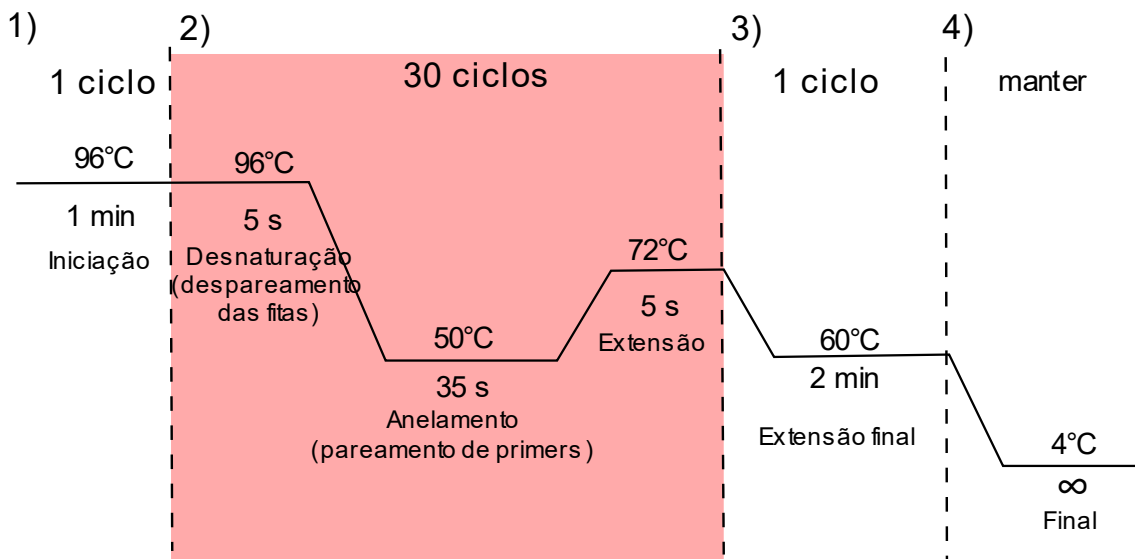


Resumo sobre a técnica PCR

A Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) revolucionou a maneira do DNA e RNA serem analisados. É uma técnica utilizada para amplificar qualquer sequência nucleotídica de forma seletiva e realizada *in vitro*. Na reação de PCR, são necessários desoxirribonucleotídeos (dNTP), iniciadores (*primers*) e uma DNA polimerase. Os primers são planejados pelo pesquisador, de forma a parear com o início e o fim da região do gene de interesse. Esses primers são o reverso (*reverse*) e o à frente (*forward*). Esses primers então flanqueando o gene de interesse, irão direcionar a DNA polimerase para a duplicação do segmento de DNA. A DNA polimerase utilizada resiste à temperaturas mais elevadas, em que, normalmente, outras DNA polimerase seriam desnaturadas. Essa DNA polimerase foi descoberta de bactérias *archaea*, que crescem em altas temperaturas, como a espécie *Thermus aquaticus*, nomeando a enzima de *Taq* DNA polimerase.

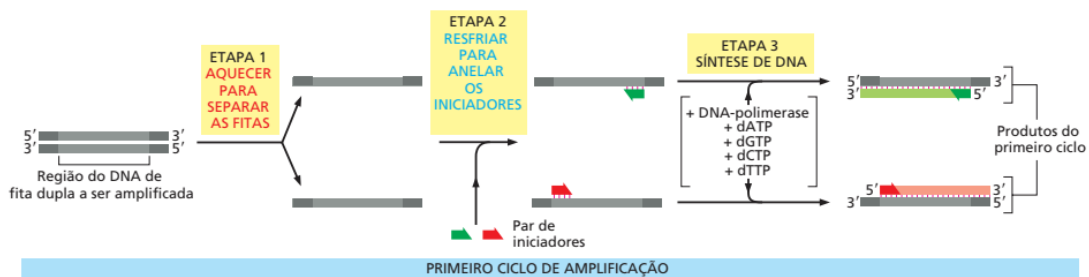
Um exemplo de rampa de PCR:



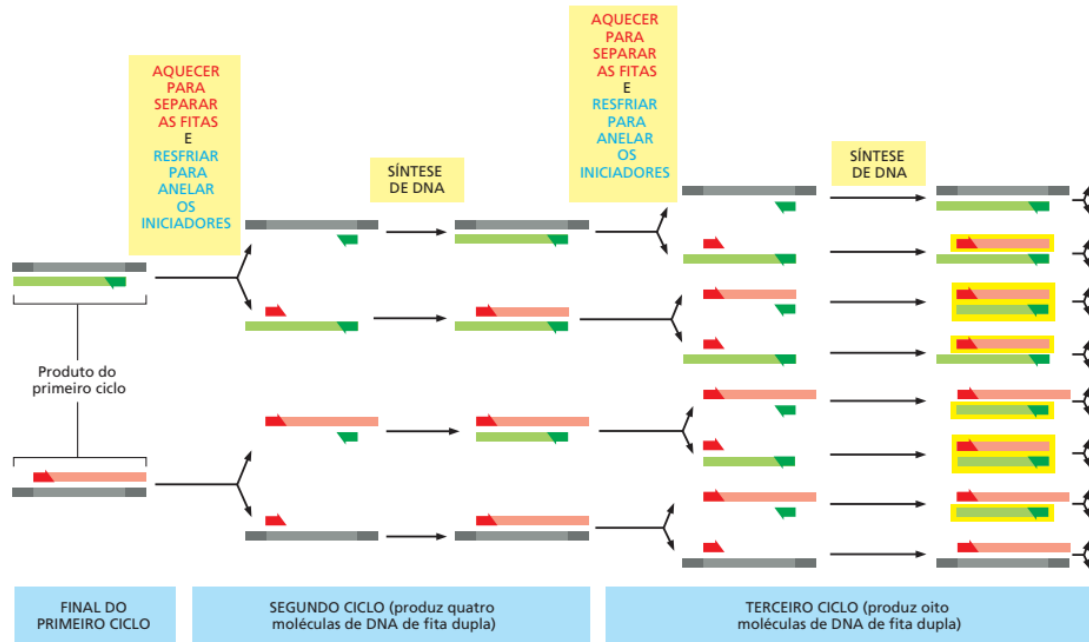
Resumidamente: 1) Na iniciação, a reação é aquecida, auxiliando na ativação da DNA polimerase. 2) No início de cada ciclo, as duas fitas do molde de DNA de fita dupla são separadas pelo aumento de temperatura. Posteriormente, a temperatura é abaixada o suficiente para que os primers se pareiem a cada uma das fitas, sendo essa temperatura variável dependendo da sequência dos primers, mas de forma geral, fica em torno de 50°C~65°C. Esses primers marcam os limites da direita e da esquerda do DNA a ser amplificado. Permite-se então que a DNA polimerase replique cada fita de forma independente na fase de extensão, onde a temperatura é a ótima de funcionamento da enzima, geralmente ~72°C. Nos ciclos subsequentes, todas as moléculas de DNA recém-sintetizadas produzidas pela polimerase servem de molde para o próximo ciclo de replicação. Por meio desse processo iterativo de amplificação, muitas cópias

da sequência original podem ser produzidas, bilhões após cerca de 20 a 30 ciclos. A parte em vermelho representa a parte em que as etapas são repetidas. 3) Após a repetição de 30 ciclos, uma extensão final pode ser adicionada, para garantir que qualquer DNA de cadeia simples restante seja completamente alongado. 4) Por fim, no final, mantém-se a temperatura de reação a 4°C por tempo indeterminado, e pode ser empregado para o armazenamento a curto prazo dos produtos da PCR.

Agora, vejamos outra imagem que ilustra o que ocorre no primeiro ciclo de amplificação do DNA:



Cada ciclo da PCR inclui três etapas: (1) O DNA de fita dupla é aquecido brevemente para separar as duas fitas. (2) O DNA é exposto a uma quantidade excessiva de um par iniciadores específicos – projetados para limitar a região do DNA a ser amplificada – e a amostra é resfriada para permitir que os iniciadores hibridizem com as sequências complementares nas duas fitas de DNA. (3) Essa mistura é incubada com DNA polimerase e os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfato, de modo que o DNA possa ser sintetizado, a partir dos dois iniciadores. Para amplificar o DNA, o ciclo é repetido muitas vezes por meio do reaquecimento da amostra para separar as fitas de DNA recém-sintetizadas. Como a Taq DNA polimerase não se desnatura pelo calor da reação, não precisa ser adicionada novamente após cada ciclo.



Como o procedimento é repetido, todas os fragmentos recém-sintetizados servem como molde, no próximo ciclo. Uma vez que a polimerase e os oligonucleotídeos iniciadores permanecem na amostra após o primeiro ciclo, a PCR simplesmente envolve o aquecimento e então o resfriamento da mesma amostra, no mesmo tubo de ensaio, repetidamente. Cada ciclo duplica a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior, de modo que dentro de poucos ciclos, o DNA predominante seja idêntico à sequência delimitada pelos dois iniciadores no molde original, incluindo a sequência destes. No exemplo aqui ilustrado, três ciclos de reação produzem 16 cadeias de DNA, 8 das quais (em amarelo) correspondem exatamente a uma ou a outra fita da sequência original. Após mais de quatro ciclos, 240 de 256 cadeias de DNA corresponderão exatamente à sequência original, e após vários ciclos adicionais, essencialmente todas as fitas de DNA terão esse comprimento. Normalmente, 20 a 30 ciclos são realizados para efetivamente clonar uma região de DNA iniciando a partir do DNA genômico; o resto do genoma permanece não amplificado e, portanto, sua concentração é negligenciável comparada com a da região amplificada