

**PCR**  
*(Polymerase chain reaction)*

**Reação em cadeia da polimerase  
e suas aplicações**

Bianca Zingales  
zingales@iq.usp.br



La Jolla, Ca

## PCR é uma técnica

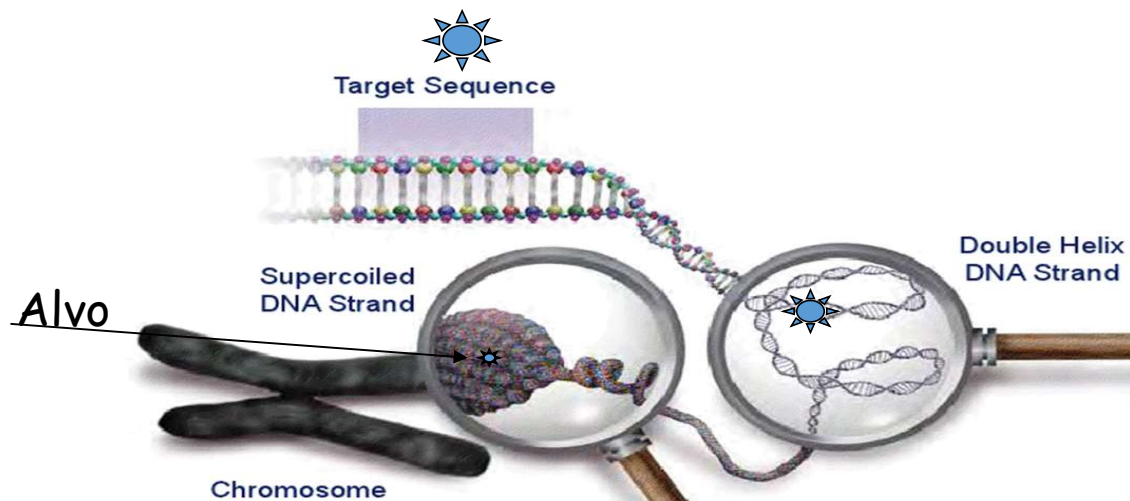
- Desenvolvida por Kary Mullis e colaboradores em 1983
- Prêmio Nobel em Química 1993
- Faleceu em 2019 aos 74 anos, vítima de uma pneumonia aguda

### No **Brazil Journal**, Pedro Arbex escreveu

- Sem Kary Mullis, muitos assassinos estariam livres.
- Sem Kary Mullis, o filme Jurassic Park não teria existido.
- Sem Kary Mullis, seria mais difícil saber o sexo de seu bebê antes dele nascer.

# O que é a PCR?

Técnica rápida e sensível para a amplificação **seletiva** de sequências de DNA a partir de amostras complexas de ácidos nucleicos.



**Objetivo:** Produzir milhões de cópias de DNA dupla fita ("alvo") a partir de quantidades mínimas da amostra de partida.

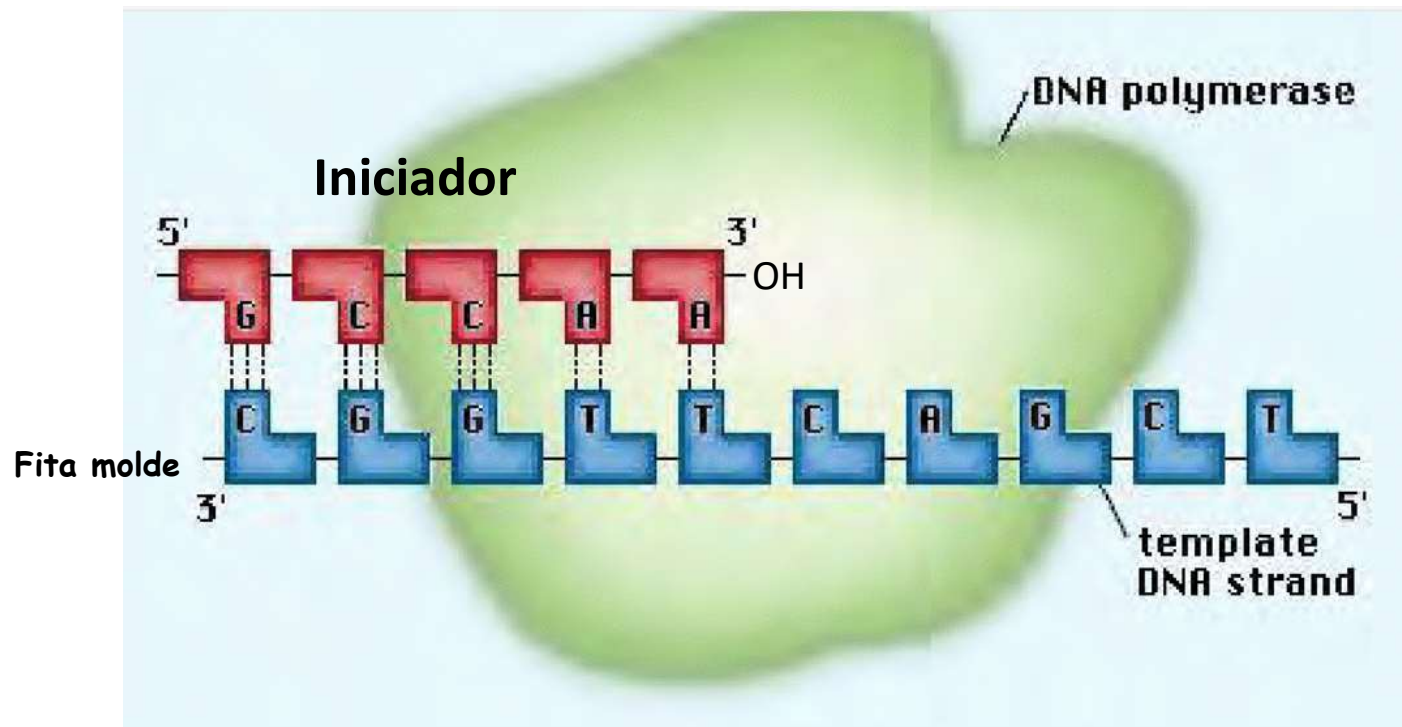
# Aplicações

- Diagnóstico de doenças
- Medicina Forense
- Identificação de Organismos Transgênicos
- Clonagem gênica, sequenciamento, etc.
- Outros

## A PCR explora as características da replicação do DNA

### Revisão

As DNA polimerases só adicionam nucleotídeos a extremidades 3'-OH livres (**INICIADORES** ou **PRIMERS**)



# Premissas

Para aplicar a PCR é necessário ter conhecimento prévio da sequência nucleotídica que se deseja amplificar (sequência alvo ).

Nota. Nas próximas aulas veremos como se determina a sequência dos genes e o sequenciamento do genoma de organismos

Por que  
preciso conhecer a sequência nucleotídica do alvo?

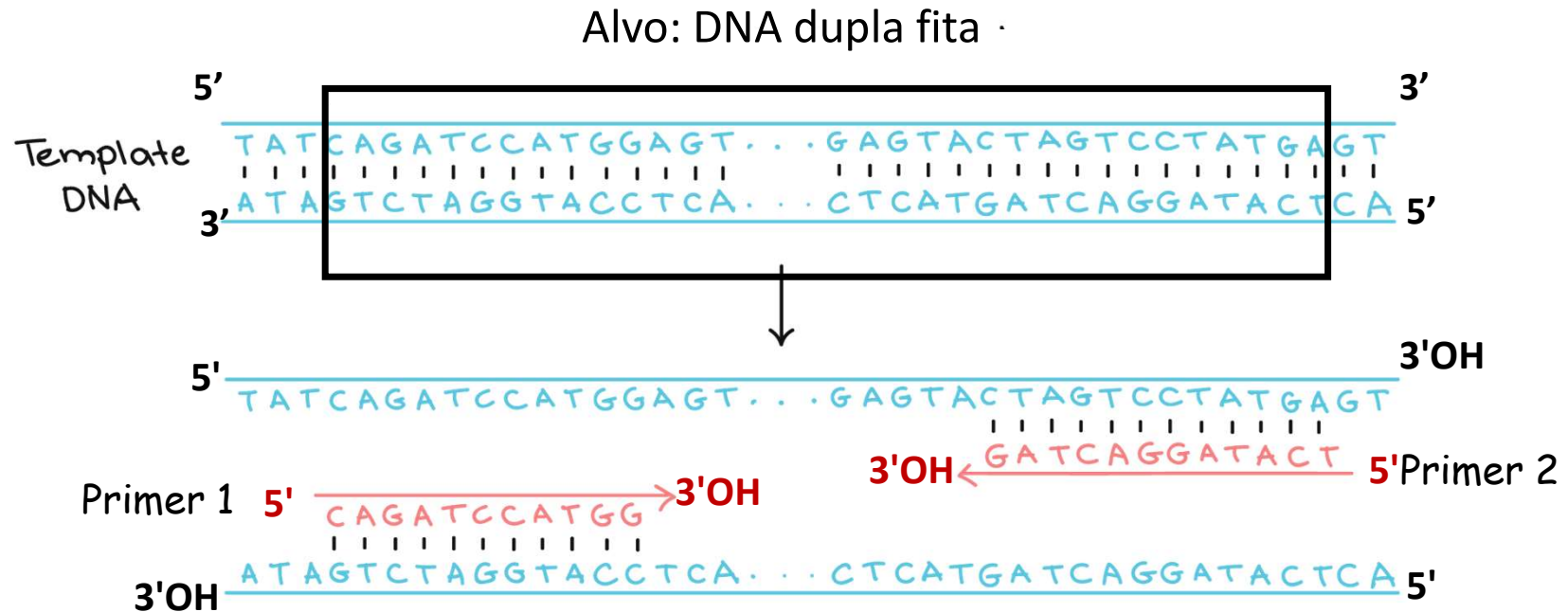
Para poder "desenhar" e sintetizar Iniciadores

A partir da sequência nucleotídica do alvo, o pesquisador "desenha" um **PAR** de iniciadores **complementares** às extremidades 3' da sequência **DUPLA FITA** que se deseja amplificar.

O pesquisador pede para uma **companhia** sintetizar o **PAR** de iniciadores (primers)

## Por que um PAR de Iniciadores?

Porque queremos cópias de DNA dupla fita

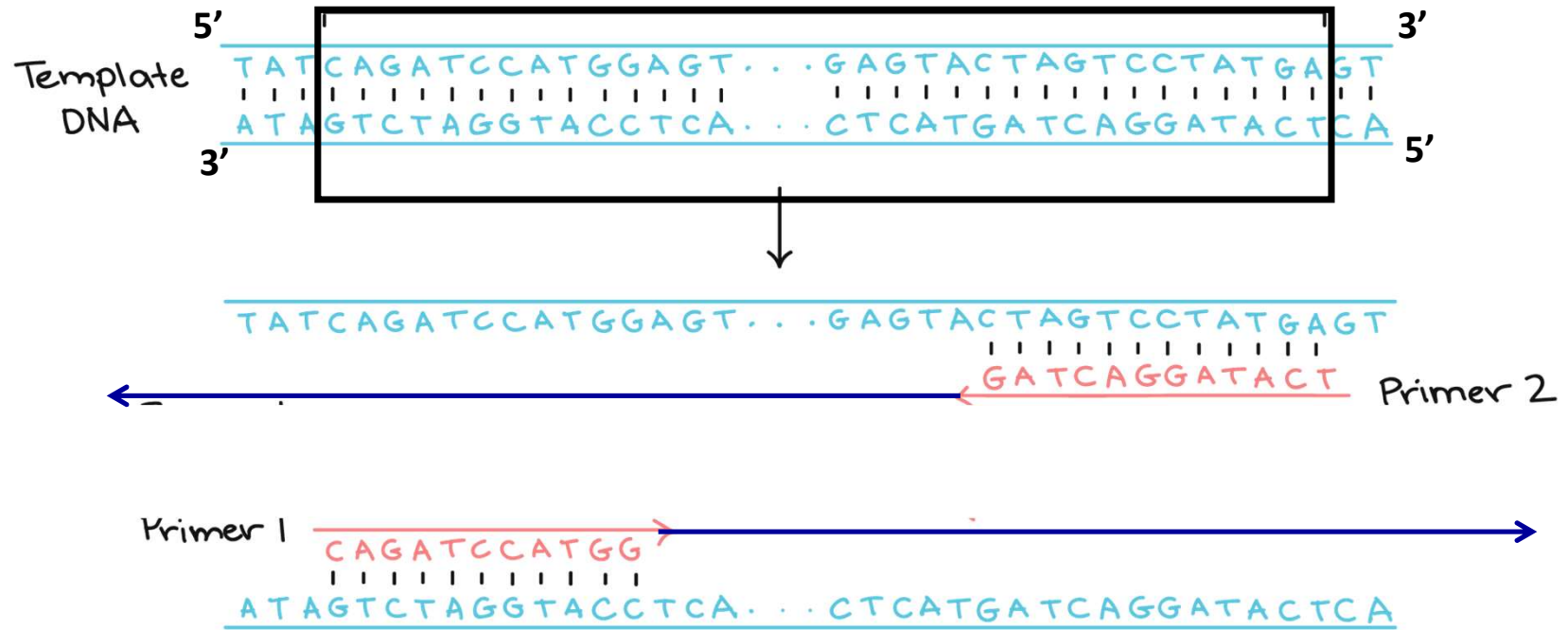


Primer 1 - complementar à extremidade 3' de 1 fita. O primer tem a 3' OH livre

Primer 2 - complementar à extremidade 3' da outra fita. O primer tem a 3' OH livre



A DNA polimerase replica cada fita de DNA a partir da extremidade 3'OH de cada primer

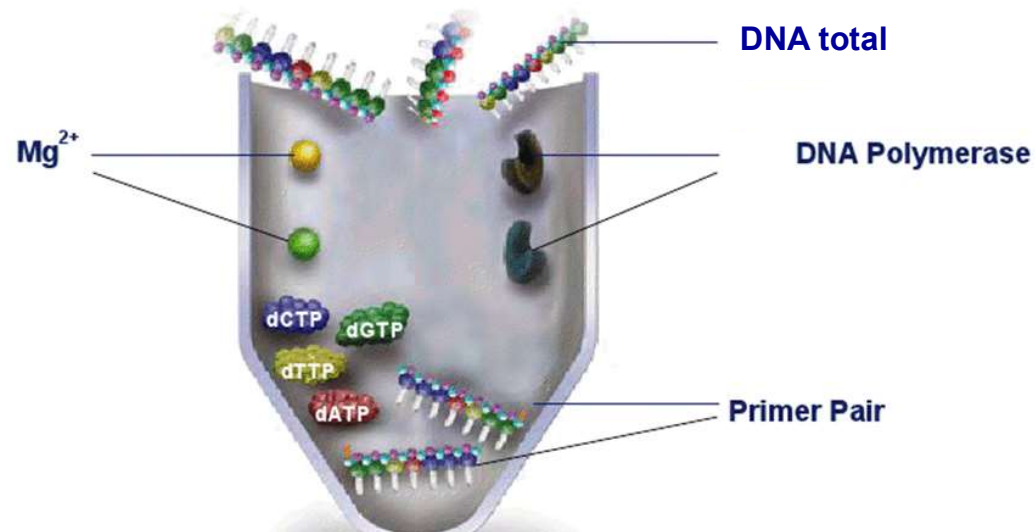


## Características dos Primers/Iniciadores

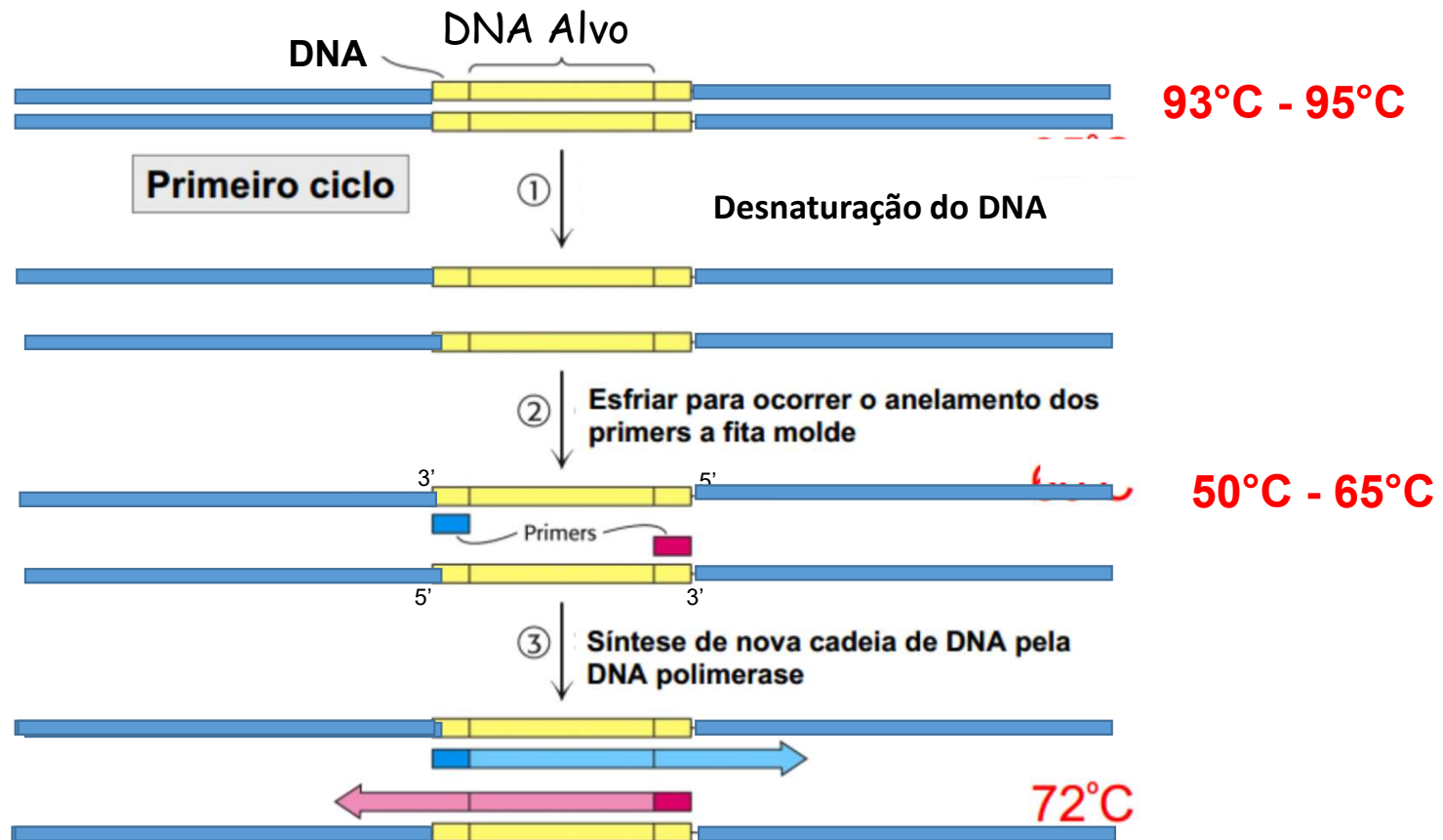
- 15 a 25 nucleotídeos (de desoxiribose)
- Delimitam o começo e o final da sequência a ser amplificada
- Servem como ponto de início da replicação (-3'OH livre)
- Permitem a cópia simultânea das duas fitas
- Os primers são sintetizados quimicamente

# REAGENTES PARA PCR

1. DNA **parcialmente** purificado [de organismo (vírus, bactéria, parasitos etc.); sangue; cabelo; biópsia; etc].
2. **O par** de oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a sequência alvo
3. 4 **desoxinucleosídeos** trifosfato (dATP; dCTP; dTTP; dGTP)
4. DNA polimerase



## A PCR ocorre em ciclos sucessivos

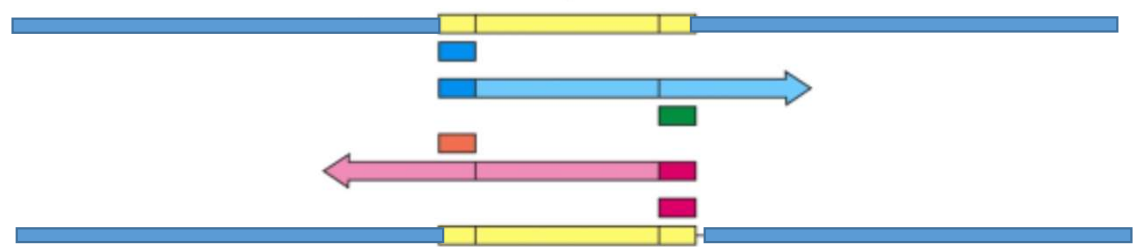




Segundo ciclo

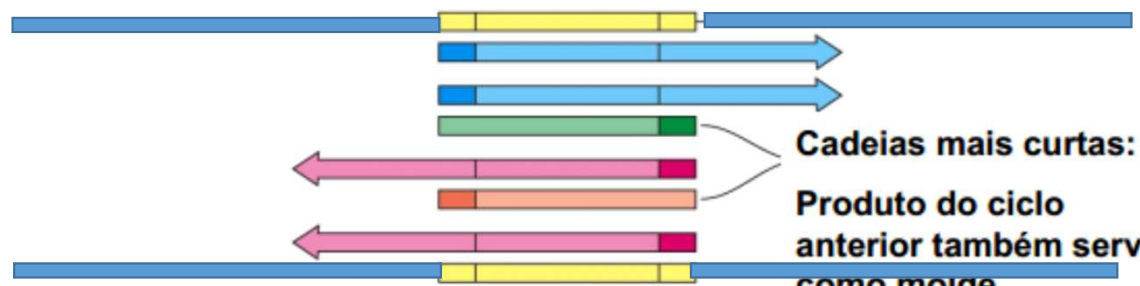
Aquecer para separar as cadeias

93°C - 95°C



50°C - 65°C

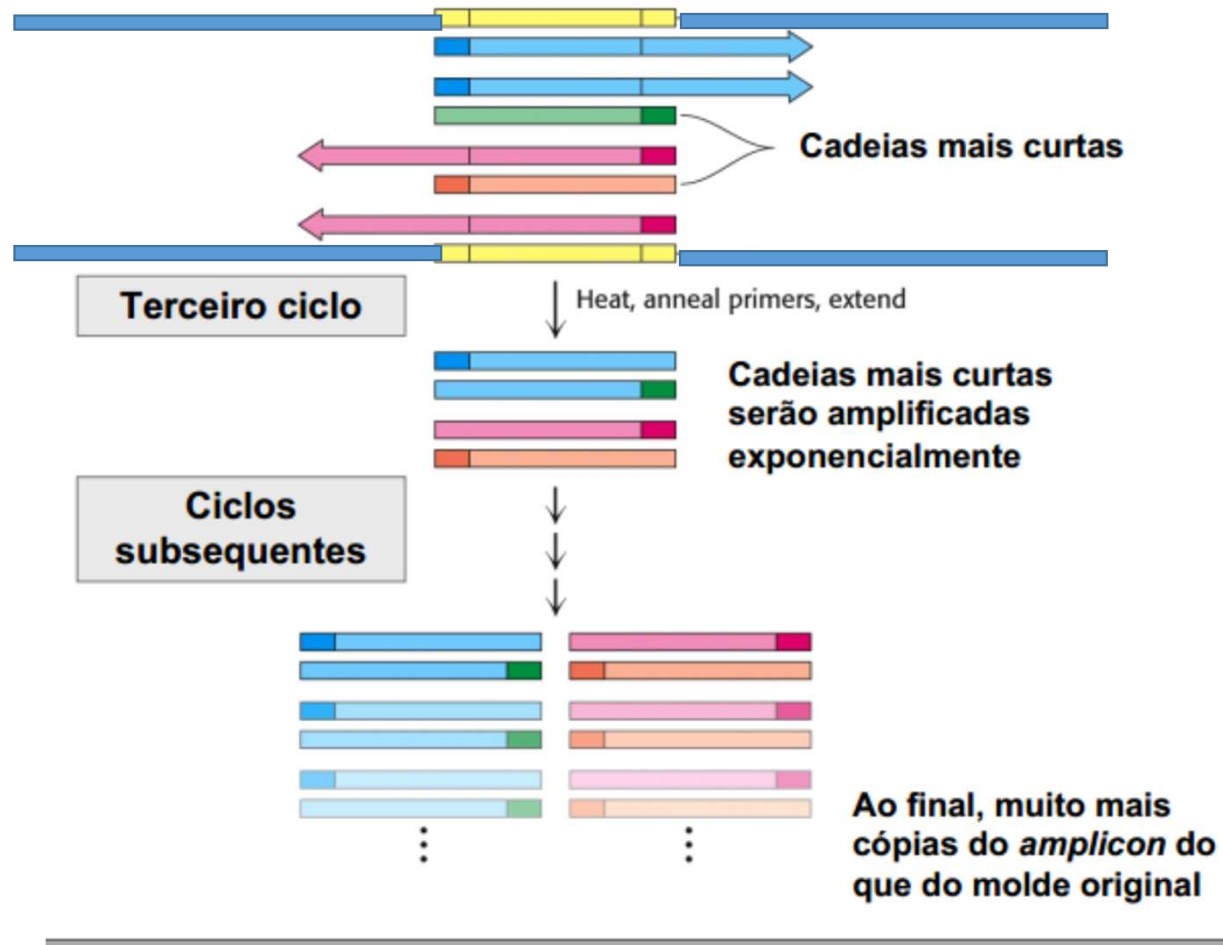
Esfriar, anelamento dos primers, síntese de DNA



Cadeias mais curtas:

Produto do ciclo anterior também serve como molde

72°C



**20-30 ciclos**

Amplicon = Fragmento de DNA dupla fita amplificado em reações de PCR

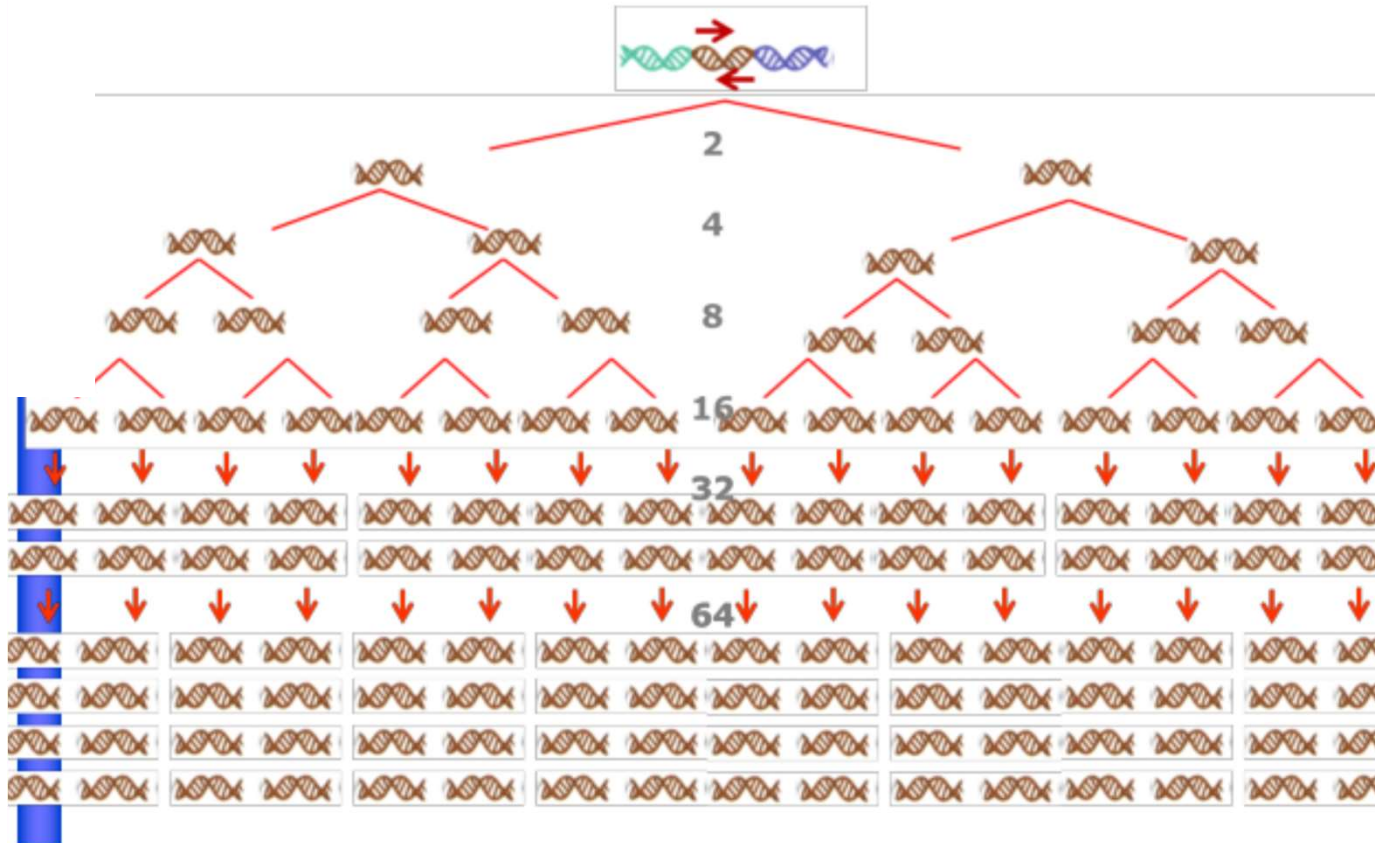
## Animação

PCR etapas

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

<https://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIwoZKU>

# Amplificação é exponencial



Partindo-se de UMA seqüência de DNA, após 30 ciclos haverá  $10^9$  seqüências idênticas !!!



## Equipamento: termociclador



Utiliza-se um software para a definição das temperaturas e duração dos ciclos

## Resumo

**Cada ciclo da PCR tem três etapas em temperaturas diferentes:**

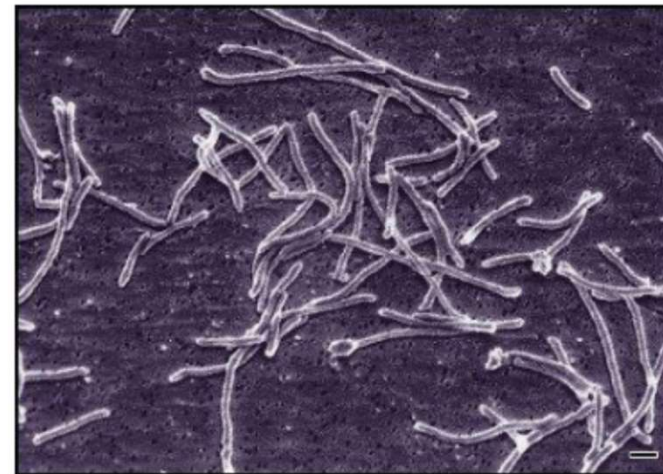
<b>1. Desnaturação do DNA</b>	<b>93°C - 95°C</b>	<b>30 secs – 1min</b>
<b>2. Associação dos Primers</b>	<b>50°C - 65°C</b>	<b>30 secs – 1min</b>
<b>3. Polimerização</b>	<b>72°C</b>	<b>1min</b> <b>(+ 30secs per 500pb DNA)</b>

20 a 30 ciclos levam de 2 a 3 horas

Nota: As temperaturas e duração das etapas 1 e 2 são definidas de acordo com a natureza e o tamanho do DNA que se quer amplificar e com a sequência dos primers.

# DNA polimerase utilizada

Taq DNA polimerase



Bactéria *Thermus aquaticus*

Temperatura ótima de catálise = 72°C

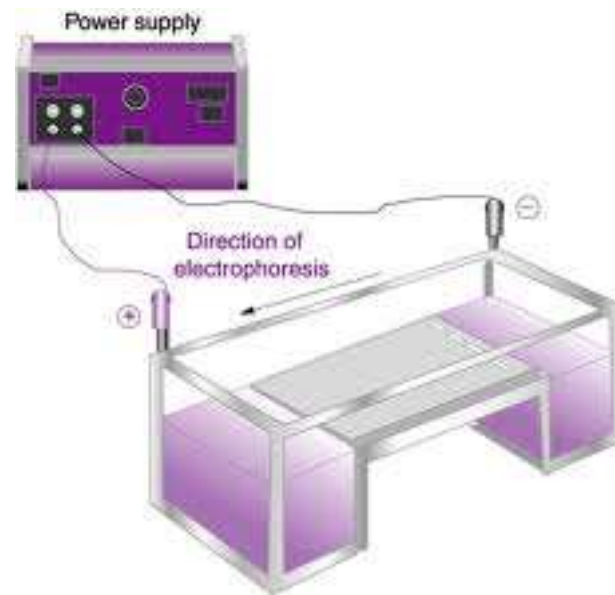
A enzima não desnatura a 95 °C

# Análise do Produto amplificado

A amostra é retirada do termociclador



Submetida a eletroforese



Aula Prática

## Eletoforese em gel de agarose

Eletoforese é uma técnica utilizada para **separar compostos eletricamente carregados** em um fluido ou **suporte** sob influência de um **campo elétrico**

Para ácidos nucleicos **agarose** é o suporte mais comumente usado.

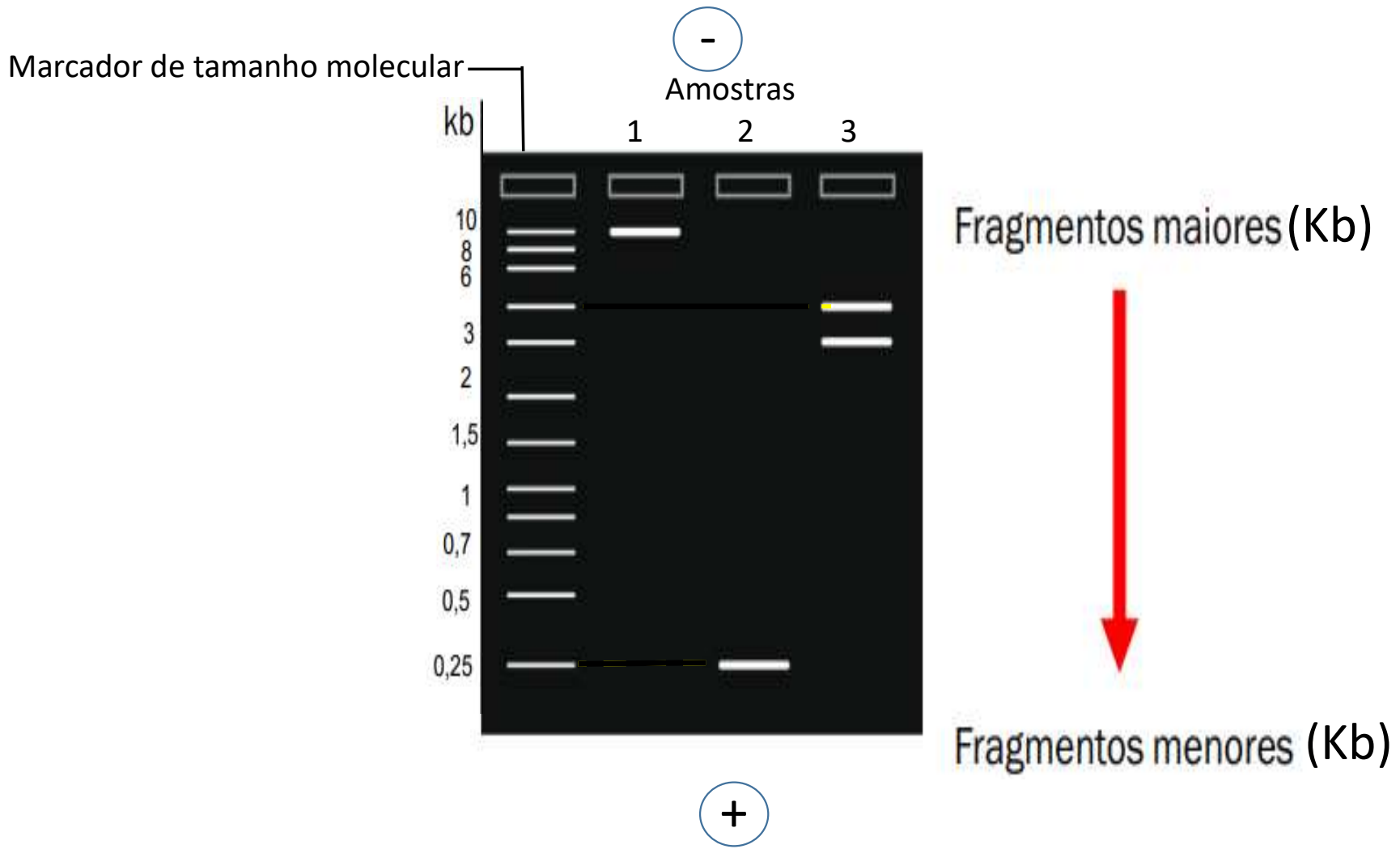
Os monitores darão uma aula explicando os princípios e detalhes desta técnica

# Eletroforese em gel de agarose

## Informações Importantes para esta aula

- O DNA a ser separado é **dupla fita**
- Nos tampões utilizados (pH 7,5 a 7,8) o DNA está **carregado negativamente**.
- O DNA migra para o **polo positivo**
- Separação das moléculas de DNA **por tamanho molecular** (Unidades **pb, Kpb, Kb**)

# Aspecto de uma eletroforese de DNA em gel de agarose



## Observações importantes

- A PCR é uma técnica muito sensível
- Contaminação com DNA externo é um problema sério
- Nas amostras, sempre incluir um controle positivo (para saber se a reação está funcionando)
- Sempre incluir um controle negativo (todos os reagentes menos o DNA). Este controle serve para verificar se não há contaminação de DNA nos reagentes. Caso houver amplificação nesta amostra, novos reagentes devem ser preparados.
- Cada procedimento deve ser padronizado para cada tipo de amostra e para cada par de primers.



# Aplicações

- Diagnóstico de doenças
- Medicina Forense
- Identificação de Organismos Transgênicos (próximas aulas)
- Pesquisa: clonagem gênica, sequenciamento, etc. (próximas aulas)

## Diagnóstico de Doenças - Exemplos

### **Causadas por Patógenos**

Chikungunya (vírus)

Dengue (vírus)

Zika (vírus)

Gonorréia (bactéria)

Clamídia (bactéria)

Trypanosoma cruzi (protozoário)

e outras

### **Doenças Genéticas**

Hemoglobinopatias variantes.

Imunodeficiência Combinada Grave.

Trombofilia.

Fibrose cística

e outras

VÍRUS

# Definições

Os vírus são agentes infecciosos que se replicam dentro de uma célula hospedeira.

**Não podem ser classificadas como organismos vivos nem entidades não vivas.**

Possuem características de ambos.

## Os vírus

Podem se replicar como organismos vivos, **mas**, só podem fazê-lo dentro da célula do hospedeiro.

Utilizam a maquinaria celular de seu hospedeiro para produzir cópias de si mesmos.

Não contêm componentes celulares essenciais para a vida (Ex. Enzimas para a síntese de ATP).

Podem ser cristalizados e permanecer "ativos" por longos períodos.

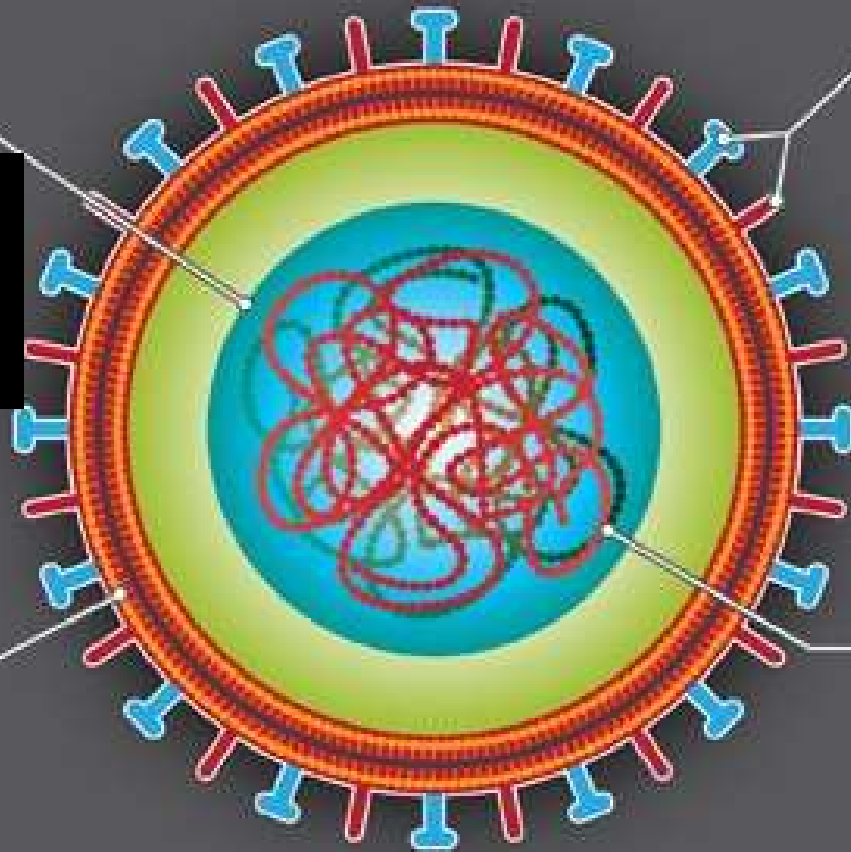
# VIRUS STRUCTURE DNA ou RNA

## 3 - Capsid

A protein-nucleic acid complex. It consists of a CAPSID plus enclosed nucleic acid. Depending on the virus, the nucleocapsid may correspond to a naked core or be surrounded by a membranous envelope.

## 1 - Viral envelope

The viral envelope is made from fatty lipid molecules taken from cells in the host  
e proteínas virais



## 2 - Surface proteins

These help the virus recognise and bind to cells in the host organism

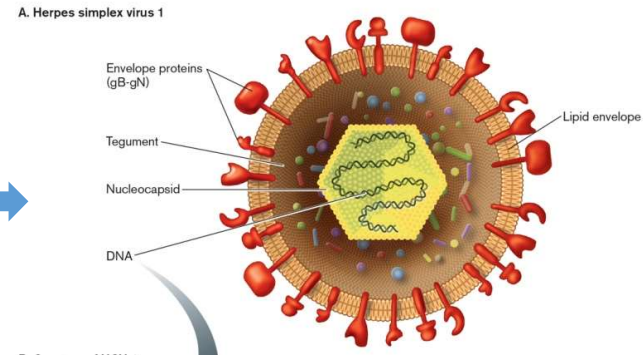
## 4 - Virus genetic material [DNA or RNA]

The virus' genetic material contains the instructions for making new copies of the virus

# Tipos de Vírus

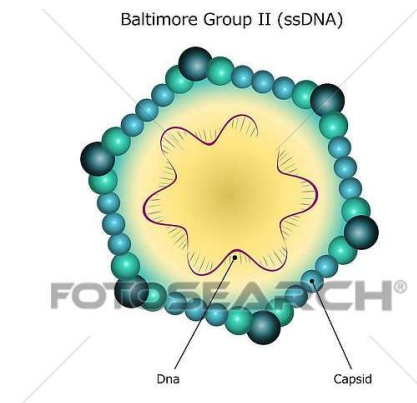
## Vírus de DNA

- Dupla fita



Herpes

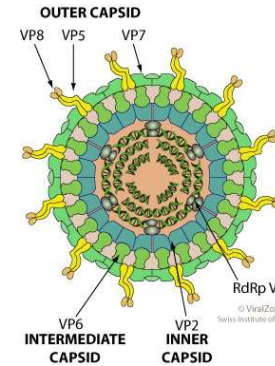
- Fita Simples



Parvovírus

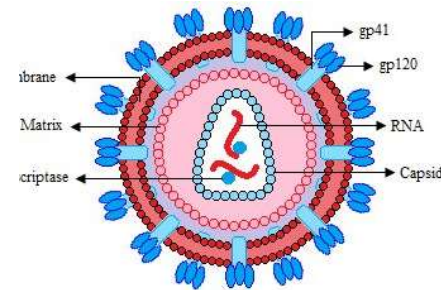
# Tipos de Vírus

**Vírus de RNA**  
- Dupla fita

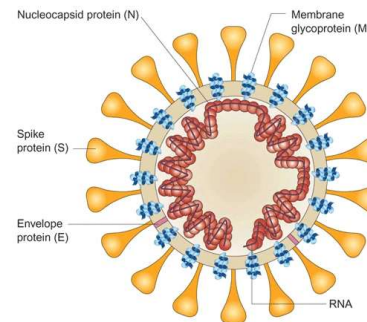


**Rotavírus**

- Fita Simples

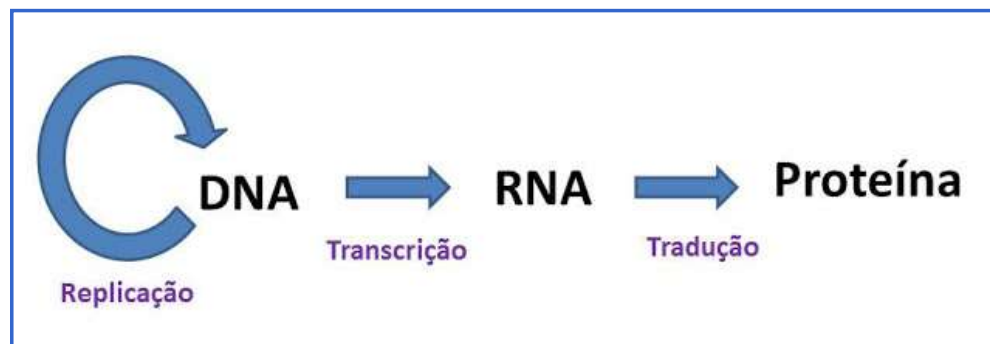


**HIV**



**SARS-CoV2**

# A REPLICAÇÃO DOS VÍRUS DE RNA DESAFIOU O DOGMA DA BIOLOGIA MOLECULAR

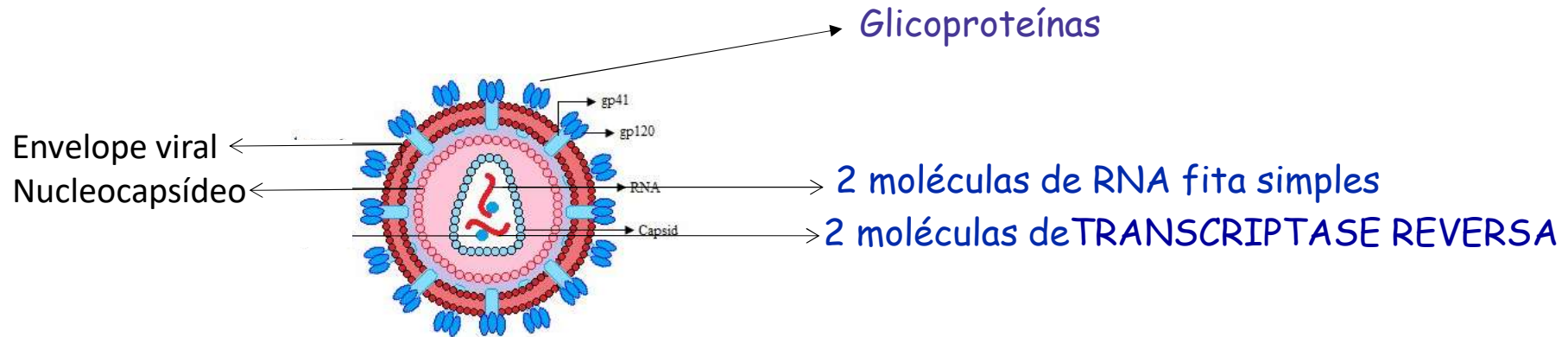


Estratégias de replicação dos Vírus

<https://slideplayer.com.br/slide/375922/>



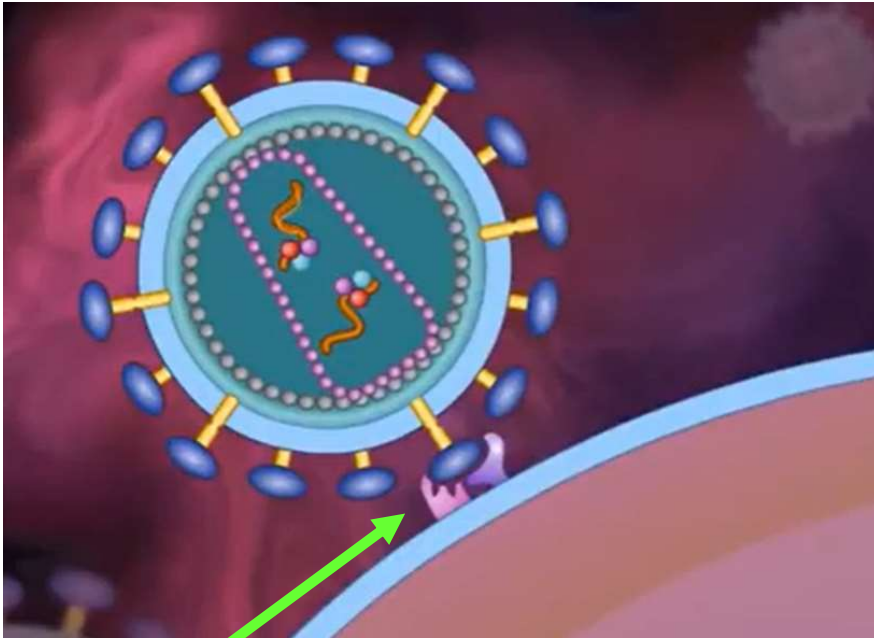
# HIV



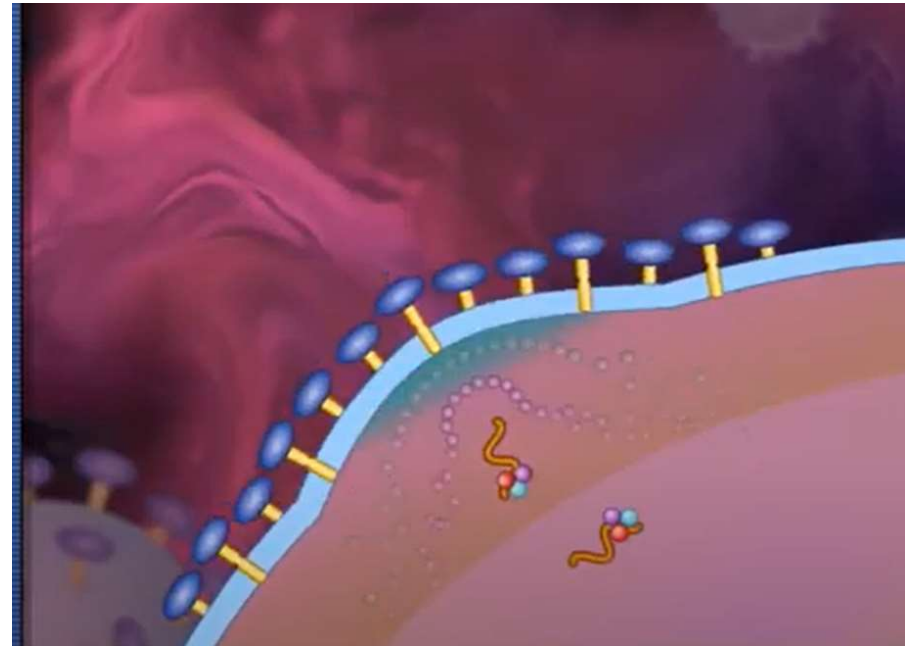
- Infecta linfócitos T CD4 - Células do sistema imune
- Capsídeo do vírus não entra na célula

**Nota:** HIV é a sigla em inglês do vírus da imunodeficiência humana. Pertence à "família" dos retrovírus. Provoca AIDS.

# Infecção pelo HIV



Receptor específico na superfície do linfócito T CD4

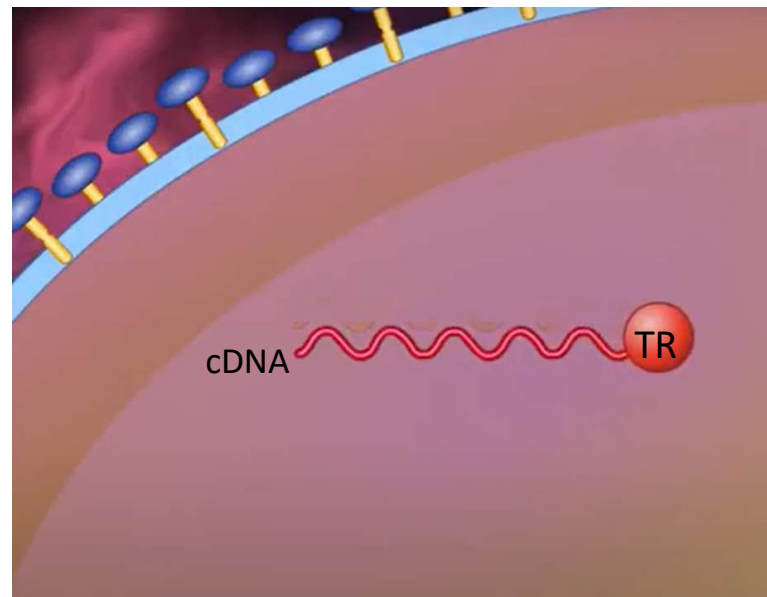
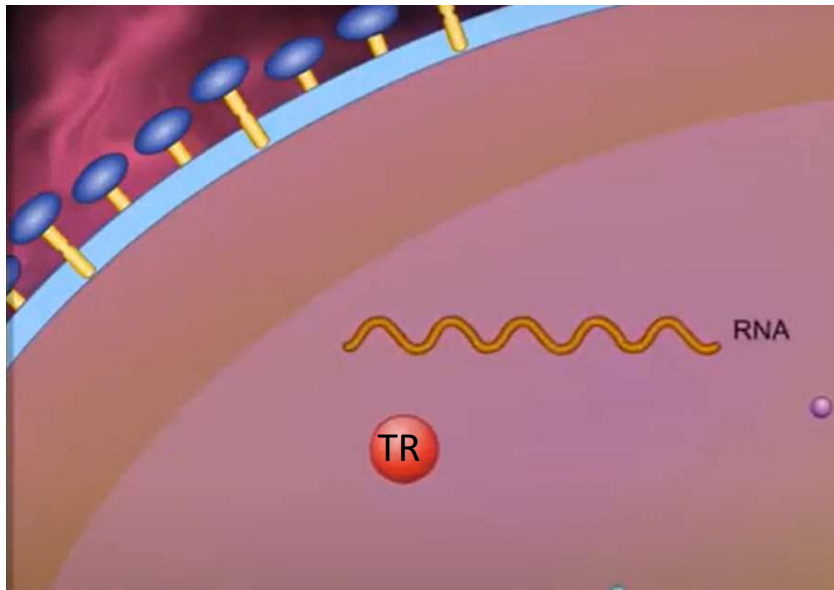


RNA e Transcriptase Reversa  
VIRAL entram na célula

RNA → DNA

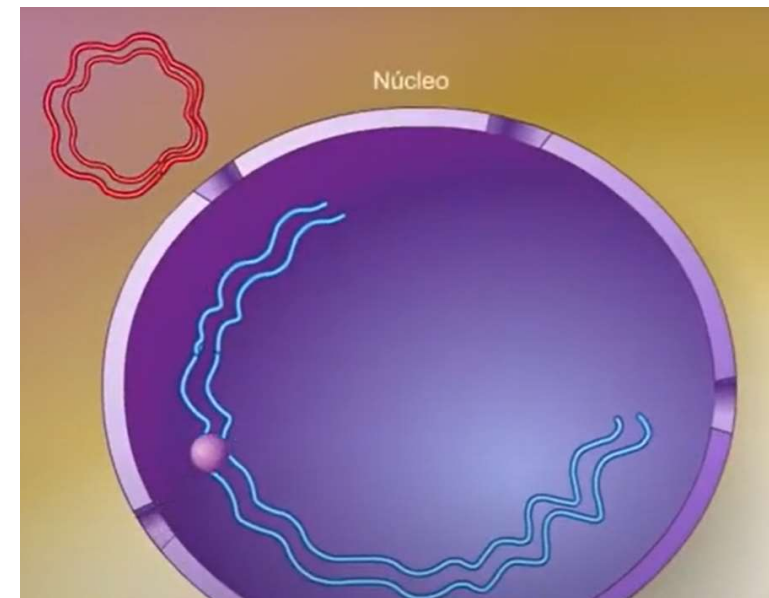
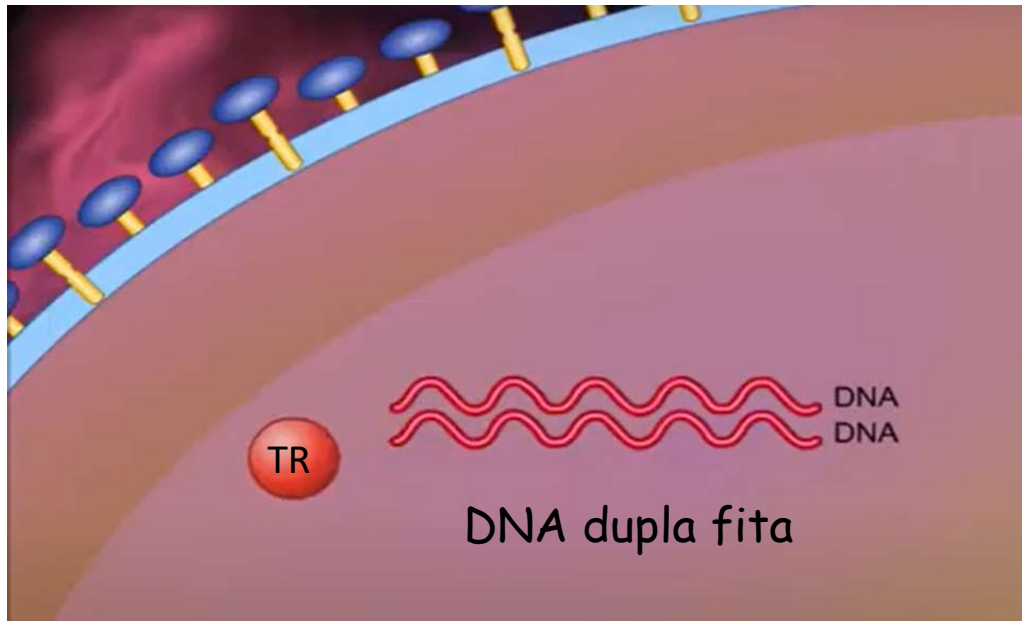
## Transcriptase reversa do vírus

Etapa 1: RNA (molde viral) + dNTPs (de desoxiribose) + Primer de DNA →  
cDNA (complementar fita simples) + PPi



RNA  $\longrightarrow$  DNA  
Transcriptase reversa

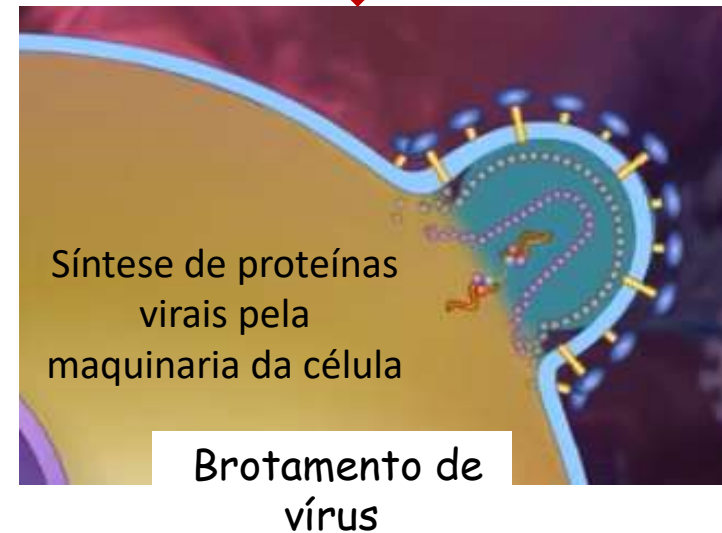
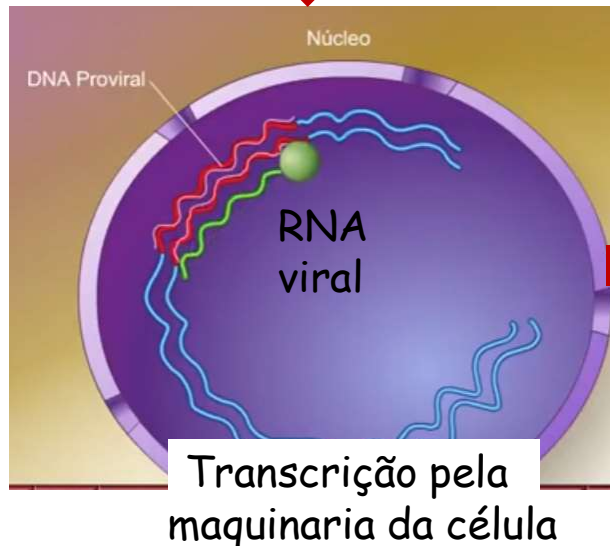
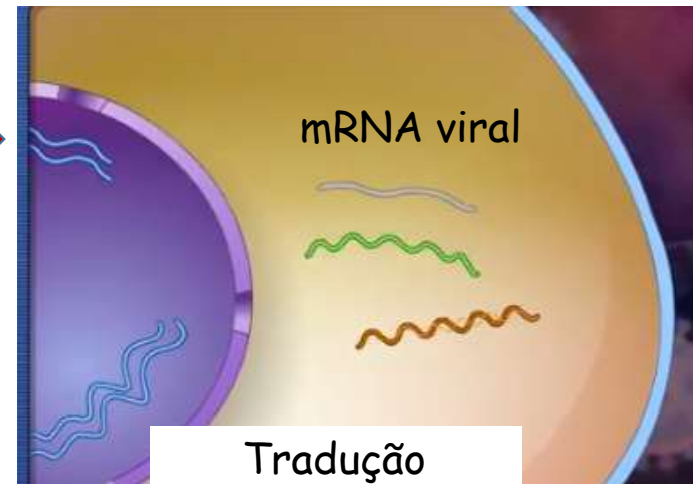
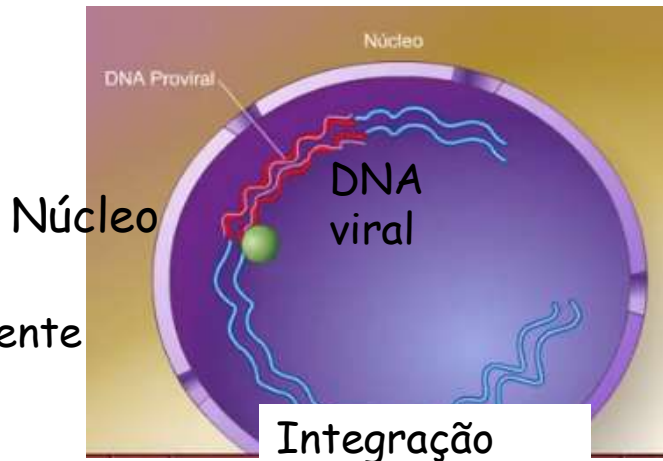
Etapa 2: cDNA molde (fita simples) + dNTPs (de desoxiribose)  $\longrightarrow$   
DNA viral (dupla fita) + PPi



DNA dupla fita do vírus entra no núcleo do linfócito e se integra em um de seus cromossomos

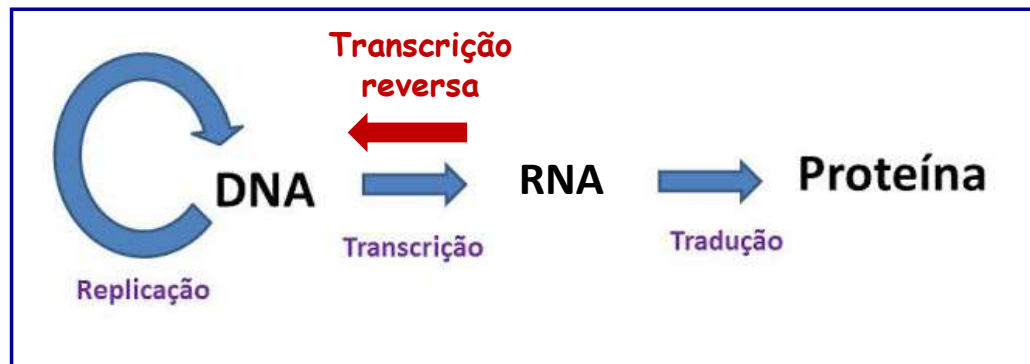
# Replicação do Vírus pela maquinaria da célula

HIV



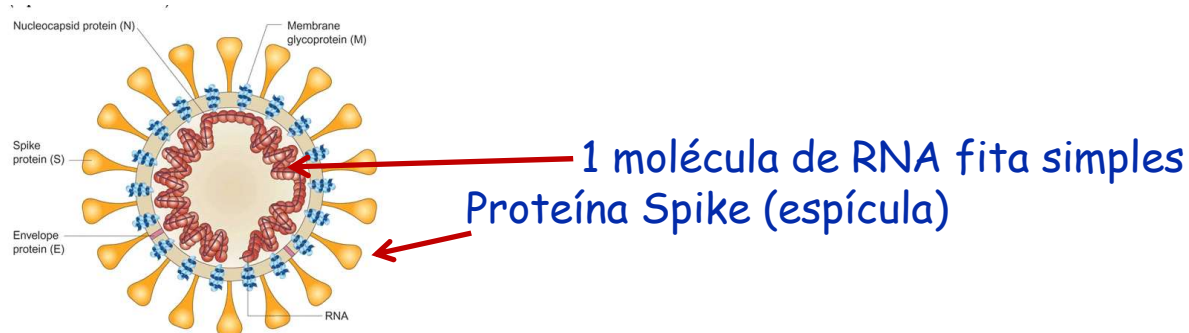
<https://www.youtube.com/watch?v=3BTNczejfiU>

# Modificação do Dogma da Biologia Molecular



RNA do vírus dá origem a DNA dupla fita do vírus que se integra no cromossomo da célula hospedeira

# Coronavírus SARS-CoV-2



**Nota: Não tem TRANSCRIPTASE REVERSA**

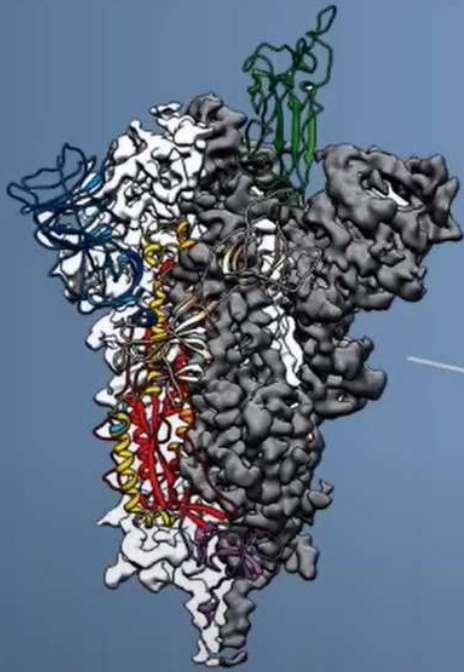
- Infecta qualquer tipo de célula
- Receptor na célula hospedeira ACE2 - Angiotensin-converting enzyme 2
- Não tem enzima no capsídio

**Nota: SARS - síndrome respiratória aguda severa.  
CoV-2 - Coronavirus 2.  
Covid-19 - CoronaVirusDisease- 2019.**



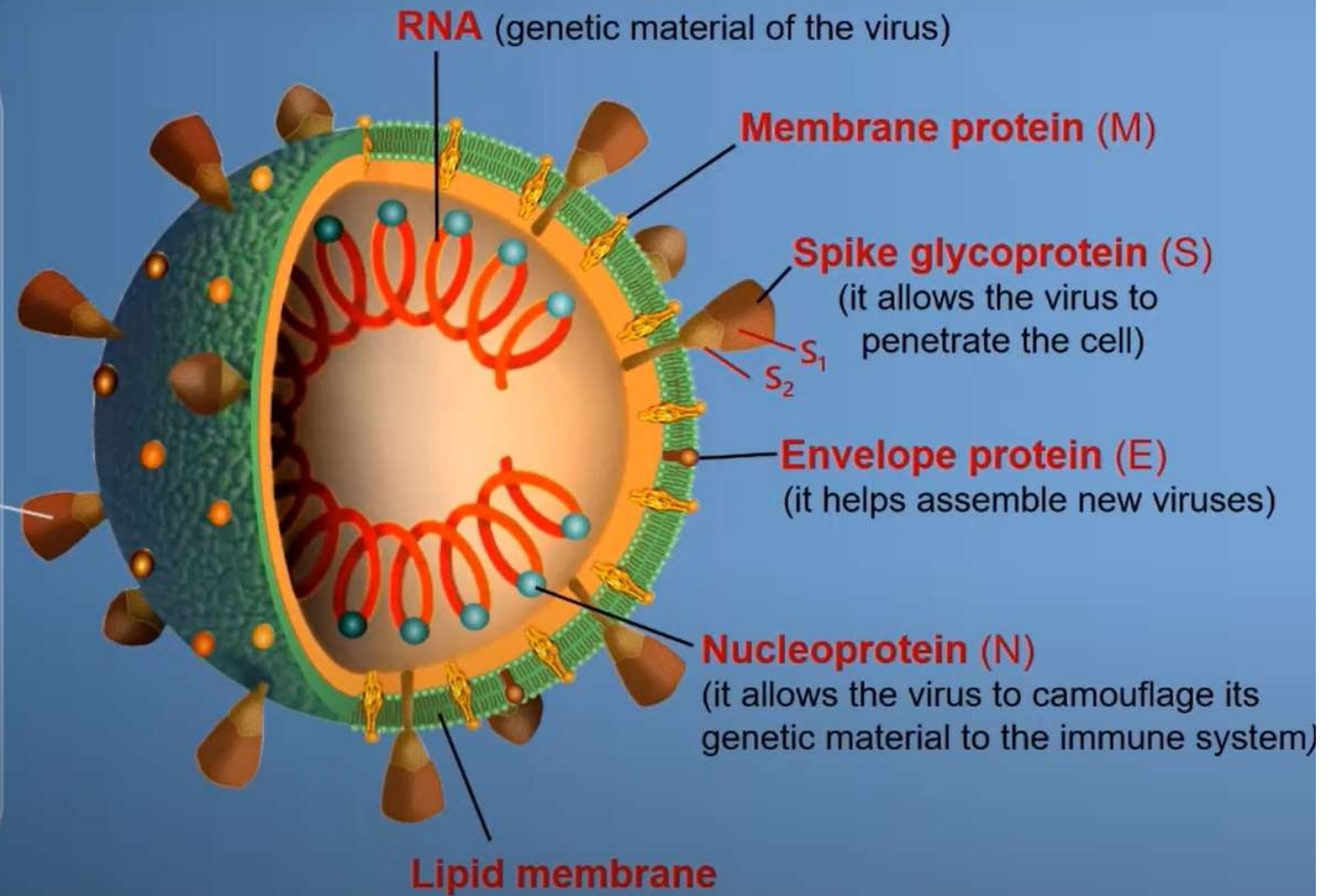
## Spike glycoprotein (S)

It is the entrance key to the cell



Source: University of Texas at Austin NIH

IDEOS



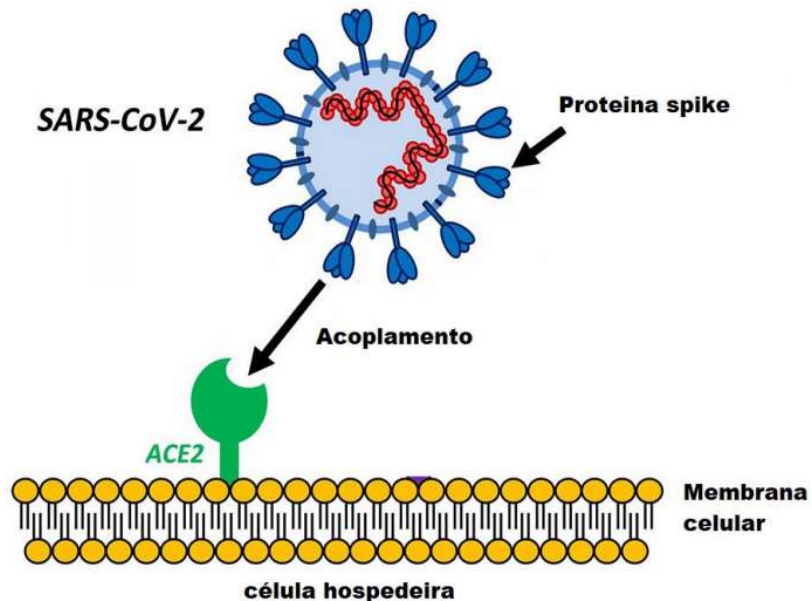
## Receptor ACE2

Proteína presente na membrana de muitos tipos de células e tecidos de:

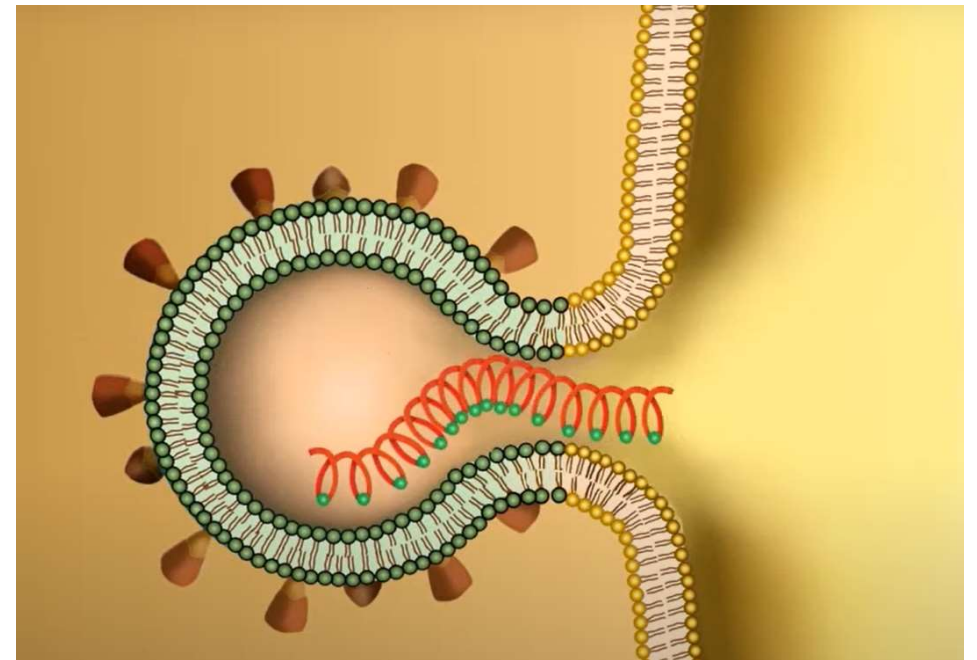
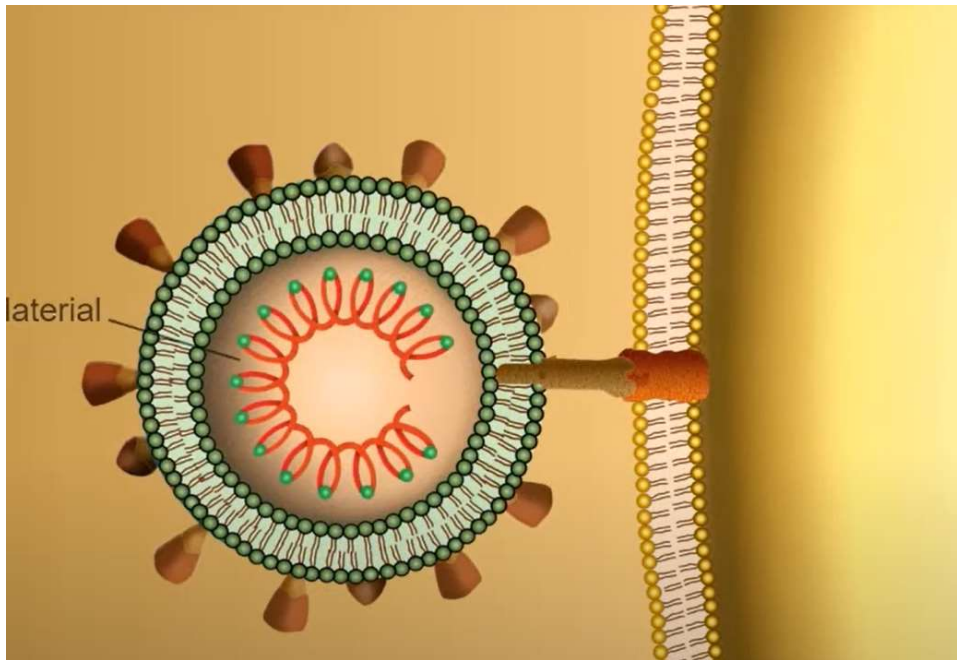
- pulmões, coração, vasos sanguíneos, rins, fígado etc.

- Está presente no epitélio do nariz e boca e pulmões.

- Isto explica por que o SARS-CoV2 pode infectar/afetar tantos órgãos



## Infecção pelo SARS-CoV2



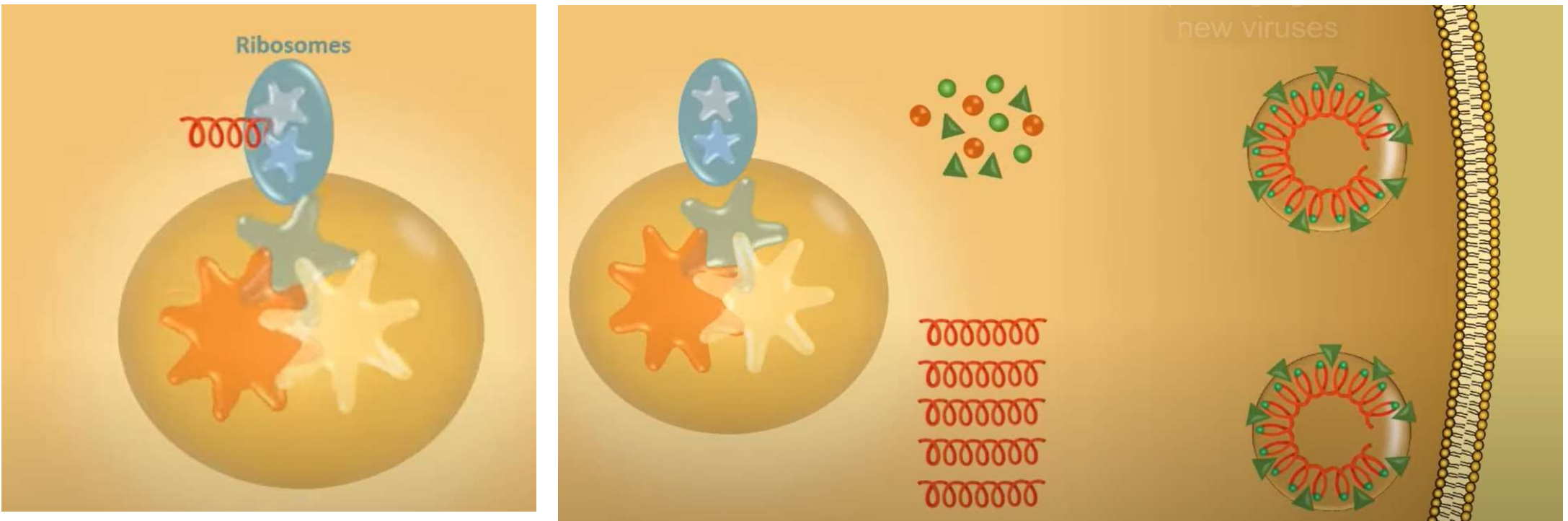
Na célula entra apenas o RNA do vírus

RNA do vírus ~ 30.000 nucleotídeos

RNA viral age como um mRNA

Nos ribossomos da célula ocorre a síntese das proteínas virais, dentre elas, a enzima RNA replicase

### RNA Replicase - Multiplicação do RNA viral



<https://www.youtube.com/watch?v=SvA1s5S9rQ0>

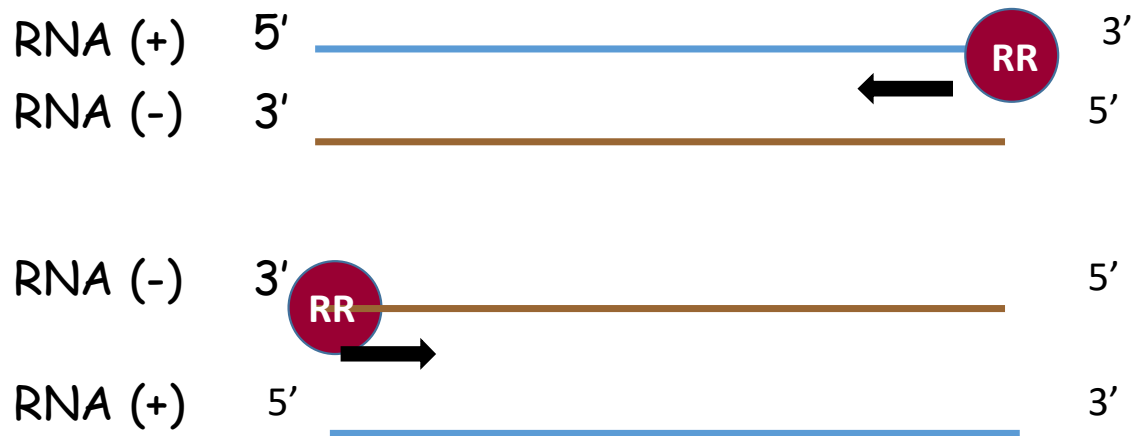
RNA → RNA

RNA replicase

RNA polimerase dependente de RNA

RNA viral (+) + rNTPs (de ribose) → RNA (-) + PPi

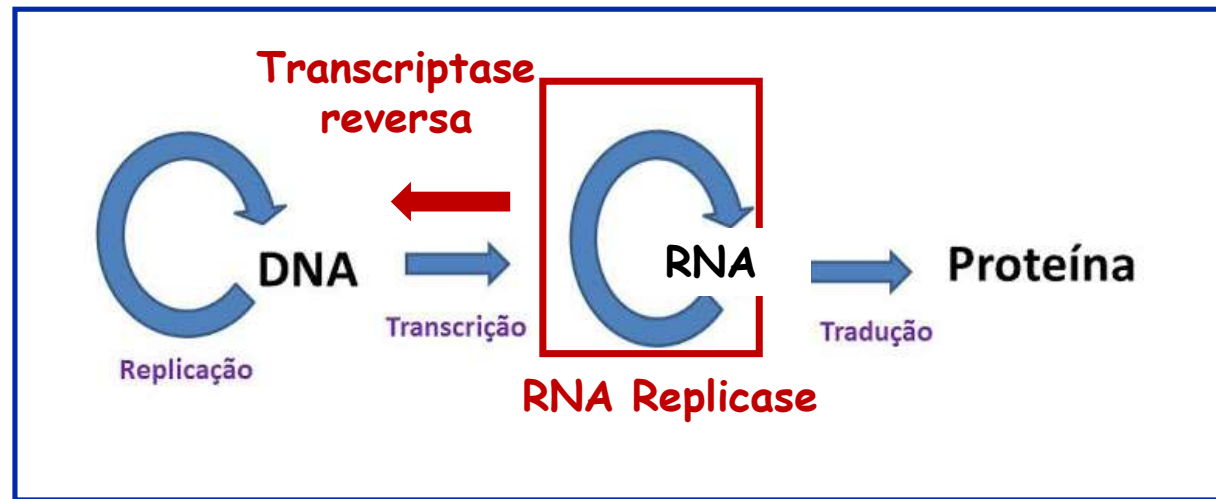
RNA complementar (-) + rNTPs (de ribose) → RNA (+) + PPi



<https://www.youtube.com/watch?v=SvA1s5S9rQ0>



## "Novo formato" do Dogma da Biologia Molecular....



<https://www.infoescola.com/biologia/dogma-central-da-biologia-molecular/>

## DNA e RNA Polimerases - Resumo

- DNA polimerase dependente de DNA - síntese de DNA  
Enzima de *E. coli*: um erro a cada  $10^9$  a  $10^{10}$  nucleotídeos adicionados
- DNA polimerase RNA-dependente = Transcriptase reversa - síntese de cDNA  
Enzima de HIV: um erro a cada  $10^4$  nucleotídeos adicionados #
- RNA polimerase dependente de RNA = RNA replicase - síntese de RNA  
Enzima de Corona vírus, um erro a cada  $10^4$  nucleotídeos adicionados #

#Resultado: altas taxas de mutações nos vírus de RNA

Problema: Genoma do Coronavírus -  $3 \times 10^4$  nucleotídeos. Após uma replicação, quantos nucleotídeos terão sido alterados?

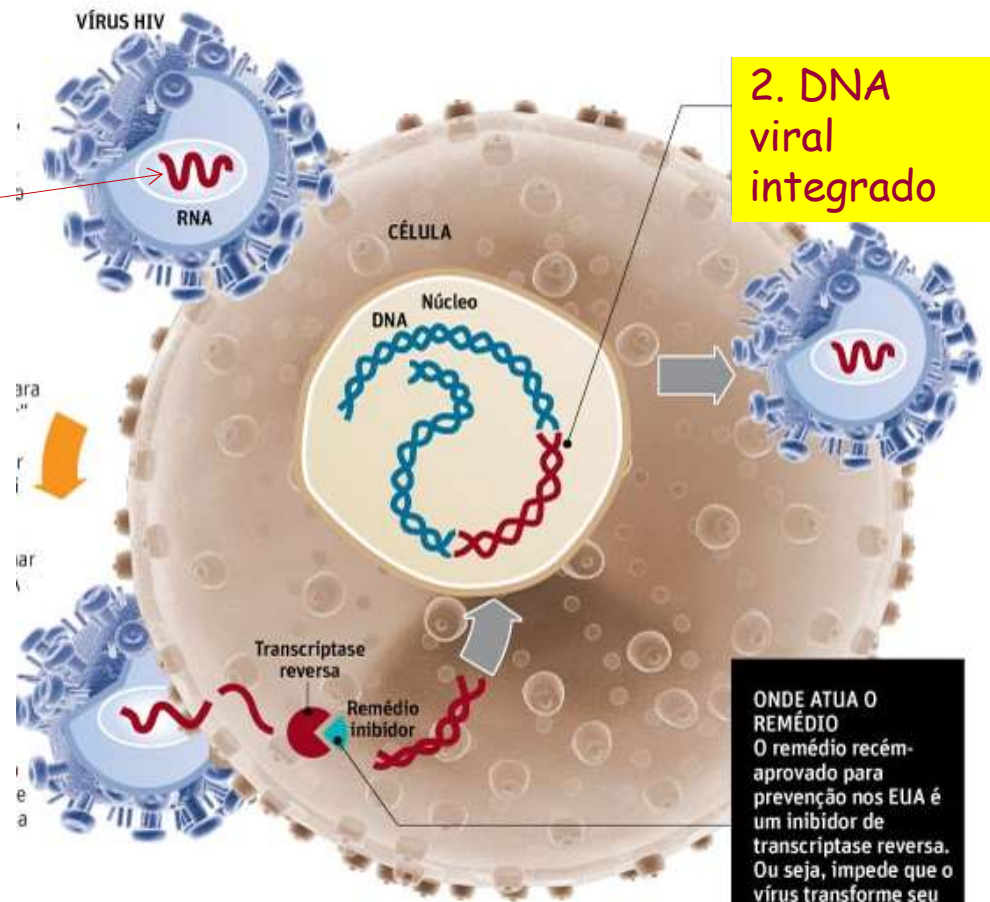
# Diagnóstico Molecular do HIV (Por PCR)

Dois tipos de diagnóstico  
com alvos diferentes

1. RNA



Carga viral





# Diagnóstico do DNA do HIV integrado no genoma do leucócito T por PCR

Genoma do HIV - 9.749 nt



*Alvo - Gene Env. Produto do PCR esperado = 600 pb*

## Detecção do DNA do HIV integrado no genoma leucocitário

**Caso:** 4 indivíduos (H, A, B e C) têm sorologia positiva para HIV (têm anticorpos contra o HIV)

### Diagnóstico confirmatório de HIV: PCR

#### Procedimento

- 2 mL de **sangue** coletados dos indivíduos com suspeita H, A, B e C;
- Extração do DNA do sangue (leucócitos + DNA do vírus integrado);

#### - Fazer o PCR

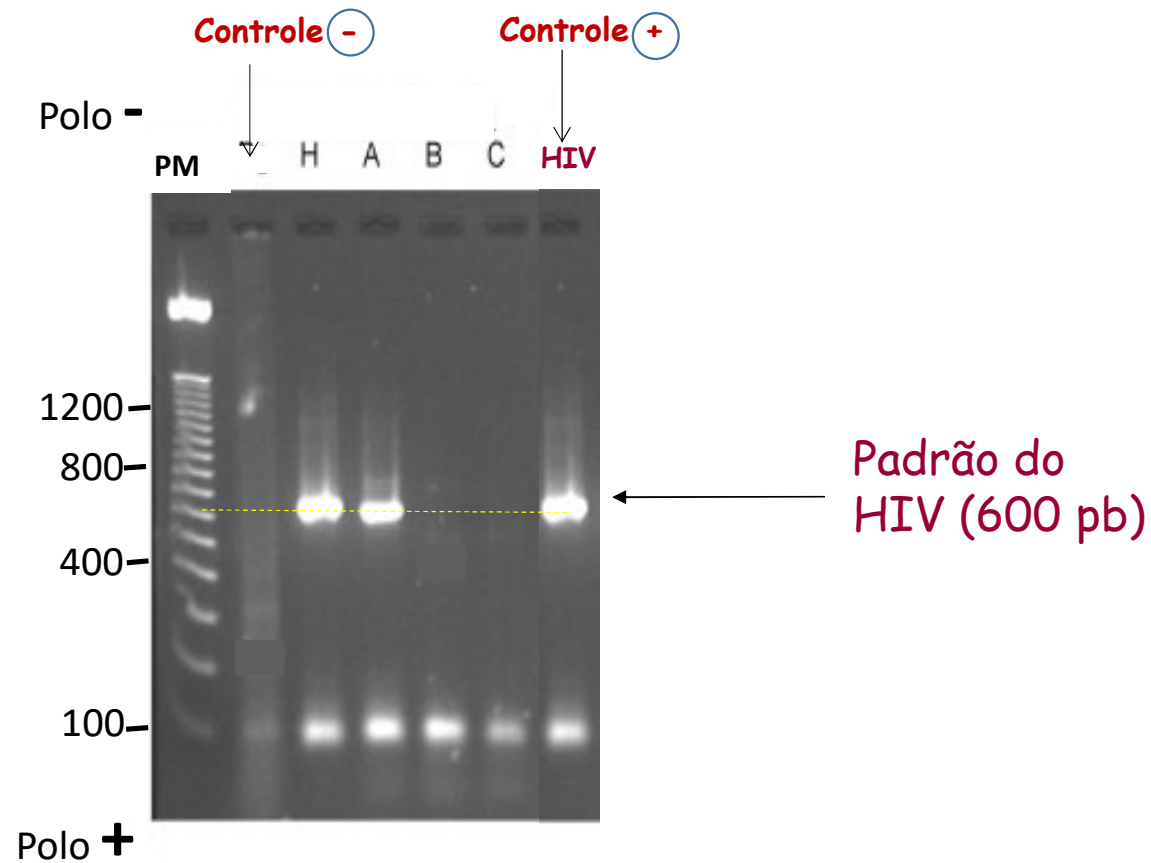
Amostras do DNA dos 4 pacientes, primers, dNTPs, Taq polimerase, etc.

Uma amostra com o DNA do HIV (compra-se): Controle positivo.

Um Controle negativo (todos os reagentes **menos o DNA dos indivíduos**)!!!!

## Após PCR

Análise dos produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose



Conclusão: Em quais pacientes foi confirmada a presença do HIV integrado?



# Exame do **RT-PCR** para detecção da COVID-19

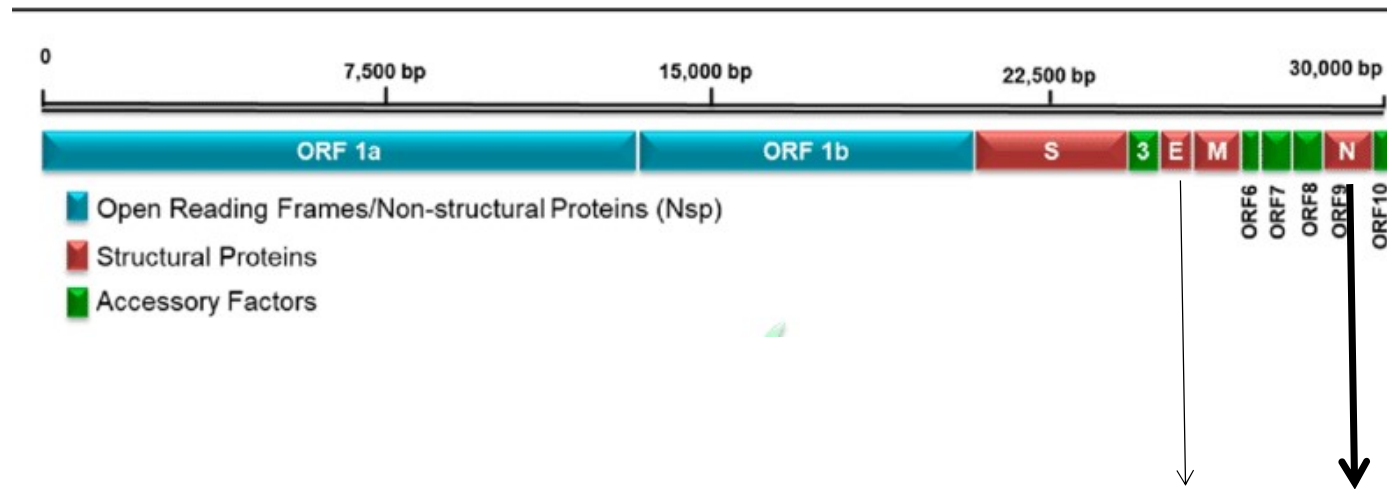


## Dados importantes

- O vírus é de RNA
- A PCR não amplifica RNA
- Para detectar a presença do vírus, ANTES de fazer a PCR, devo transformar o RNA do vírus em DNA dupla fita.
- Para isto tenho que usar uma transcriptase reversa. Esta enzima é COMPRADA.

# Genoma de SARS CoV-2

Genoma 30.000 nt



Genes Alvo para diagnóstico

Leitura

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7687508/pdf/PAMJ-SUPP-35-2-121.pdf>

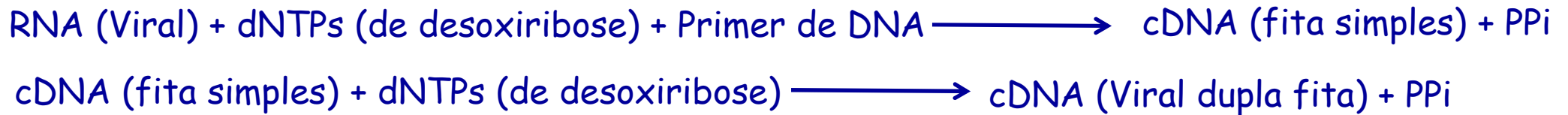
## Procedimento

1: Swab da garganta e/ou nariz (células com ou sem vírus)

2: Lise das células e purificação de ácidos nucleicos (vírus) com reagentes apropriados.

3: RNA viral é convertido em DNA dupla fita pela **transcriptase reversa** <sup>(1)</sup>

Nota: A enzima catalisa as DUAS reações



<sup>(1)</sup> **transcriptase reversa comprada de companhias especializadas**



## Procedimento

4: Adição de primers para o gene alvo + Taq polimerase + dNTPs



5: Reação de PCR em termociclador

6: Análise da quantidade de produto amplificado por software apropriado

**Todo o processo leva de 4 a 8 horas.**

7: Divulgação do resultado (24 ou 72 horas dependendo do laboratório)

# Uso da PCR em Medicina Forense

## PCR em Medicina Forense

- Identificação de criminoso
- Identificação de restos humanos
- Teste de Paternidade
- Outros

### Material

**Blood**

**Tissue**

**Semen**

**Urine**

**Hair**

**Teeth**

**Saliva**

**Bone**

## Alvos de DNA para Medicina Forense

- Regiões de DNA altamente repetitivas - não codificantes
- Nestas regiões há acúmulo de mutações
- Grande variação de padrão entre indivíduos

### Leitura

[http://www.malthus.com.br/rw/forense/Aula\\_DNA\\_Arthur\\_Estivalet\\_Svidzinski.pdf](http://www.malthus.com.br/rw/forense/Aula_DNA_Arthur_Estivalet_Svidzinski.pdf)

<https://pt.slideshare.net/anjosjr/dna-forense>

## Exemplo de uma região repetitiva

Indivíduo 1

T | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | (

Indivíduo 2

AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | (

Indivíduo 3

T | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG | AGTCGGTAAG |

Procedimento: isolar DNA da amostra e fazer PCR com primers para várias regiões repetitivas do genoma - Multiplex PCR

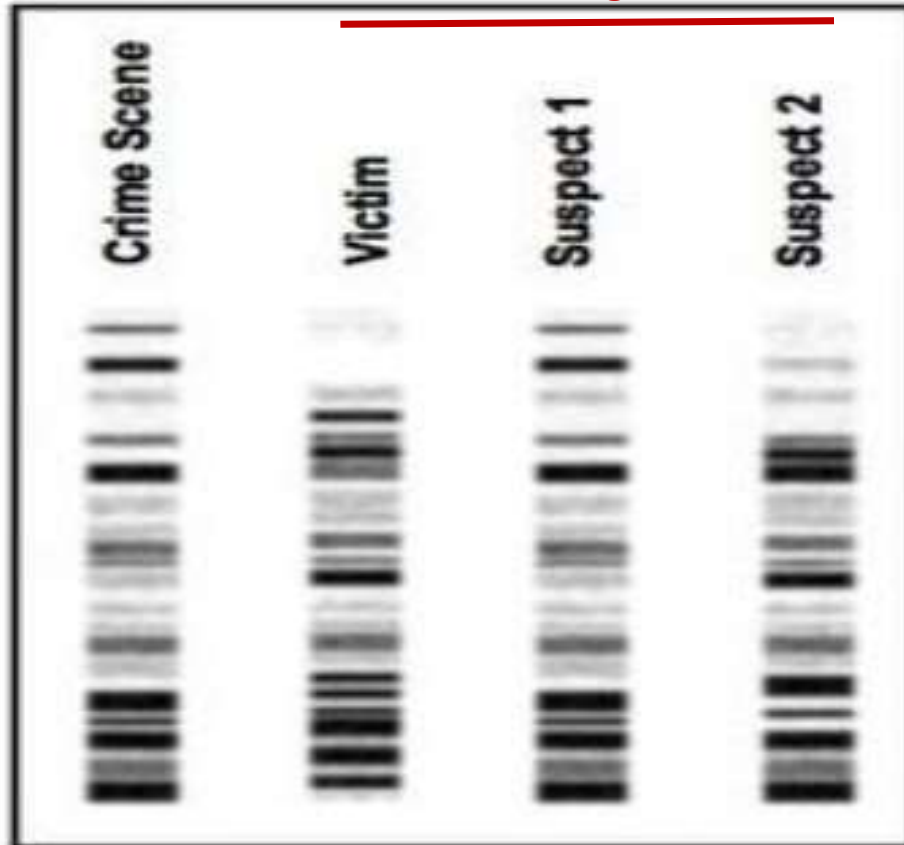
Resultado: Muitos produtos de PCR para cada indivíduo;  
Padrão característico do indivíduo;  
Comparar os padrões obtidos para os vários indivíduos

# Exemplo: Análise de um estupro com 2 suspeitos

DNA extraído das amostras  
Multiplex PCR e gel de agarose

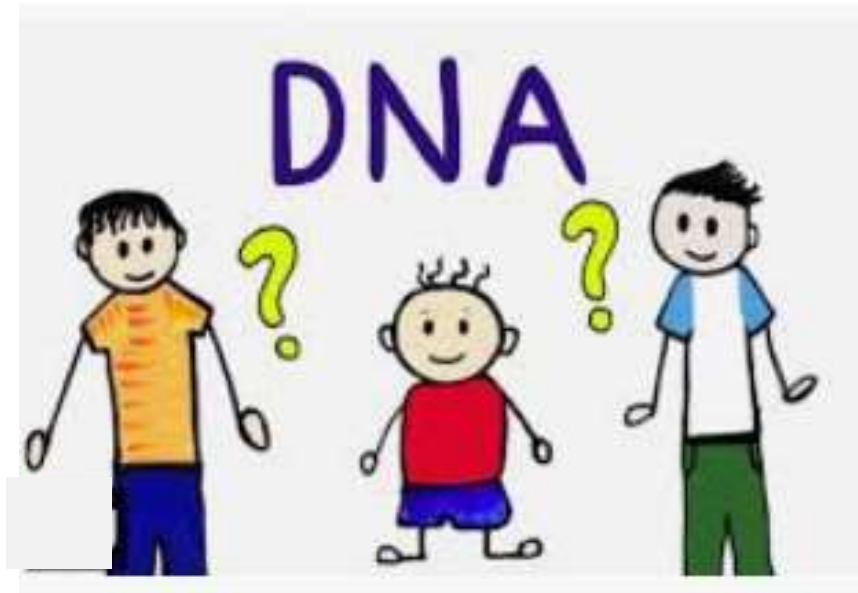
unhas da vítima

Sangue



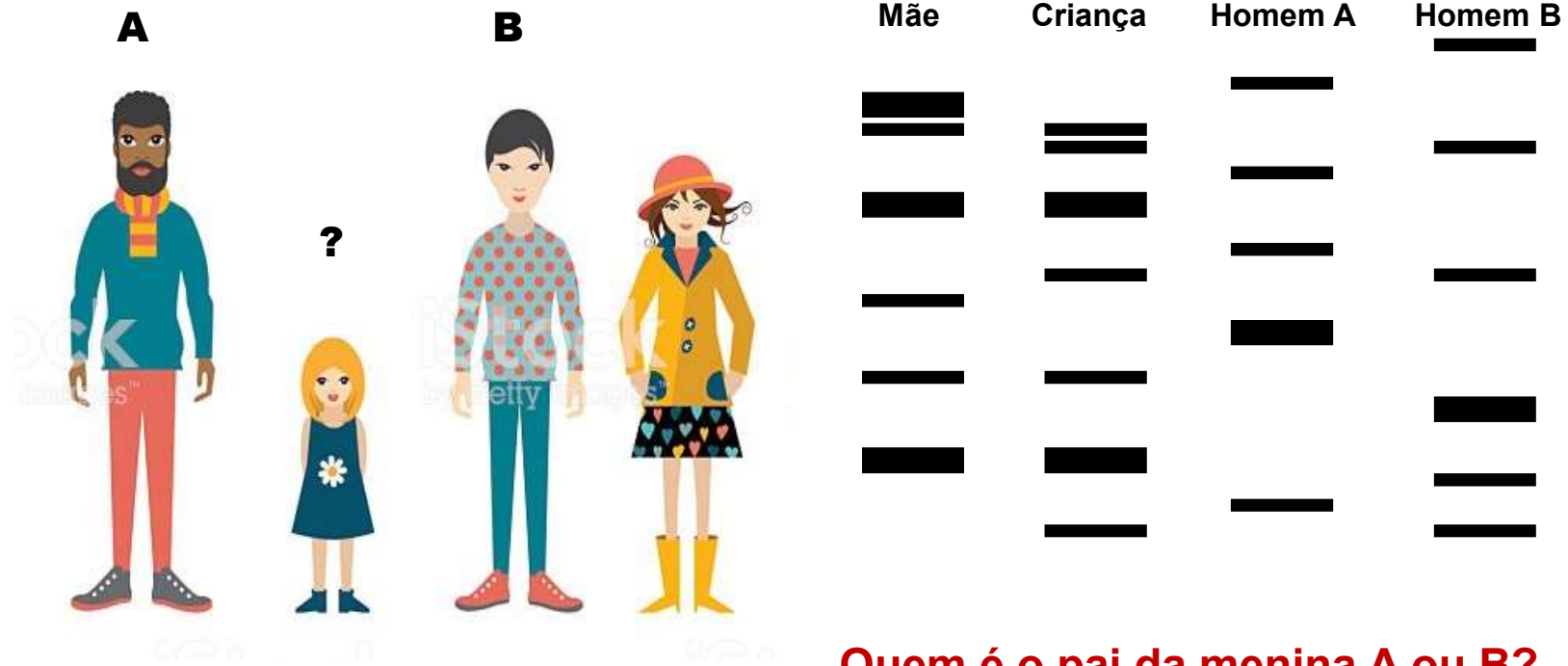
Quem é o criminoso?

## Teste de Paternidade



No **Teste de paternidade**: a criança deve ter 50% do padrão de bandas da mãe e 50% do padrão de bandas do pai.

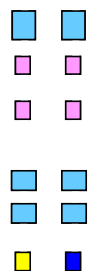
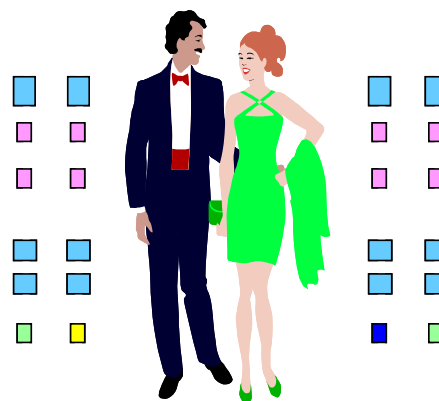
Procedimento: DNA extraído de amostras de todos  
Multiplex PCR e gel de agarose



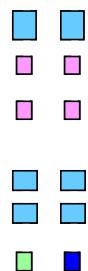
**Quem é o pai da menina A ou B?**



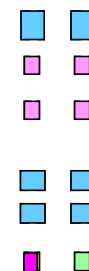
Qual das três crianças **não** é filho deste senhor?



1



2



3

# PCR para Clonagem Gênica

Próxima aula

PCR Song - Muito legal, vejam!

<https://www.youtube.com/watch?v=mvvP90Cpdfc>