporação dos nucleotídeos nas novas fitas
 - Tempo proporcional ao tamanho do amplicon (fragmento amplificado)
 - Temperatura ótima da enzima

Repetidos por 25-35 ciclos

Detecção dos produtos da PCR

- Eletroforese em gel de agarose
 - qualitativo
 - mais simples e barato
- Equipamentos de real-time PCR
 - quantitativo
 - mais sensível
 - automatizado
 - requer um reagent fluorescente na reação

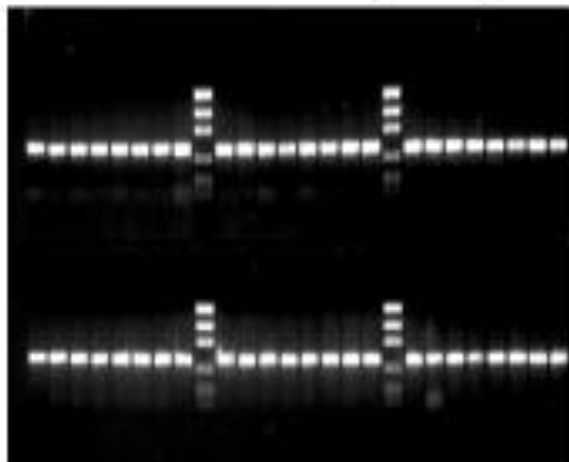
Termociclador



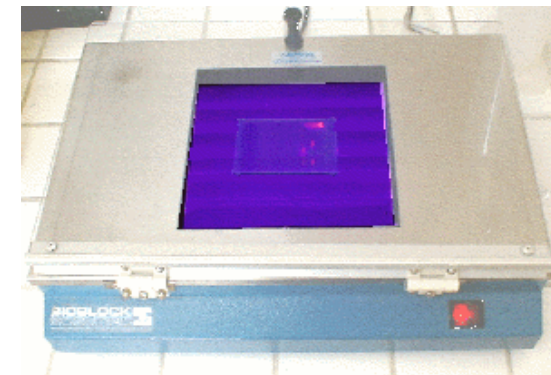
Eletroforese em gel de agarose



3-4 horas



Produto final



Visualização com luz UV

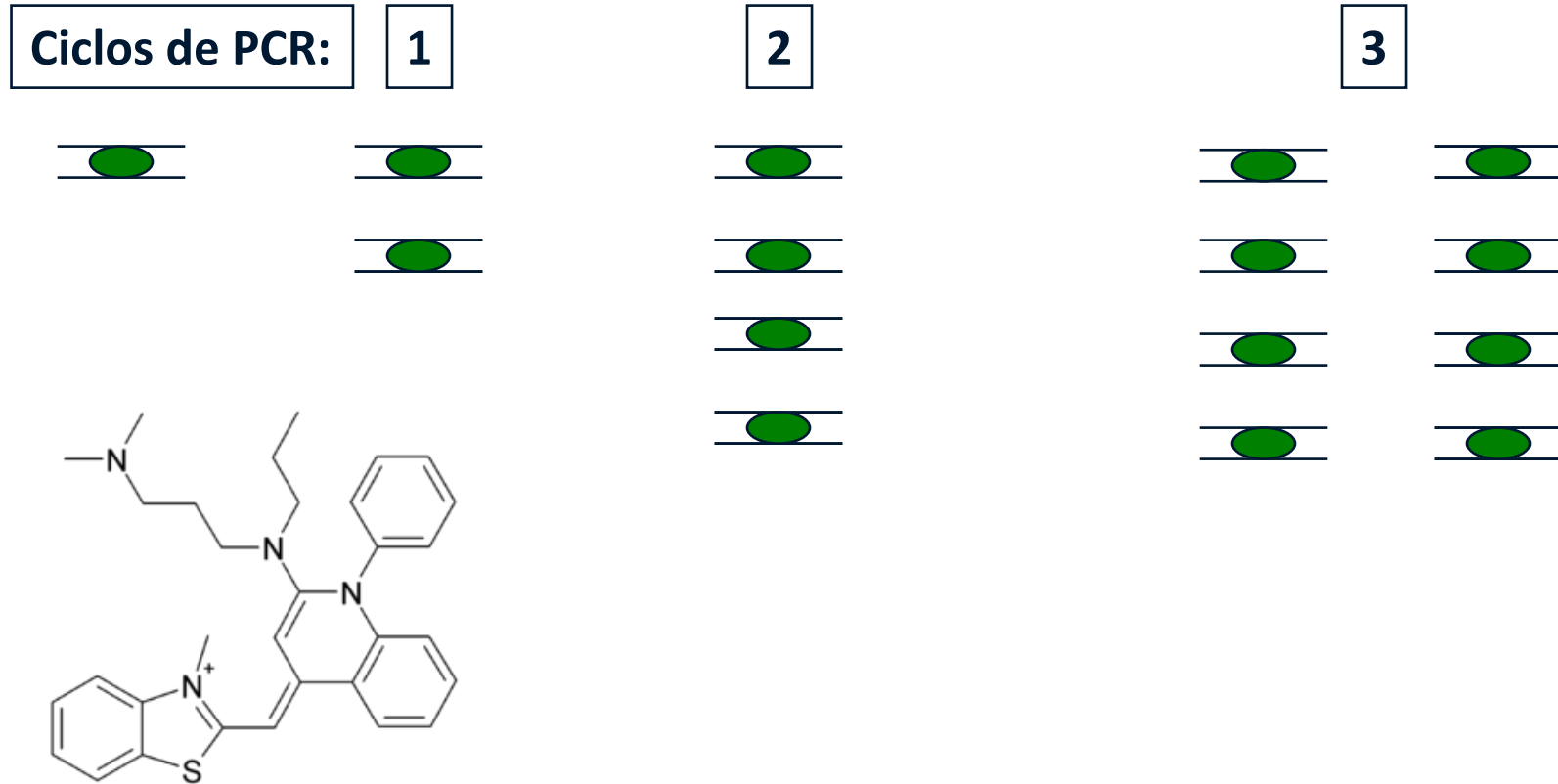
Real Time PCR (PCR em tempo real)

qPCR = PCR quantitativo



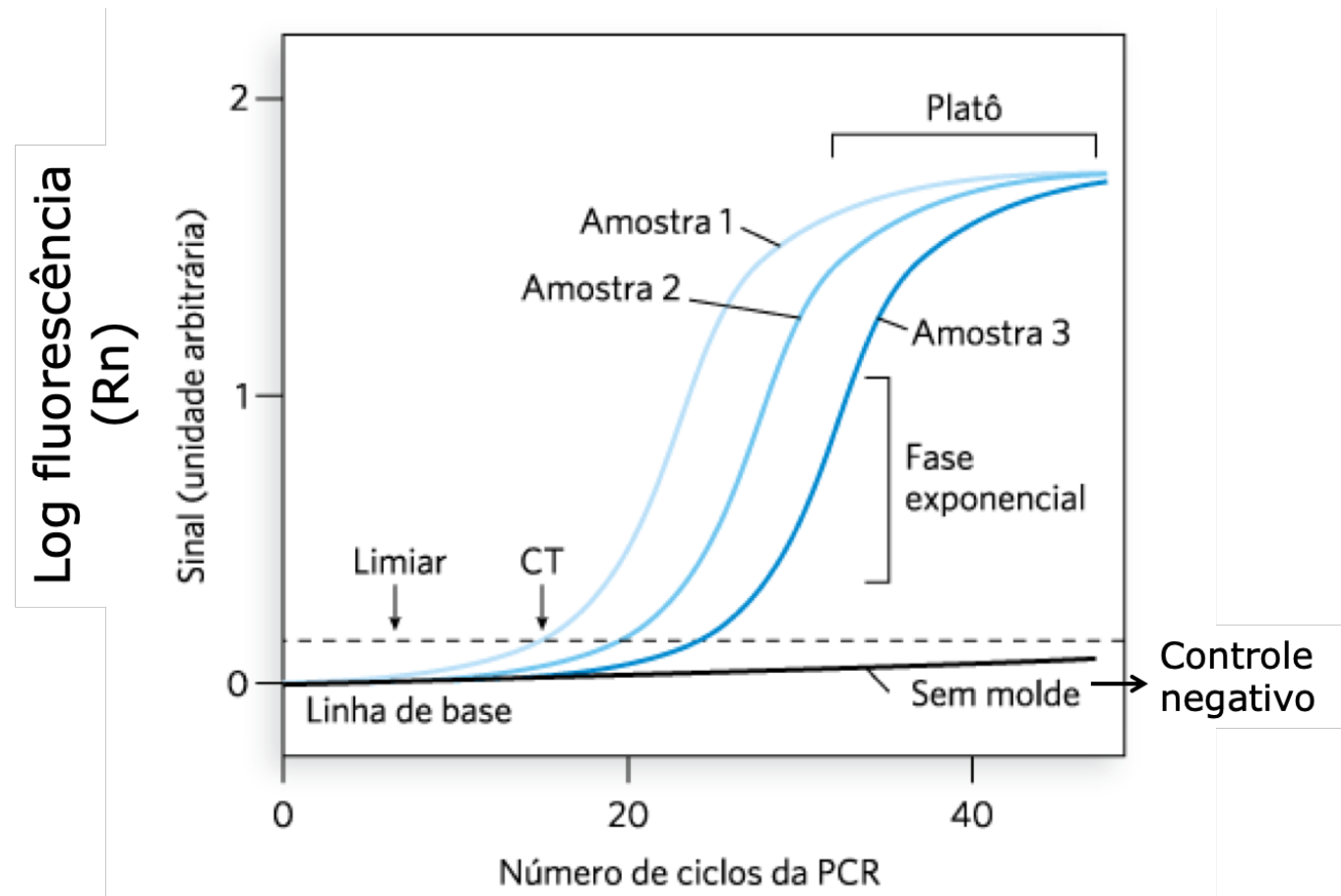
Método quantitativo e automatizado

Detecção do produto com uma molécula fluorescente que liga em DNA fita dupla



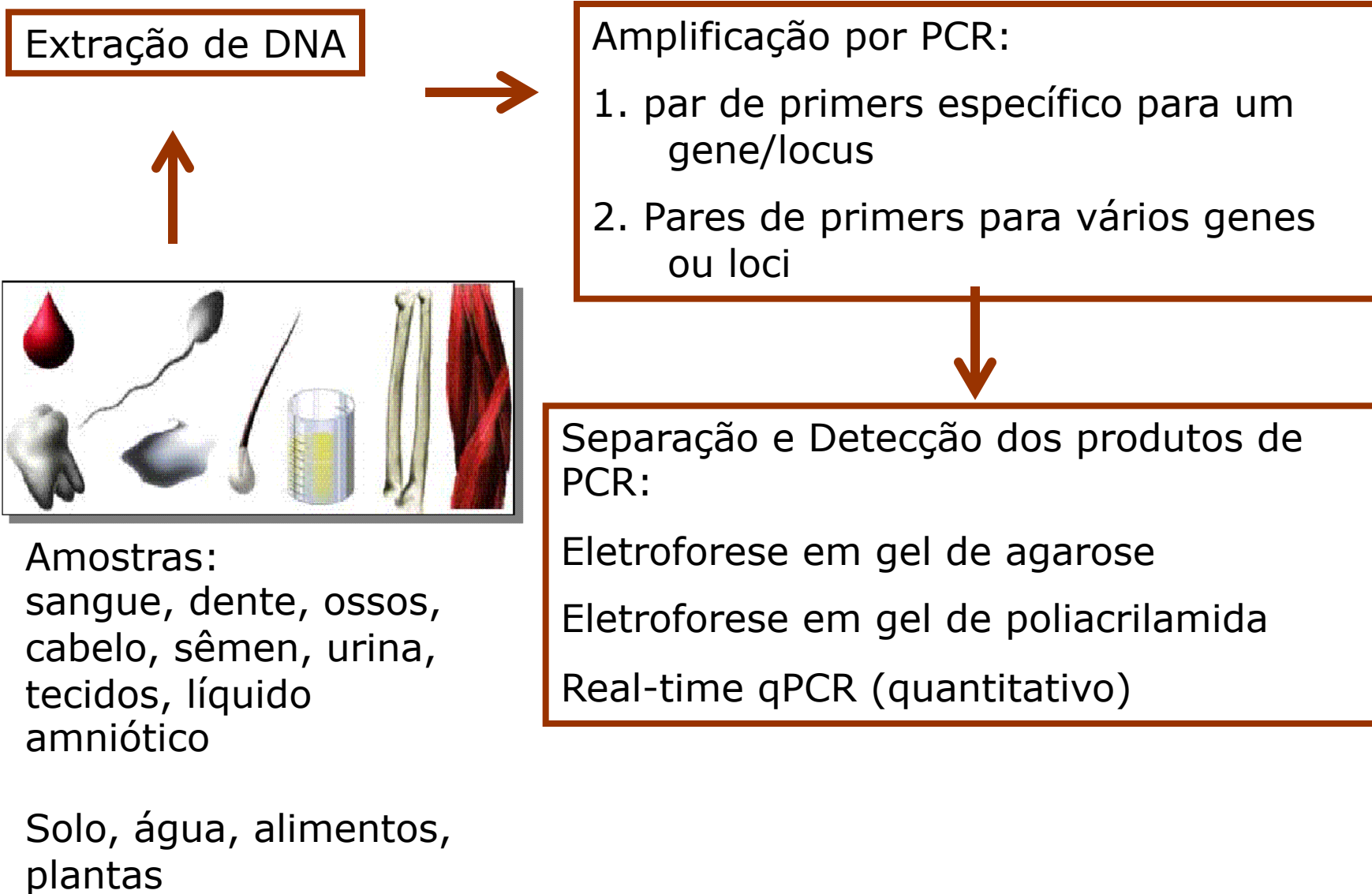
A fluorescência do Sybr Green é proporcional a quantidade de produto de PCR gerado

O equipamento detecta e registra a fluorescência a cada ciclo



C_T - (cycle threshold) = Número de ciclos em que a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fluorescência basal (threshold)

PCR para obtenção de DNA em quantidade



Cuidados

- Técnica é muito sensível
- Contaminação pode ser um problema
- Controles positivo e negativo são importantes
- Cada protocolo deve ser otimizado para cada tipo de amostra e cada par de primers

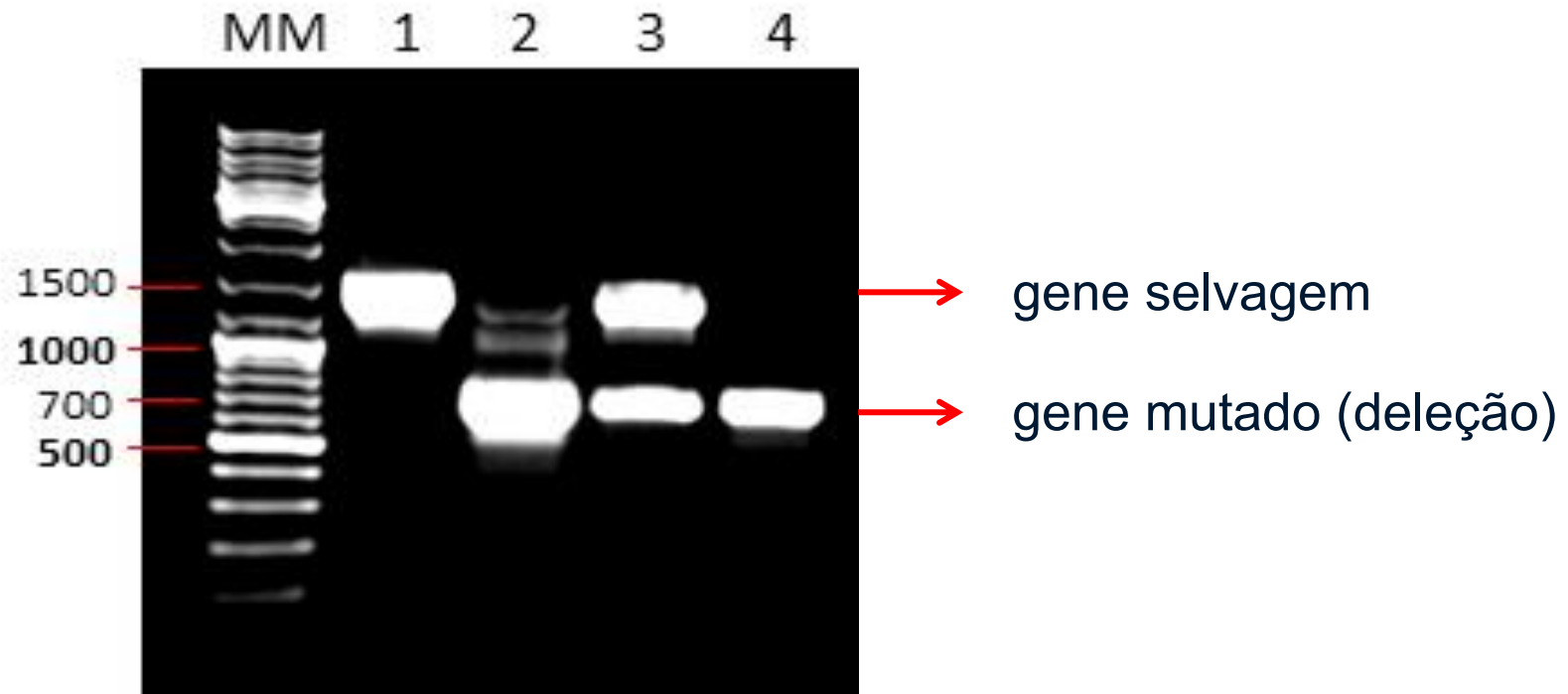


Aplicações

- Diagnóstico
 - doenças hereditárias
 - infecções
- Medicina forense
 - testes de paternidade, indentificação de suspeitos
- Organismos transgênicos
 - alimentação, medicamentos, biocombustíveis
- Pesquisa

Aplicações

- Distinguir organismos geneticamente modificados

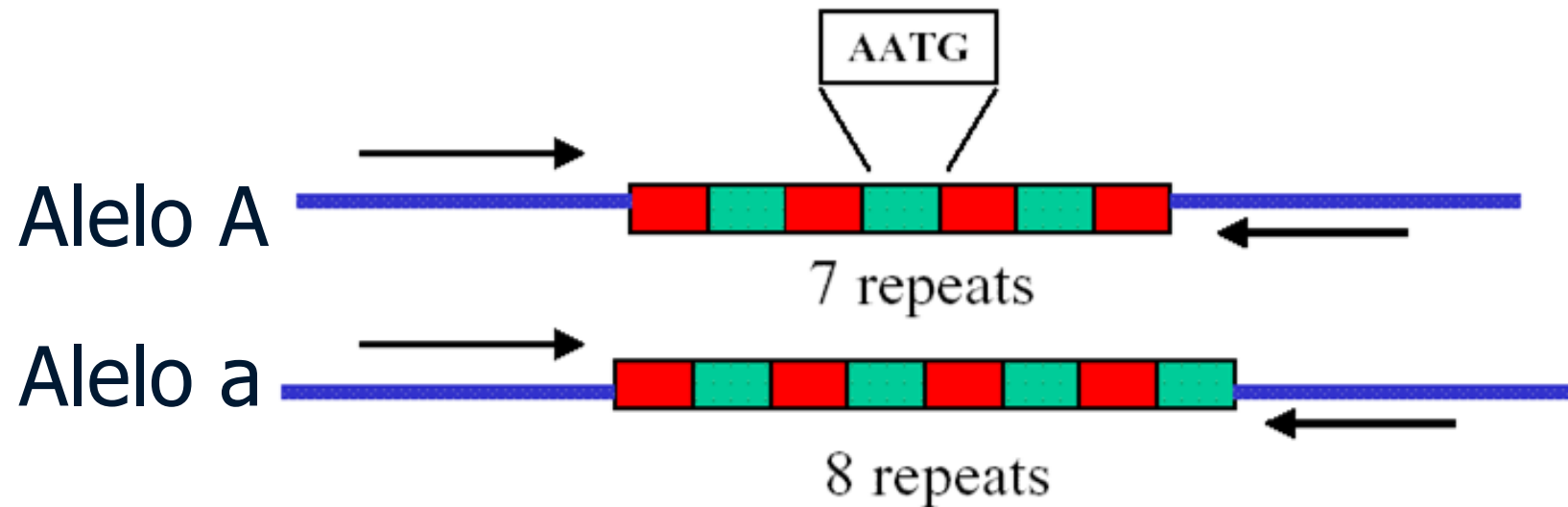


Aplicações

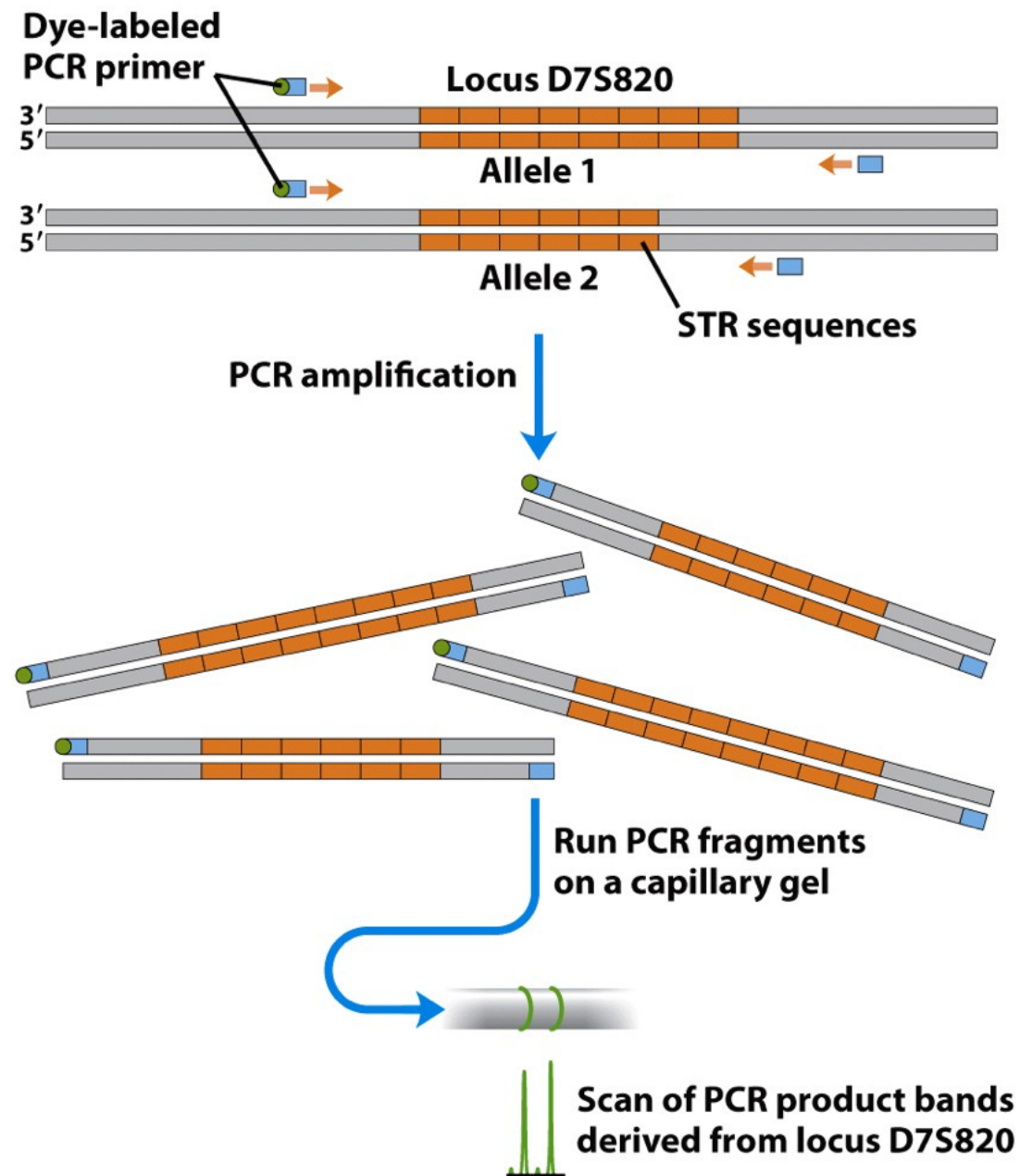
- Distinguir indivíduos (DNA fingerprinting)
 - STR: short tandem repeats (4-50nt)
 - > 20.000 loci (marcadores) de STR com 4nt/repetição
 - 1.000.000 loci de STR = 3% do genoma
 - Teste de paternidade, medicina forense
 - Probabilidade de identidade coincidir ao acaso:
 - 10 marcadores de STR → 1 em 3 trilhões (10^{-12})
 - 15 marcadores de STR → 1 em 10^{17}
 - kits comerciais tem 16 marcadores → 1 em 10^{18}

STR= pequenas repetições em série

Short Tandem Repeats (STRs)



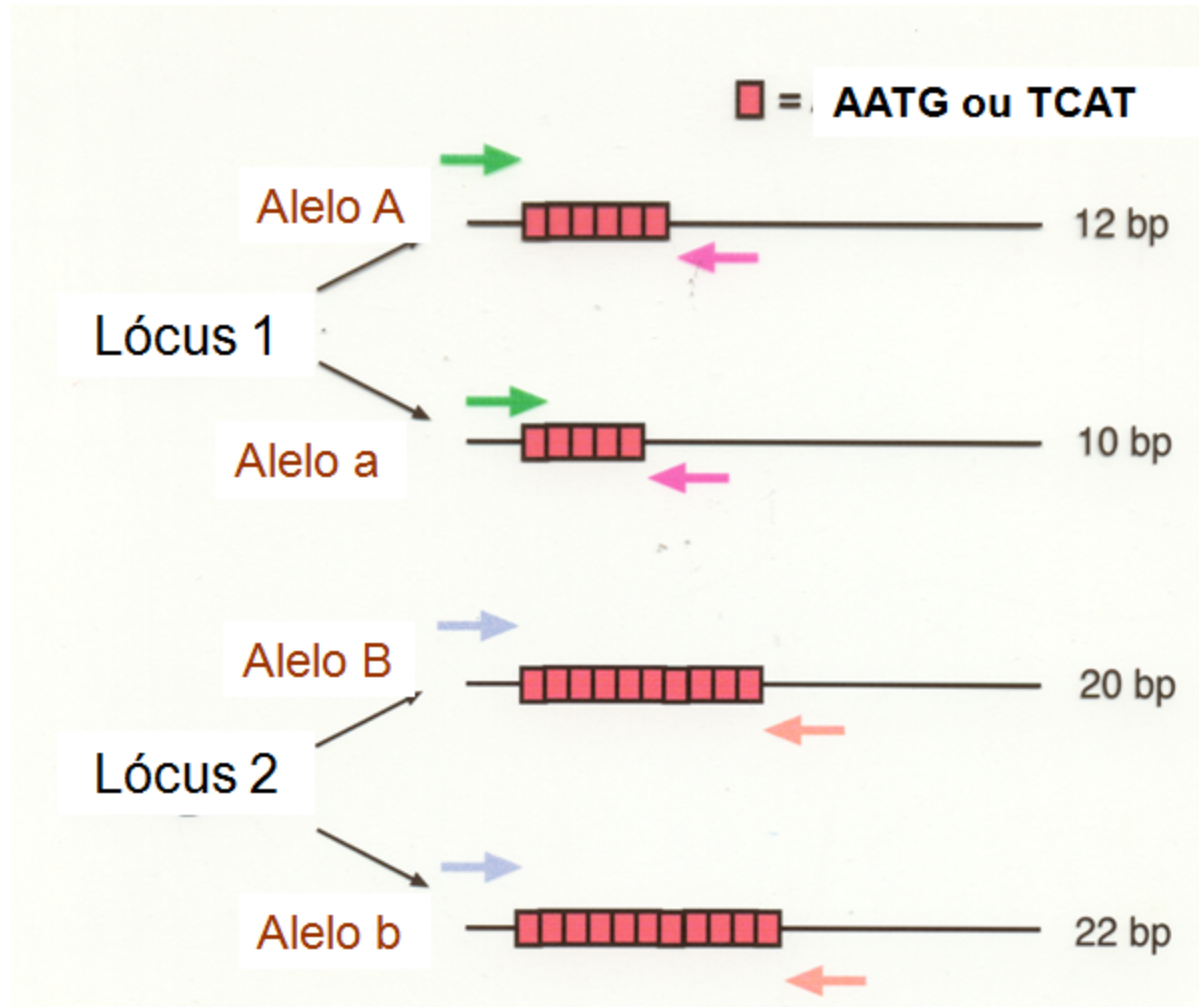
A região da repetição é variável entre alelos (número de repetições variável), mas as regiões flaqueadoras são conservadas, possibilitando anelamento do par de *primers* específico para esse locus genômico



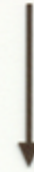
Cada marcador tem um par de primers específicos, que anelam nas regiões constantes que flanqueiam a repetição

Pares de primers diferentes podem ser colocados numa mesma reação: PCR multiplex

Perfil de amplicons gerados na PCR de dois loci de STR



PCR com diferentes pares de primers



Análise do tamanho dos fragmentos resultantes (eletroforese)



Exemplo de caso forense

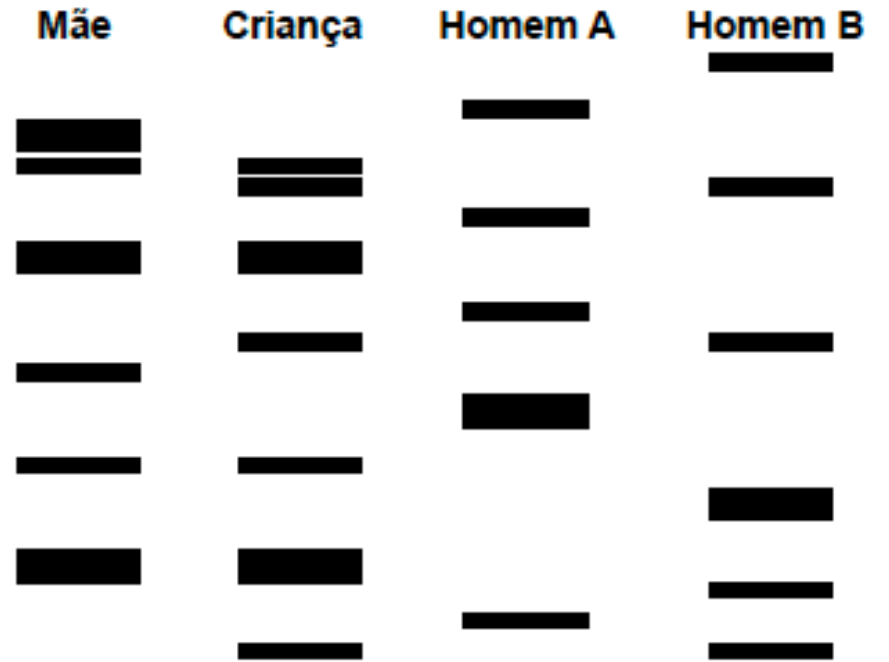
- Uma mulher foi assassinada e encontraram pele debaixo de suas unhas
- “Exame de DNA”
 - DNA presente na amostra foi amplificado e analisado
 - DNA de 5 suspeitos também foi analisado

Quem era o assassino?



Teste de paternidade

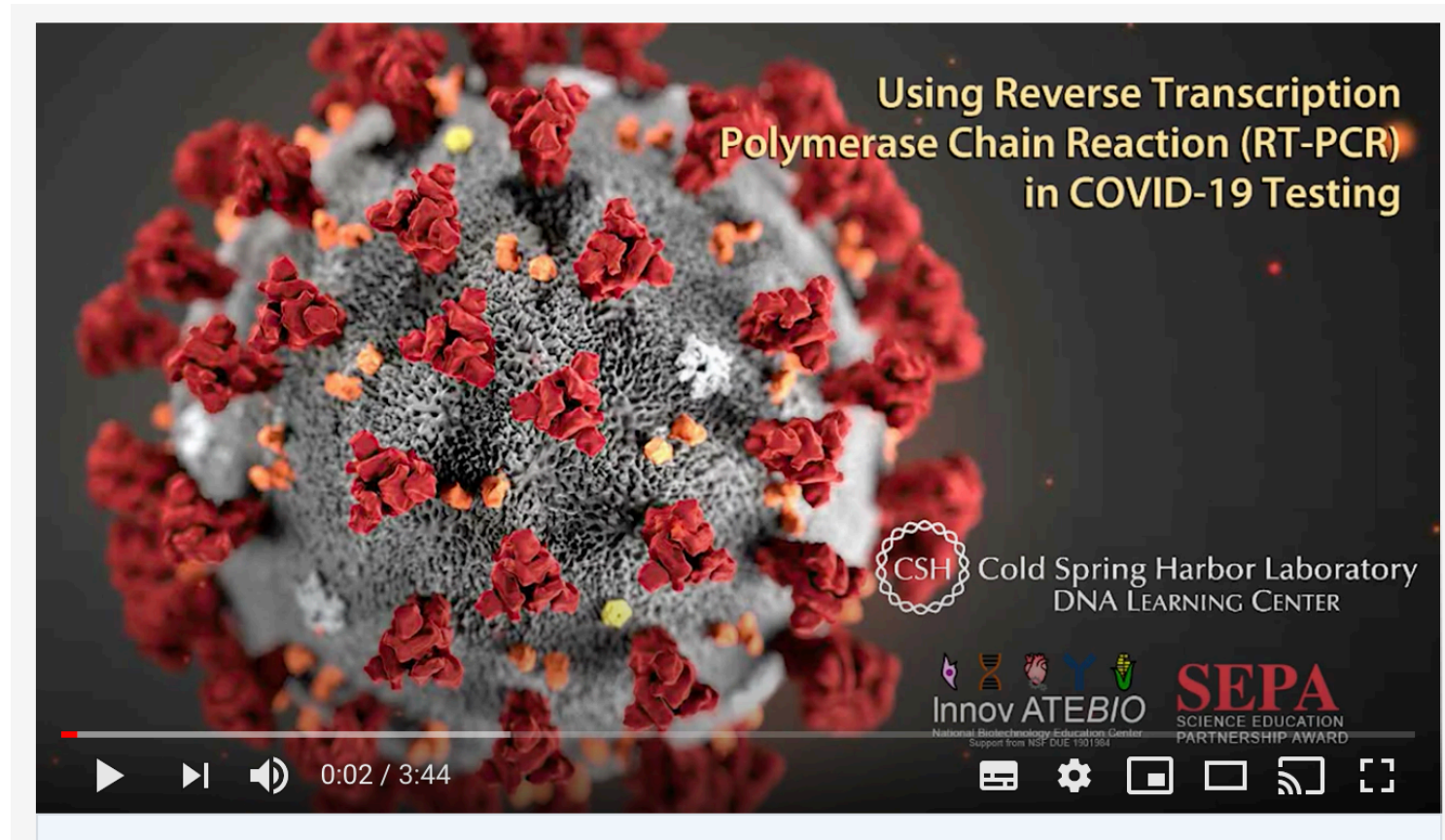
- O filho deve ter 50% das bandas do tamanho da mãe e 50% do pai



- Quem é o pai?

- Quanto maior o número de marcadores, maior a probabilidade do teste ser confiável

Teste de RT-PCR para coronavirus



https://www.youtube.com/watch?v=Vd38iS_W7ww

Detecção de virus por qPCR

Results

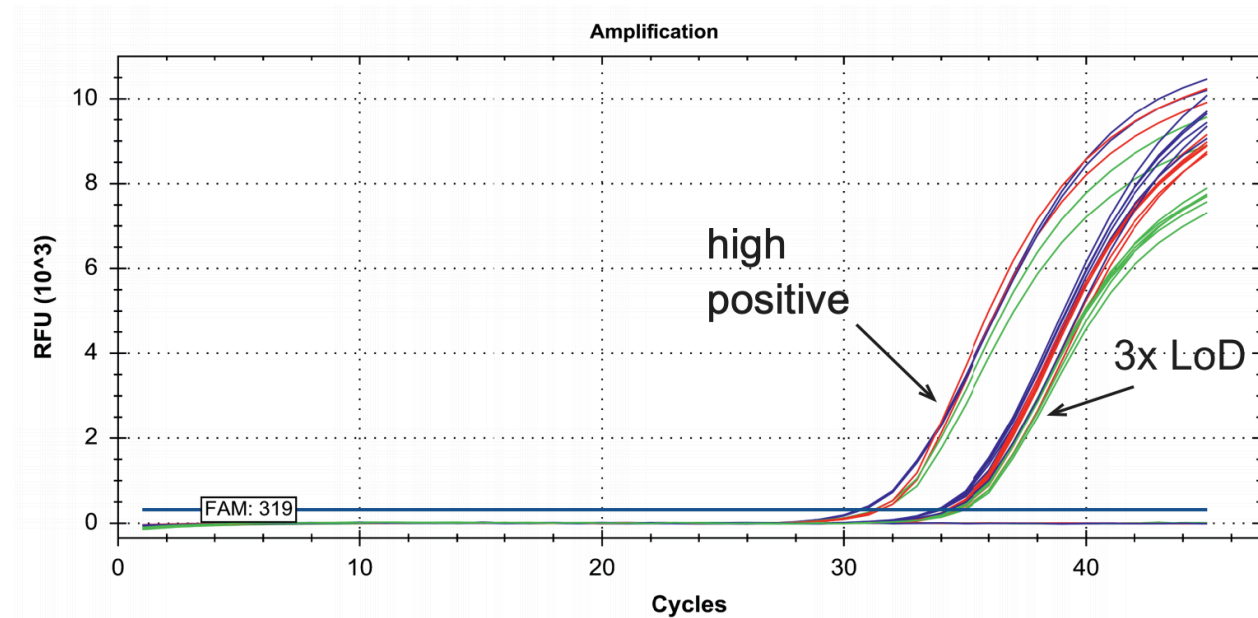
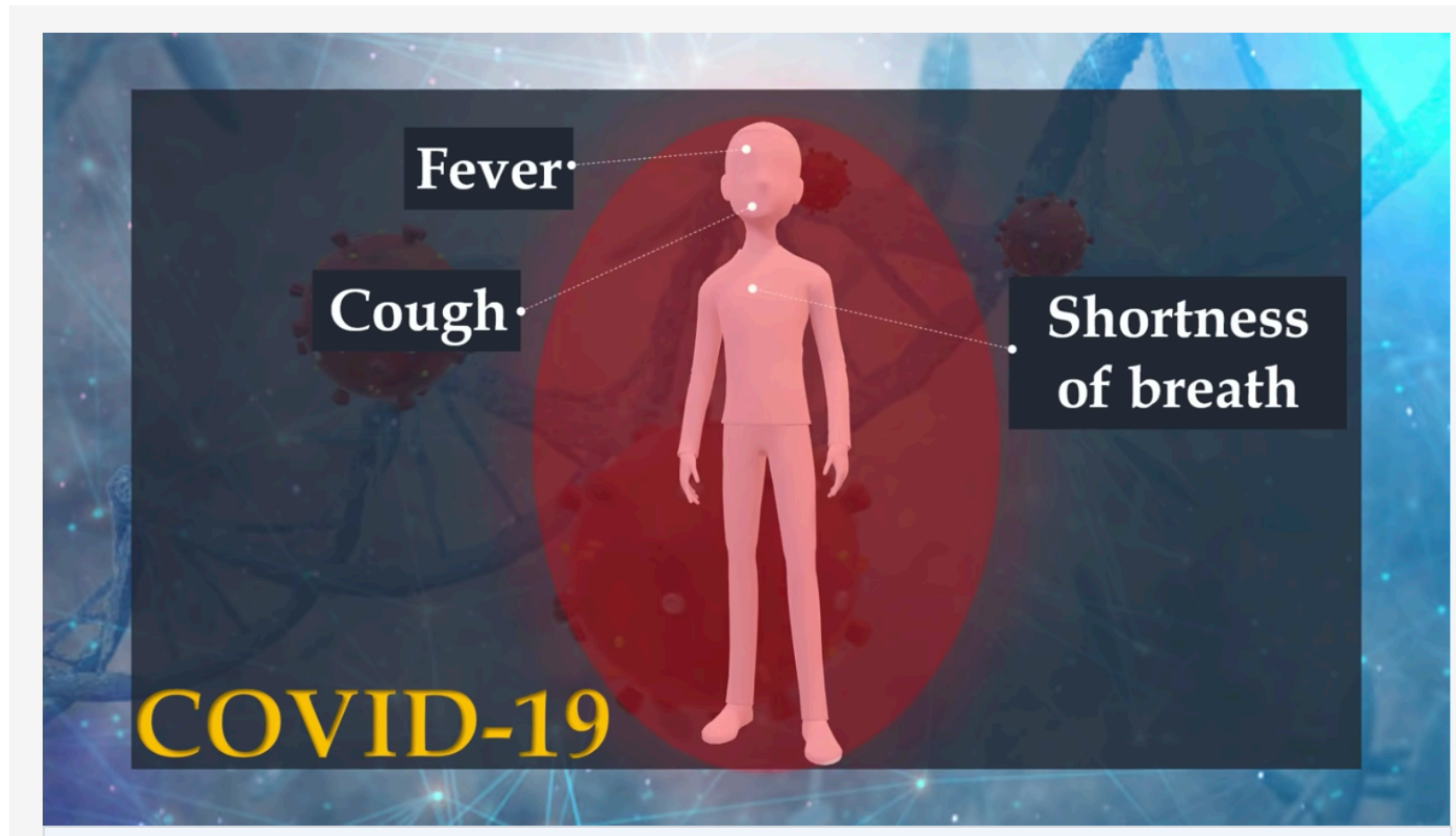


Figure 1:

Amplification plot showing the simultaneous analysis of different concentrations of virus specific *in-vitro* transcribed RNA for RealStar[®] Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 (red), RealStar[®] Dengue RT-PCR Kit 2.0 (green) and RealStar[®] Chikungunya RT-PCR Kit 2.0 (blue).

Para virus de RNA, este deve primeiro ser usado de molde para a síntese de uma fita de DNA

Video com o passo a passo da técnica de RT-PCR para coronavírus



https://www.youtube.com/watch?v=ThG_02miq-4