

PCR em tempo real



Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Caroline Monteiro Novais

Estudante do curso de farmácia do
Centro Universitário de Barra Mansa.
E-mail: carol_farmacia@hotmail.com

Melissa Pires-Alves

Doutora em Biologia Celular e Molecular pela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Professora do Centro Universitário de Barra Mansa.
E-mail: melalves@ig.com.br

Colaborador

Fábio Freitas Silva

Introdução

O advento da biologia molecular foi certamente um dos maiores passos das ciências biológicas durante o Século XX. A descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) trouxe enormes benefícios e desenvolvimentos científicos como o seqüenciamento de genomas, a expressão de genes em sistemas recombinantes, o estudo de genética molecular, a determinação rápida da paternidade e o diagnóstico rápido de doenças infecciosas.

Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em Tempo Real, vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR que apresenta somente resultados qualitativos.

PCR

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), é uma metodologia que pode ser executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células (BRUCE, 1999). A técnica da PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu, em 1994, o prêmio Nobel.

A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima DNA-polimerase, a mesma que participa da replicação do material genético nas células. Esta enzima sintetiza

uma seqüência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento (o iniciador, ou *primer*, em inglês) já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para o início da síntese. Os iniciadores definem a seqüência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada seqüência DNA com bilhões de cópias (MULLIS, 1990).

Utilização da técnica da PCR

O desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA utilizando a PCR abriu enormes perspectivas para a análise de genes, diagnóstico de doenças genéticas e detecção de agentes infecciosos como citomegalovírus, vírus da hepatite B e C, herpes vírus simples, vírus da rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Chlamydia trachomatis*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Pneumocistis carinii*.

O avanço da ciência sobre a compreensão dos genes trouxe para a rotina do laboratório de genética, ferramentas que permitem o diagnóstico em nível molecular. Na linha das doenças genéticas, o permanente desenvolvimento de novos protocolos tem permitido a pesquisa de pequenas alterações na seqüência de DNA, como, por exemplo, na fibrose cística.

Outras aplicações especialmente úteis para a PCR é a clonagem de um determinado fragmento de DNA, que pode ser um gene e o conhecimento do DNA codificante (cDNA) obtido a partir da molécula de RNA, o que permite o estudo da expressão de genes.

Finalmente, a PCR tem um gran-

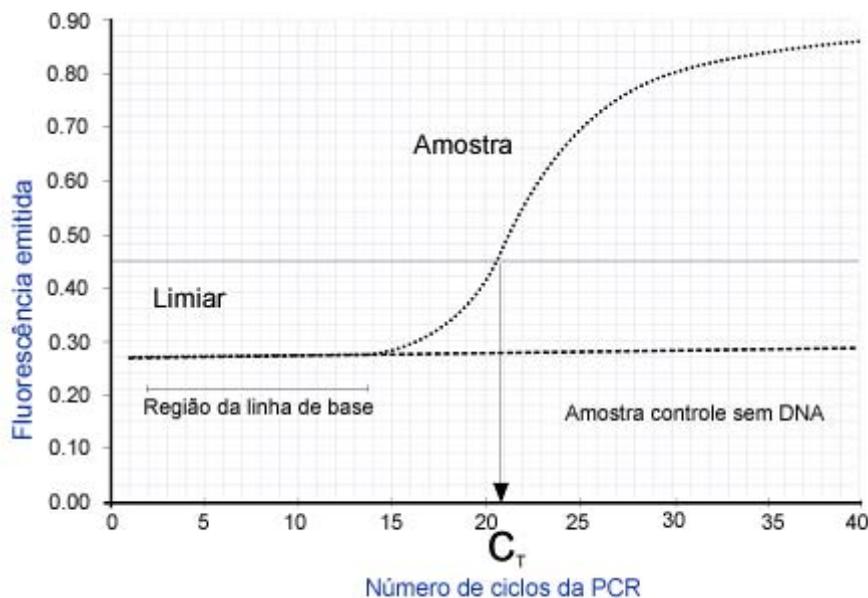


Figura 1: Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. C_T – Cycle Threshold. A amplificação mostra 3 fases distintas (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos.

de potencial na medicina forense. Sua sensibilidade torna possível utilizar uma amostra bastante pequena (traços mínimos de sangue e tecidos que poderiam conter os restos de somente uma única célula) e ainda se obter uma “impressão digital de DNA” da pessoa da qual a amostra foi coletada, podendo assim fazer comparações com aqueles obtidos de vítimas e/ou suspeitos de casos de infração penal (SILVA & PASSOS, 2002).

O genoma de cada ser humano (exceto dos gêmeos idênticos) é diferente nas regiões polimórficas, sendo possível amplificar essas regiões. Assim, a pesquisa de STRs (*Small Tandem Repeats*) através da PCR, utilizando um conjunto de iniciadores que cobrem estas partes altamente variáveis do genoma humano, pode gerar uma impressão digital característica de DNA para cada indivíduo (BRUCE, 1999).

PCR em Tempo Real

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que

detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T) (Figura 1). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência.

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (<http://www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/WhatIs.asp>, 2004). Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR® Green e TaqMan®.

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação. Estas máquinas, disponíveis de diversos fabricantes, diferem na capacidade da amostra (96-poços padrão, processamento de poucas amostras ou requerem tubos capilares de vidro especializados), no método da excitação (lasers ou fontes claras do espectro largo com filtros ajustáveis), e na sensibilidade total. Há também diferenças nos softwares para o processamento dos dados (<http://www.ambion.com/techlib/tn/81/>

[813.html](#), 2004).

Fluoróforos

Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em Tempo Real utilizam estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos.

SYBR® Green

O SYBR® Green se liga entre a fita dupla de DNA (Figura 2) e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens da utilização do SYBR® Green são: baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo. O SYBR® Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena. Entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA.

No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR® Green. As moléculas não-ligadas do SYBR® Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise de computador. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do SYBR® Green podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é

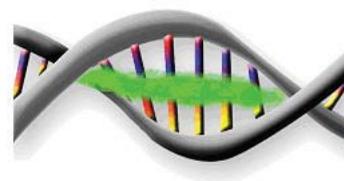


Figura 2: Molécula de SYBR Green® entre a fita dupla de DNA.

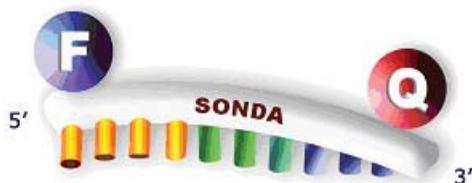


Figura 3: Ilustração de uma sonda TaqMan®. F – Fluoróforo e Q – quencher.

monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do SYBR® Green são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (VITZTHUM *et al.*, 1999).

As duas alternativas mais utilizadas além do SYBR® Green são TaqMan® e *Molecular Beacons*, ambos com capacidade de hibridização gerando transferência de energia para quantificação.

4.1.2. TaqMan®

TaqMan® é uma sonda (fragmen-

to de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a

dissipa na forma de luz ou calor) como mostrado na Figura 3. Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'→3' da *Taq* DNA polimerase.

Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan® hibridiza com a seqüência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo da amplificação a sonda TaqMan® é degradada devido à atividade exonuclease 5'→3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência (Figura 4). Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas

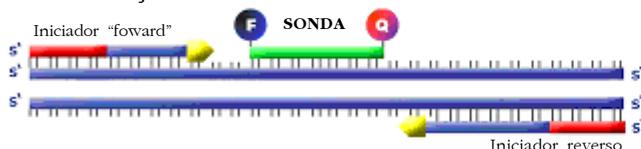
quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da seqüência alvo é estabelecida (HEID *et al.*, 1996).

A reação com a TaqMan® é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de seqüências específicas (HOLLAND *et al.*, 1991).

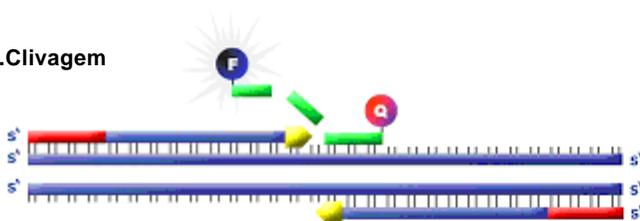
Molecular beacons

Molecular beacons são oligonucleotídeos usados como sondas de fita simples que formam uma estrutura secundária entre as extremidades 5' e 3', chamada de *haste-e-loop*. O loop contém uma seqüência que é complementar à seqüência-alvo e a haste é formada pelo anelamento das seqüências complementares que estão localizadas nas extremidades. Um fluoróforo é covalentemente ligado no final de uma extremidade e um *quencher* é covalentemente ligado na outra extremidade (Figura 5A). Os oligonucleotídeos *molecular beacons* não emitem fluorescência quando estão livres em solução. Entretanto, quando hibridizam com a fita de DNA contendo a seqüência-alvo, as sondas assumem uma mudança conformacional tornando-a capaz de emitir fluorescência (Figura 5B).

1. Polimerização

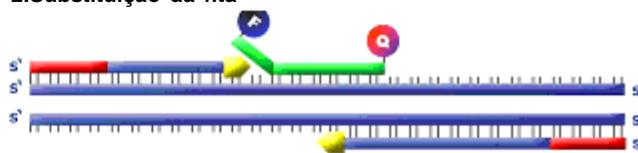


3. Clivagem



F = Fluoróforo
Q = Quencher

2. Substituição da fita



4. Polimerização finalizada

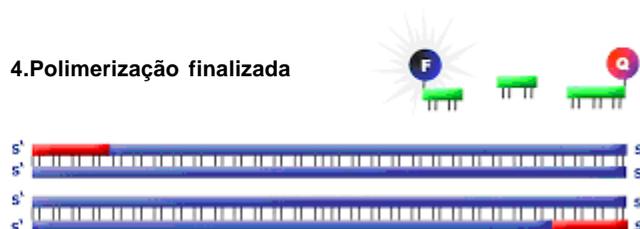


Figura 4: PCR em tempo real com sonda TaqMan®.

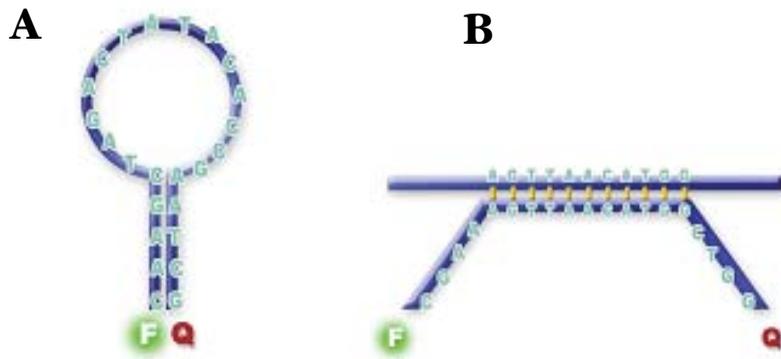


Figura 5: (A) Oligonucleotídeo usado como sonda é sintetizado de modo a possibilitar a formação de uma estrutura secundária nas extremidades 5'e 3'. (B) Toda fita nova formada durante a amplificação é alvo para o anelamento do *molecular beacon*, aumentando a intensidade da fluorescência.

Na ausência de alvos, o oligonucleotídeo não emite fluorescência, pois o *quencher* está próximo do fluoróforo captando energia. No momento em que o *molecular beacon* encontra o seu alvo, ocorre a hibridização resultando em uma reorganização conformacional, onde o fluoróforo se dissocia do *quencher*, emitindo assim a fluorescência.

Os *molecular beacons* podem ser sintetizados com diferentes cores de fluoróforos, possibilitando ensaios que necessitam detectar diferentes alvos em uma mesma reação. São altamente específicos permitindo discriminar seqüências-alvo que diferem entre si por apenas um nucleotídeo substituído. São sondas ideais, no ensaio diagnóstico para identificação genética, detecção de SNP (*single nucleotide polymorfism*) e aplicações farmacogenéticas (KRAMER, 2004).

Utilização da PCR em Tempo Real

O sistema de quantificação em tempo real tem as seguintes aplicações:

- Identificação de alelos em DNA genômico;
- Análise de seqüências virais, bacterianas ou de protozoários a partir de várias fontes;
- Análise de patógenos em alimentos;
- Análise de produtos transgênicos;

A aplicação em diagnósticos, como a detecção de patógenos, ou doenças, torna-se interessante uma vez que esta técnica permite a quantificação e

rapidez do resultado, pois não mais requer a detecção em gel de eletroforese, necessário na análise da PCR.

Conclusão

As técnicas associadas à biologia molecular e à engenharia genética progrediram muito desde a década de 50, quando o DNA teve sua estrutura descrita. O avanço foi tão grande que em pouco tempo, pouco mais de 50 anos, suas aplicações práticas já permeiam o nosso cotidiano.

A descoberta da PCR faz parte desse progresso, sendo que o mais novo avanço tecnológico partiu da própria PCR, gerando a PCR em Tempo Real, que permite a quantificação das amostras amplificadas, sendo de grande relevância para diagnósticos de patógenos e doenças genéticas. Dentre as vantagens, esta técnica em relação à PCR qualitativa estão a facilidade na quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação.

Referências bibliográficas

BRUCE, A., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RASS, M., ROBERTS, K & WALTER, P. Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. p.

DYES & FLUORESCENCE DETECTION CHEMISTRY IN

qPCR. Disponível em: <http://www.gene-quantification.info/>. Acesso em: 27 maio 2004.

HEID, C.A, STEVENS, J., LIVAK, K.J. & WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6(10)**:986-94, 1996.

HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R. & GELFLAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**: 7276-7280, 1991.

KRAMER, F.R. Molecular Beacons. Disponível em: <<http://www.molecular-beacons.org/default.htm>>. Acesso em: 27 maio 2004.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* **48(8)**: 579-82, 1990.

SILVA, L.A.F. & PASSOS, N.S. DNA Forense. Coleta de amostras biológicas em locais de crimes para estudo do DNA. Maceió: edUFAL, 2002. 84 p.

REAL-TIME PCR GOES PRIME TIME. Disponível em: <<http://www.ambion.com/techlib/tn/81/813.html>>. Acesso em: 15 fevereiro 2004.

VITZTHUM, F., GEIGER, G., BISSWANGER, H., BRUNNER, H. & BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem.* **276(1)**:59-64, 1999.

WHAT IS REAL-TIME QUANTITATIVE PCR? Disponível em: <<http://www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/WhatIs.asp>>. Acesso em: 15 fevereiro 2004.