

DEDALUS - Acervo - FZEA



1 1 4 0 0 0 2 7 2 9 7

# Introdução às **técnicas** de **PCR** convencional, em tempo real e digital

**Tiago Campos Pereira**  
(organizador)

Volume 5

**SBG**

Sociedade  
Brasileira de  
Genética

Ribeirão Preto, 2018

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO  
FZEA/USP

© 2018

Todos os direitos desta edição são reservados à Sociedade Brasileira de Genética.

### Comissão Editorial Sociedade Brasileira de Genética

Editor

Tiago Campos Pereira  
*Universidade de São Paulo*

Comissão Editorial

Carlos Frederico Martins Menck  
*Universidade de São Paulo*

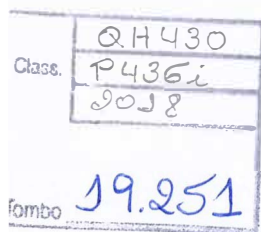
Louis Bernard Klaczko  
*Universidade Estadual de Campinas*

Marcio de Castro Silva-Filho  
*Universidade de São Paulo*

Maria Cátira Bortolini  
*Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

Marcelo dos Santos Guerra Filho  
*Universidade Federal de Pernambuco*

Pedro Manoel Galetti Junior  
*Universidade Federal de São Carlos*



---

Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital / Tiago Campos Pereira (organizador). – Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2018.

232 p.

ISBN 978-85-89265-29-4

1. Genética. 2. Biologia Molecular. 3. Clonagem. 4. Engenharia Genética. 5. Diagnóstico. 6. Medicina. I. Pereira, Tiago Campos, org.

---

Capa, projeto gráfico e diagramação

**editora**  **cubo**  
soluções para o universo acadêmico



Sociedade  
Brasileira de  
Genética

Rua Cap. Adelmio Norberto da Silva, 736  
14025-670 - Ribeirão Preto - SP  
16 3621-8540 | 16 3621-3552

# Princípios da PCR convencional

## Capítulo

## 2

---

Ádamo Davi Diógenes Siena<sup>1,a</sup>, Isabela Ichihara de Barros<sup>1,a</sup>,  
Pedro Augusto Peres<sup>2,a</sup>, Ivana Miranda<sup>3</sup> e Ana Francisca Tamburus<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Depto. de Genética, FMRP, USP, SP – Brasil*

<sup>2</sup> *PPG em Biologia Comparada, FFCLRP, USP, SP – Brasil*

<sup>3</sup> *Centro de Aquicultura, FCAV, UNESP, SP – Brasil*

<sup>a</sup> *Igualmente primeiros autores*

### **Estruturação do Capítulo**

2.1 Introdução

2.2 A duplicação do DNA

2.3 Componentes básicos da reação

2.4 A amplificação *in vitro*

2.5 Tipos de DNA polimerases

2.6 Tipos de termocicladores

2.7 Limitações

## 2.1 Introdução

Neste capítulo, veremos os princípios do processo *in vivo* de duplicação do DNA, utilizado como base para o desenvolvimento de sua versão *in vitro* – a PCR.

## 2.2 A duplicação do DNA

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma biotecnologia que busca mimetizar, em ambiente controlado como o laboratório, um evento que ocorre naturalmente. Esse processo, conhecido como a duplicação da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), é conservado evolutivamente durante bilhões de anos de evolução da vida na Terra. Deste modo, se considerarmos os mais simples seres vivos (como as bactérias) até os seres vivos mais complexos (os eucariontes multicelulares, como animais e plantas), poderemos observar uma similaridade muito grande nos elementos básicos da duplicação do DNA. Em termos gerais, a técnica de PCR utiliza a maquinaria celular responsável pela replicação do material genético, buscando controlar variáveis, como a temperatura, para amplificação de uma sequência-alvo de interesse. Como esse processo é altamente complexo e pode apresentar variações de uma espécie para outra, iremos abordar os aspectos gerais do mesmo.

O DNA é a molécula que carrega a informação genética e precisa ser duplicada antes da divisão celular, para assim possibilitar a formação de duas células-filhas idênticas. Portanto, é prioridade das células transmitir sua sequência genética de modo eficaz e sem alterações. O mecanismo pelo qual isto ocorre é a duplicação do DNA. Estudos do início da década de 1950 sugeriram um modelo estrutural para o DNA e também deram indícios de como este poderia ser duplicado de uma geração para a próxima, transmitindo a informação genética [1]. Mais tarde, na mesma década, foi constatado que a duplicação do DNA ocorre de uma maneira semiconservativa, em que cada uma das fitas de DNA da célula-mãe é utilizada como molde para a síntese de uma nova fita das células-filhas [2]. Estes estudos foram cruciais para a compreensão do processo.

Em nível molecular, o DNA comumente se encontra dimerizado, isto é, duas cadeias de nucleotídeos dispostas em sentido antiparalelo e que espacialmente possuem formato de dupla hélice. Cada fita é um polímero composto por estruturas monoméricas que são os nucleotídeos, os quais, por sua vez, são formados por um grupo fosfato simples, uma pentose (açúcar simples com cinco carbonos em sua composição) e uma base nitrogenada. A pentose do DNA é a desoxirribose e cada um de seus carbonos pode ser identificado pelos números de 1' a 5'. Importante notar que, dentro da mesma fita, os nucleotídeos estão ligados covalentemente por meio de ligações fosfodiéster entre o grupo hidroxila (-OH) na posição 3' de uma pentose e um grupo fosfato na posição 5' da pentose seguinte, e assim sucessivamente. Essa característica cria uma polaridade química na molécula de DNA, em que as extremidades de cada uma das fitas são diferentes. As bases nitrogenadas, por sua vez, podem ser (A) adenina, (T) timina, (C) citosina ou (G) guanina. São as interações entre bases nitrogenadas que permitem a formação das ligações de hidrogênio que mantêm as duas fitas unidas. Essa interação ocorre de modo específico e com diferentes forças de atração, nas quais A está pareado com T (interação mais fraca, com duas ligações de hidrogênio) e C está pareado com G (interação mais forte, com três ligações de hidrogênio). É importante observar que o grupo fosfato e a pentose formam uma espécie de “espinha dorsal” e que a sequência das bases nitrogenadas corresponde à informação genética [3-5].

Para que esse processo ocorra de modo eficaz e fidedigno, ele é orquestrado por um complexo conjunto de enzimas. A região em que ocorre a duplicação do DNA possui um formato de “Y” e é conhecida como forquilha de replicação (Figura 2.1). Assim, para que o processo possa ser iniciado, é necessário inicialmente separar as duas fitas do DNA que irão servir de modelo para síntese. Essa tarefa é das enzimas DNA helicases, que conseguem separar fitas de DNA por rompimento das ligações de hidrogênio a uma taxa de 1.000 pb por segundo [3]. A separação das fitas é auxiliada e mantida por proteínas que se ligam ao DNA fita simples (*single-strand DNA-binding proteins* – *SSB proteins*). O alongamento da fita de DNA é realizado pelas mais conhecidas enzimas desse processo: as DNA polimerases. Essas enzimas podem realizar funções adicionais além da polimerização de DNA no sentido 5'→3'. Por exemplo, a DNA polimerase I (DNA pol. I) derivada de *E. coli* possui: (i) atividade polimerásica, responsável pelo alongamento da cadeia no sentido 5'→3'; (ii) atividade exonucleásica, com a qual degrada DNA (de cadeia dupla) também no sentido 5'→3'; e (iii) atividade exonucleásica, que remove bases incompatíveis no sentido 3'→5' [4]. Deste modo, a forquilha de replicação segue separando a dupla fita e a DNA pol. I “desliza” sobre a fita molde (no sentido 5'→3'), sintetizando uma fita nova complementar. Contudo, a DNA pol. I necessita de uma extremidade 3' OH livre preexistente, a partir da qual ela inicia a polimerização; isto é, ela precisa de um *primer*. A função de criar este *primer* é da enzima DNA *primase*, a qual adiciona uma pequena sequência de oligonucleotídeos de RNA (~10-30 nt) específicos para uma região do DNA, os quais permitem o alongamento da nova cadeia [3-6].

Em geral, pelo fato de as DNA polimerases só conseguirem sintetizar o DNA no sentido 5'→3', uma das fitas é replicada continuamente (*leading strand*) e a outra, de modo descontínuo (*lagging strand*). Esta última é replicada em pequenos trechos conhecidos como fragmentos de Okazaki. Deste modo, cada novo pequeno fragmento de Okazaki requer um novo *primer*, diferentemente da *leading strand* que só requer um *primer* inicial [7]. É importante ressaltar que, após esse processo descontínuo de síntese terminar, um sistema de reparo de DNA age rapidamente para remover os *primers* de RNA e substituí-los por uma sequência de DNA. Por fim, uma enzima conhecida como DNA ligase realiza a junção dos trechos de DNA recém-sintetizados para convertê-los em uma única fita contínua [3-5].

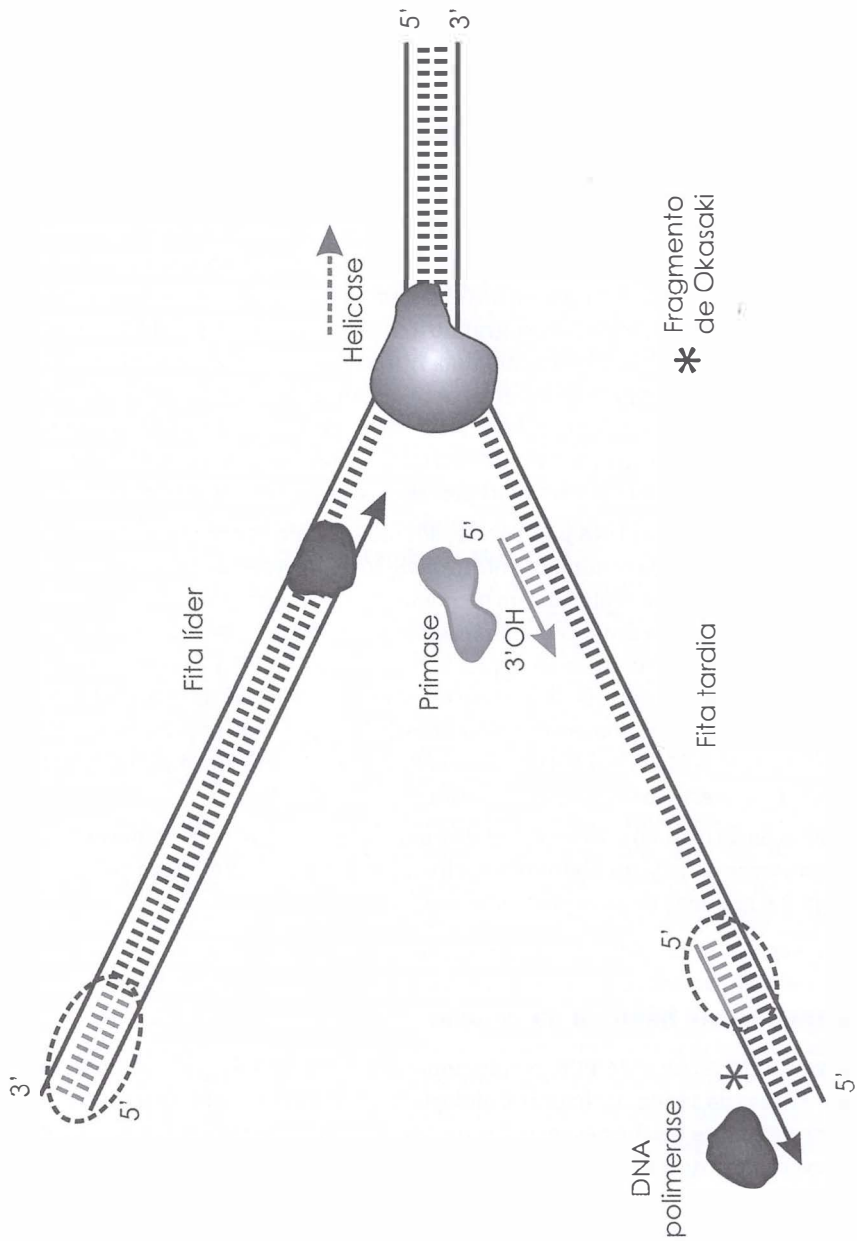
A duplicação do DNA no interior da célula é um processo muito mais amplo e complexo. Contudo, os mecanismos básicos abordados neste tópico são suficientes para compreender a técnica da PCR e algumas de suas particularidades.

## 2.3 Componentes básicos da reação

O advento da técnica de PCR revolucionou a área da biologia molecular, sendo relevante para áreas da saúde, agricultura, biologia, farmácia, perícia forense, entre outras. Tal método permite que trechos específicos do DNA (e.g. genes, sequências reguladoras, regiões supervariáveis) de um organismo sejam **amplificados geometricamente**<sup>1</sup>. A PCR, de

<sup>1</sup> Frequentemente, se diz que a PCR promove uma ‘amplificação exponencial’ devido ao grande número de moléculas que se obtêm ao final do processo e, principalmente, à função  $a \cdot 2^n$  associada à técnica. Trata-se de uma função que permite calcular o número de moléculas obtidas ao final de uma PCR ( $a$  = número inicial de moléculas de DNA-alvo;  $n$  = número de ciclos da PCR). Contudo, o caráter exponencial desta função não implica dizer que a *amplificação em si seja exponencial*. Uma vez que o número de moléculas dobra a cada ciclo, provavelmente o mais correto é dizer “amplificação geométrica”. Contudo, a expressão “amplificação exponencial” já está disseminada na literatura científica.





**Figura 2.1.** A forquilha de replicação. A enzima Primase catalisa a síntese de uma pequena molécula de RNA (cinza-claro), a qual apresenta uma hidroxila na 3'. A enzima DNA polimerase se utiliza desta extremidade 3' OH livre para estender (sintetizar) o DNA complementar (sintetizar) à fita molde. A síntese na fita líder (*leading strand*) é feita de maneira contínua; na fita tardia (*lagging strand*), é de maneira descontínua, contendo vários fragmentos de Okasaki. Círculo tracejado: primer de RNA. Imagem: Pereira, TC.

maneira simplificada, é o procedimento *in vitro* capaz de gerar cópias de partes do genoma segundo os mesmos princípios do processo natural de replicação do DNA *in vivo*.

Os componentes básicos da PCR são, geralmente: água, solução tampão, DNA molde, iniciadores (*primers*), nucleosídeos trifosfatados (dNTPs), íon  $Mg^{2+}$  e DNA polimerase (e.g., *Taq*). Entretanto, é importante frisar que os passos de padronização e otimização podem variar, eventualmente ocorrendo a adição de componentes extras. Aqui, iremos utilizar como referências básicas os componentes apresentados previamente.

**Água.** As propriedades físico-químicas da água no estado líquido permitem que substâncias polares ou iônicas formem soluções aquosas. Em procedimentos tão sensíveis quanto a PCR, deve-se sempre utilizar água ultrapura (*i.e.*, deionizada, livre de nucleases e outros contaminantes).

**Solução tampão.** A função da solução tampão é evitar a variação do potencial hidrogeniônico (pH) de uma solução, fazendo com que este permaneça estável mesmo com a adição de substâncias de caráter ácido ou básico. O tampão comumente utilizado para a PCR é o Tris 10 mM, o qual apresenta um pH entre 8,3 e 8,8 a 20°C. Geralmente, a solução tampão adequada é enviada pela empresa fornecedora junto com a DNA polimerase. Com o aumento da temperatura durante os ciclos de amplificação da PCR, o pH diminui para valores próximos a 7,4 o qual é ideal para a atividade da DNA polimerase na temperatura de 72°C.

**DNA molde.** O DNA molde (alvo ou *template*) é aquele que será amplificado durante a PCR. Ele pode ser de diversas naturezas: fita simples ou dupla; genômico, plasmidial, mitocondrial ou de cloroplasto; viral ou celular, de amostras biológicas ou do ambiente. Adicionalmente, este DNA pode ser extraído diretamente de uma fonte (e.g., tecido muscular ou solo) ou pode ser gerado indiretamente a partir de uma amostra de RNA (o qual é subsequentemente convertido em cDNA – DNA complementar).

**Iniciadores (*primers*).** Os iniciadores são sequências curtas de nucleotídeos (geralmente 18-24 nt) que fornecem as extremidades 3' OH livres necessárias para que a DNA polimerase inicie o processo de replicação do DNA molde. Além da importância para que a síntese do DNA se inicie, são os *primers* que determinam a sequência do DNA que será amplificada. Toda PCR utiliza um par de iniciadores (*Forward* e *Reverse*)<sup>2</sup> que irão se ligar ao DNA molde durante a fase de anelamento, por pareamento de bases complementares.

**Desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs).** Os dNTPs são a matéria-prima da síntese do DNA durante a PCR. Em essência, há quatro tipos de dNTP: dATP (desoxiAdenosina trifosfatada), dCTP (desoxiCitidina trifosfatada), dGTP (desoxiGuanosina trifosfatada), dTTP (desoxiTimidina trifosfatada). A preparação da PCR utiliza uma solução que contém os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatados em igual concentração, o chamado 'dNTP mix'.

**Íon  $Mg^{2+}$ .** O cátion divalente de magnésio é incorporado na PCR na forma de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ). O magnésio é um importante cofator da reação, pois atua sobre a atividade da *Taq* polimerase.

**DNA Polimerase.** A enzima mais comumente utilizada durante a PCR é a DNA polimerase produzida pela bactéria *Thermus aquaticus* (*Taq*). Este organismo habita fontes termais e produz um tipo de DNA polimerase bastante estável ao calor e que tem atividade ótima em temperaturas em torno de 80°C. Por ser termoestável, a *Taq* mantém-se ativa durante todos os ciclos da PCR, mesmo com o aquecimento necessário para a desnaturação do DNA molde.

<sup>2</sup> *Forward*, também denominado Direto ou Senso. *Reverse*, também denominado Reverso ou Antissenso.

Estes são os componentes básicos para uma PCR. As concentrações podem variar entre os diferentes protocolos utilizados. A Tabela 2.1 apresenta um exemplo de uma solução para PCR.

**Tabela 2.1.** Composição e preparação de uma PCR representativa\*.

Componente	Concentração da solução de estoque	Volume utilizado	Concentração final (na PCR)
Água ultrapura	-	29,75 µl	-
Solução tampão	5 X	10 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub> **	25 mM	3,0 µl	1,5 mM
dNTP mix	10 mM***	1 µl	0,2 mM***
Iniciador Direto	10 µM	2,5 µl	0,5 µM
Iniciador Reverso	10 µM	2,5 µl	0,5 µM
DNA molde	250 ng/µl	1 µl	5 ng/µl
Taq DNA polimerase	5 U/µL	0,25 µl	1,25 U/50µl
Volume total = 50 µL <sup>a</sup>			

\*As concentrações de cada componente podem variar para otimização do processo. \*\*Algumas soluções tampão já contêm MgCl<sub>2</sub> em sua constituição, dispensando assim a adição deste componente. \*\*\*Cada um dos quatro nucleosídeos trifosfatados está nesta concentração. <sup>a</sup> O volume da reação pode ser otimizado (reduzido ou elevado).

## 2.4 A amplificação *in vitro*

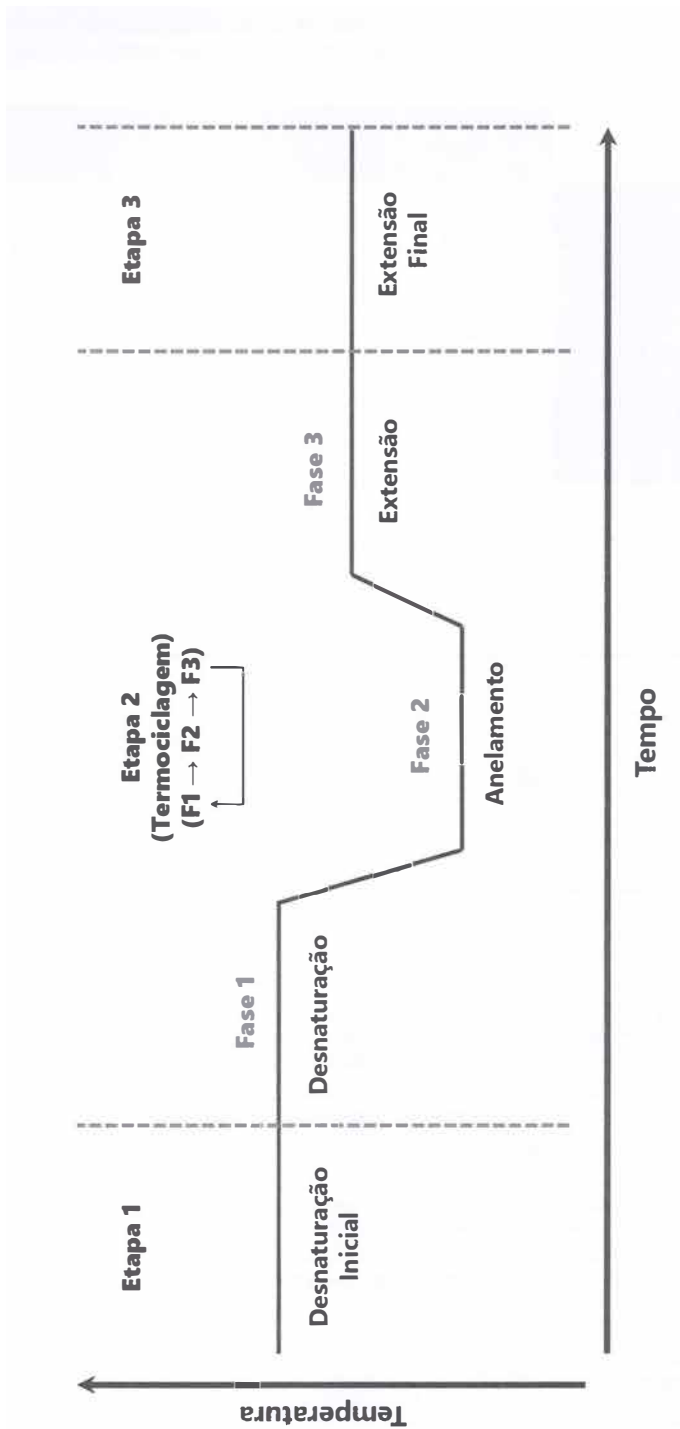
A PCR consiste em amplificar cópias de DNA *in vitro*, usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA. A PCR é composta por três *etapas*: (a) **desnaturação inicial**, (b) **termociclagem** e (c) **extensão final** (Figura 2.2).

Durante a primeira *etapa* de desnaturação (ou fusão) inicial, as duas cadeias do DNA-alvo são separadas por calor (95°C por 5 minutos). Esta etapa visa garantir que toda a extensão da dupla-hélice seja desfeita, papel este executado *in vivo* pela DNA helicase.

A segunda *etapa* (termociclagem) envolve a repetição de um **ciclo** composto por três *fases*: (i) a **desnaturação** a 95°C por 30 segundos, (ii) o **anelamento** (ou pareamento) a uma temperatura de ~57°C<sup>3</sup> durante 30 segundos e (iii) a **extensão** (ou alongamento) a 72°C por um minuto. Durante a desnaturação, as duas cadeias de DNA são separadas, o que permitirá o acesso pelos *primers* na fase seguinte. Isto é, durante o anelamento, que tipicamente ocorre por volta dos 57°C, a redução da temperatura possibilita que os dois *primers* venham a se parear às suas respectivas cadeias de DNA-alvo. Isto, por sua vez, fornece as extremidades 3' OH livres necessárias para a extensão da cadeia, mediada pela DNA polimerase, cuja atividade ótima ocorre a 72°C (extensão). Em média, a *Taq* incorpora 1.000 nt por minuto. Este ciclo é tipicamente repetido por 30-35 vezes, sendo que cada uma das novas fitas de DNA estendidas a partir dos iniciadores serve como molde para a síntese de uma nova fita no ciclo seguinte. Isto faz com que, a cada ciclo, o número de moléculas sintetizadas dobre; assim, a PCR apresenta uma **amplificação geométrica** (Tabela 2.2) (Figura 2.3).

<sup>3</sup> Geralmente, a temperatura de anelamento (T<sub>a</sub>) é cinco graus inferior à temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) dos *primers*.

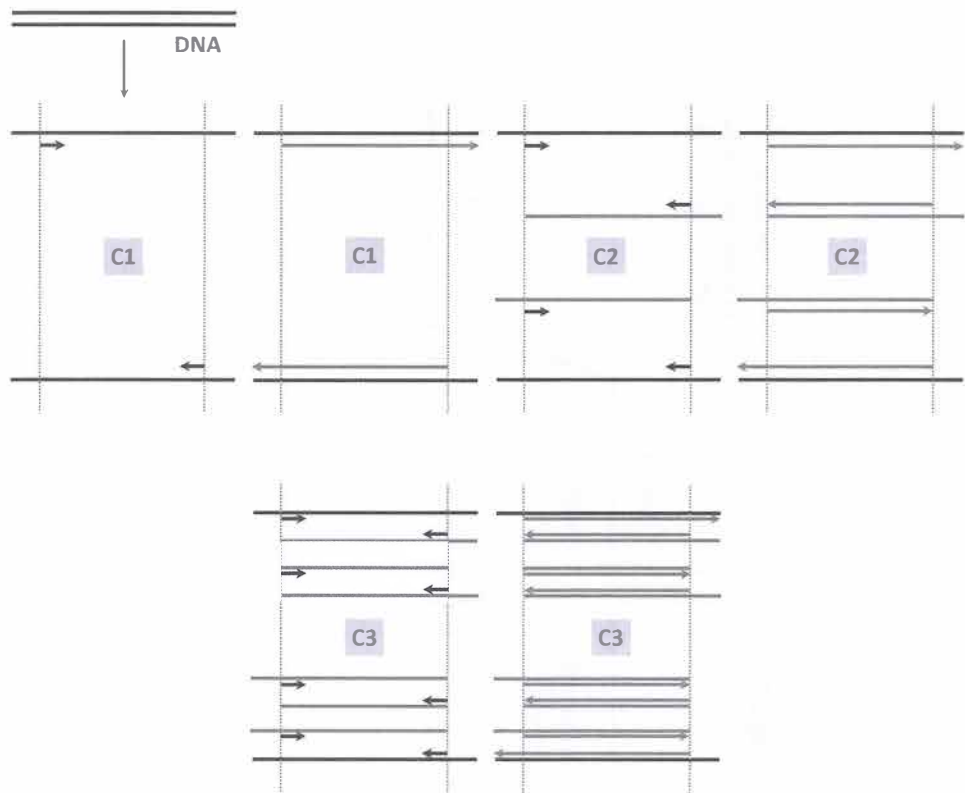




**Figura 2.2.** Aspecto geral da PCR, composta por três etapas principais. A etapa 2 é constituída de três fases (F1, F2 e F3) e é repetida de 25 a 35 vezes (termociclagem), resultando no aumento geométrico da região amplificada. Imagem: Pereira, TC.

**Tabela 2.2.** Amplificação promovida pela PCR. O número total de moléculas presentes na reação pode ser calculado pela fórmula  $a \times 2^n$  ( $a$  = número de moléculas-alvo presentes no início da reação;  $n$  = número de ciclos, considerando uma eficiência de 100%).

		Quantidade inicial de moléculas-alvo na reação		
		1	5	300
Quantidade total de moléculas na reação após o ciclo	1	2	10	600
	2	4	20	1200
	3	8	40	2400
	4	16	80	4800
	5	32	160	9600
	25	33.554.432	167.772.160	~10 bilhões
	35	~34,3 bilhões	~172 bilhões	~10 trilhões
	"n"	$a \cdot 2^n$	$a \cdot 2^n$	$a \cdot 2^n$



**Figura 2.3.** Dinâmica da amplificação do DNA-alvo durante a PCR. Em cada ciclo, a dupla-fita é aberta (desnaturação), os *primers* (setas curtas pretas) se pareiam à região-alvo delimitada pelas linhas pontilhadas (anelamento) e são estendidos pela DNA polimerase (extensão; setas maiores cinzas). Note que quando a enzima (não representada) polimeriza a partir do DNA molde maior (linhas pretas), a síntese vai para além da região delimitada (pois não há nada que impeça a polimerase). Contudo, ao longo do processo, o amplicon com tamanho definido (que se encontra dentro da região delimitada) será amplificado geometricamente (*i.e.*, duplicado a cada ciclo), ao passo que os fragmentos maiores serão amplificados linearmente (*i.e.*, duas novas 'cadeias longas' sintetizadas por ciclo). Como a *amplificação linear* é desprezível quando comparada à *geométrica*, é dito simplesmente que a PCR apresenta uma *amplificação geométrica* (ou exponencial). C: ciclos. Imagem: Pereira, TC.

Ao final da termociclagem, há a terceira etapa de **extensão final**, que ocorre a 72°C por 10 minutos, objetivando a finalização da polimerização do *amplicon* (= produto da PCR).

## 2.5 Tipos de DNA polimerases

Dentre os componentes da PCR, o mais essencial é uma enzima DNA polimerase com estabilidade térmica, que seja capaz de suportar a alta temperatura necessária para desnaturar a dupla-fita de DNA. De todas, a *Taq* DNA polimerase, obtida da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, é a mais representativa [8]. Diferente do fragmento *Klenow* de *Escherichia coli*, primeiramente utilizado nas reações de PCR, que era termolábil e precisava ser adicionado durante cada ciclo, a *Taq* é relativamente pouco afetada pela termociclagem, o que tornou o procedimento mais simples, específico, e permitiu melhorar a performance da reação [9]. Pouco tempo após o início da utilização da *Taq*, clonou-se seu gene (*pol*) para expressão em *E. coli*, o que gerou uma fonte prontamente utilizável da enzima recombinante [10]. Tempos depois, foi desenvolvido um sistema de expressão plasmidial de alto nível do gene *pol*, permitindo então a produção de *Taq* em escala industrial [11].

As DNA polimerases podem ser separadas em, ao menos, cinco famílias, baseando-se em comparações de suas seqüências de aminoácidos e estruturas. Destas, a mais bem estudada é a família A, ou DNA polimerase I (pol I), que inclui os fragmentos *Klenow*, *T. aquaticus* DNA polimerase e as RNA e DNA polimerases T7. Outra família bastante estudada é a família B, ou DNA polimerase  $\alpha$  (pol  $\alpha$ ), que inclui todas as DNA polimerases de replicação eucariótica e as polimerases dos fagos T4 e RB69 [12]. As enzimas utilizadas atualmente na biologia molecular pertencem às famílias A e B. As *Taq* polimerases da primeira família possuem uma grande habilidade de extensão e realizam uma amplificação eficiente do DNA-alvo, porém sua fidelidade é baixa e não possuem atividade exonucleásica 3'→5'. Por outro lado, as polimerases da família B realizam uma amplificação bastante acurada, entretanto a sua taxa de extensão é baixa, o que necessita de um longo tempo para cada ciclo do PCR [8,13].

A fidelidade de uma DNA polimerase está relacionada com a sua habilidade de inserir um nucleotídeo correto em detrimento de um errado. Assim, as enzimas podem ser categorizadas como de alta fidelidade (*high fidelity*) e de baixa fidelidade (*low fidelity*) [14]. As DNA polimerases de alta fidelidade possuem atividade exonucleásica 3'→5' (também conhecida como atividade *proofreading*) e, por isso, introduzem poucos erros durante a amplificação [15]. Dentre estas, encontram-se a *Pfu* (isolada da bactéria *Pyrococcus furiosus*) [16], a *Vent* (isolada da *Thermococcus litoralis*) [17], a *Deep Vent* (isolada da cepa GB-D de *Pyrococcus*) [18] e também a KOD DNA polimerase, que apresenta processividade e taxa de extensão maiores que as enzimas *Pfu*, *Deep Vent* e *Taq* [19]. A alta fidelidade dessas enzimas parece estar correlacionada com a falta ou a pouca atividade *terminal transferase* – a capacidade de catalisar a adição de nucleotídeos na extremidade 3' na ausência de DNA molde –, que se apresenta diferente da *Taq*, cuja atividade é alta [20].

As DNA polimerases de baixa fidelidade, por outro lado, são também conhecidas como enzimas de síntese translesão e não atuam de forma muito eficiente, gerando mutações com alta frequência [21]. Elas podem ser agrupadas em três famílias, que incluem as DNA polimerases: transferase desoxinucleotidil terminal (TdT),  $\beta$ ,  $\zeta$ ,  $\kappa$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$  e Rev1. Dessas, a Pol $\eta$ , a mais bem caracterizada, é capaz de suportar a síntese através de um amplo espectro de danos no DNA, incluindo dímeros de pirimidina ciclobutano induzidos por radiação

ultravioleta [15]. Já a DNA polimerase  $\epsilon$  é a que gera o maior número de erros, principalmente quando utilizado um *template* poli(dT), pois ela incorpora preferencialmente uma guanina no pareamento com timina, em vez de uma adenina [22].

Para melhorar a performance da PCR, técnicas de engenharia proteica vêm sendo utilizadas para tornar mais eficiente o desempenho *in vitro* das DNA polimerases [13], resultando em um número cada vez maior de enzimas comercialmente disponíveis (Tabela 2.3). Em 1997, Nilsson e colaboradores descreveram uma nova maneira de ativação mediada por calor da *Taq* polimerase. A enzima era imobilizada em um suporte sólido, do qual somente era liberada em altas temperaturas, permitindo um *hot start* da PCR e uma performance melhorada [23]. Mais recentemente, outras abordagens têm sido utilizadas, como a criação de *Taq* polimerases mutantes sensíveis ao frio, como a *Klentaq*, uma variante com deleção N-terminal, que possui pouca atividade em temperaturas baixas [24]. De forma similar, outros estudos já revelaram mutações que levam ao aumento da habilidade de síntese da enzima [25] e também uma enzima mutante, que é adequada para ampliações alelo-específicas, apresentando maior seletividade e sendo mais adequada para a detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) [26]. Outra aplicação interessante é a criação de *Taq* polimerases resistentes a inibidores de PCR presentes no solo ou no sangue [27], ou mesmo a um vasto espectro de inibidores ambientais [28].

Diante dessa grande variedade de enzimas, é importante levar em consideração o tipo de produto a ser amplificado, na escolha da polimerase mais adequada para o estudo. Em análises de microssatélites, por exemplo, as principais enzimas utilizadas são a *Paq5000 DNA Polymerase* (Stratagene), *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e *Advantage 2 Polymerase Mix* (Clontech) [29]. Além disso, devem ser considerados o tamanho do amplicon, a abundância do gene-alvo e as condições da reação, uma vez que cada enzima possui uma temperatura e tempo de extensão específicos, assim como necessidades diferentes quanto aos outros reagentes, como o magnésio. Outro ponto importante a se considerar é qual a aplicação posterior do produto de PCR, já que, idealmente, aqueles que serão subsequentemente utilizados para clonagem, sequenciamento e expressão não devem conter erros [20].

## 2.6 Tipos de termocicladores

A PCR requer mudanças cíclicas de temperatura para a amplificação de fragmentos específicos de DNA, o que é mediado pelo termociclador, aparelho descrito pela primeira vez por Weier et al. [30], em 1988. Basicamente, este aparelho é uma incubadora de ciclagem reprogramável de temperatura por tempos predefinidos, com uma rápida transferência de calor para a amostra [31]. O termociclador é, então, uma ferramenta central para estudos em genética, podendo ser aplicado em diferentes tipos de experimentos, como sequenciamento, genotipagem, clonagem, validação de resultados de expressão gênica provenientes de microarranjo, quantificação da expressão gênica, detecção de patógenos e análises de microRNAs [32-37]. Para atender tão grande diversidade de procedimentos, existe hoje uma considerável variedade de equipamentos.

Para ensaios de PCR, existem dois principais tipos de termocicladores, atualmente: máquinas de PCR 'convencional' e 'em tempo real'. A escolha do aparelho deve sempre levar em conta as necessidades e aplicações do laboratório. Para o PCR convencional, utiliza-se o termociclador padrão, que deve ser escolhido com base em alguns critérios. Primeiramente,

**Tabela 2.3.** Alguns exemplos de DNA polimerases disponíveis no mercado e suas características básicas.

DNA polimerase	Hot start	Atividade exonucleásica 3'-5'	Tamanho do produto	Fidelidade (vs. Taq)	Empresa
<i>AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase</i>	Sim	Sim	≤ 5 kpb	2x	Thermo Scientific
<i>AmpliTaq Gold® DNA Polymerase</i>	Sim	Não	≤ 5 kpb	1x	Thermo Scientific
<i>DreamTaq DNA Polymerase</i>	Não	Não	≤ 6 kpb	1x	Thermo Scientific
<i>LA Taq DNA Polymerase</i>	Sim	Sim	≤ 48 kpb	6.5x	Clontech
<i>LongAmp® Taq DNA Polymerase</i>	Sim	Sim	≤ 30 kpb	2x	NEB
<i>OneTaq® Hot Start DNA Polymerase</i>	Sim	Sim	< 6 kpb	2x	NEB
<i>Pfu DNA Polymerase</i>	Não	Sim	≤ 5 kpb	4x	Promega; Thermo Scientific; Prospec
<i>Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity</i>	Sim	Sim	≤ 20 kpb	6x	Thermo Scientific
<i>Q5® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	Sim	Sim	≤ 20 kpb	280x	NEB
<i>Taq DNA Polymerase</i>	Não	Não	≤ 5 kpb	1x	Thermo Scientific; NEB; QIAGEN; Merck
<i>Vent® DNA Polymerase</i>	Não	Sim	≤ 6 kpb	5x	NEB
<i>VerityPfu™ DNA Polymerase</i>	Não	Sim	≤ 10 kpb	50x	Tonbo Biosciences



devem ser considerados o número de amostras a serem processadas na rotina do laboratório e a quantidade e o volume das amostras que o bloco de aquecimento da máquina suporta, o que pode variar de 8 a 384 poços. Também é interessante verificar a existência ou não de gradiente térmico, uma vez que este permite múltiplas condições experimentais em uma única corrida. Além disso, a taxa máxima com a qual o bloco de aquecimento pode mudar a temperatura (taxa de rampa) deve ser levada em consideração, já que esta vai determinar quanto tempo o termociclador vai demorar para completar os ciclos. O tipo de tampa do termociclador também deve ser considerado, uma vez que tampas especializadas evitam a evaporação da amostra e a condensação da reação na tampa do tubo de PCR, o que é especialmente importante quando se trabalha com volumes pequenos.

O termociclador convencional não permite medidas de expressão ao mesmo tempo em que a reação ocorre. Dessa forma, o resultado só pode ser visualizado posteriormente, utilizando uma eletroforese em gel, a qual permite a obtenção de um resultado qualitativo pela detecção da presença ou ausência do produto da amplificação [38]. Apesar de ser muito aplicada, a PCR realizada em termocicladores convencionais possui algumas desvantagens, como menor sensibilidade e alto consumo de tempo e de recursos. Além disso, as proporções dos amplicons não refletem necessariamente as reais abundâncias iniciais das sequências, devido a vieses da própria técnica [39]. Apesar disso, o aparelho convencional também pode ser utilizado para 'PCR digital em gotículas' (ddPCR), que é uma técnica muito mais sensível e acurada que a PCR em tempo real.

Atualmente, no mercado de biotecnologia, existem diversos aparelhos termocicladores que foram projetados para realização de ensaios de PCR em tempo real – ou PCR quantitativa (qPCR). Em geral, uma plataforma de qPCR é composta por aquecedor, sensor de temperatura, unidade de excitação e detecção de sinal fluorescente [40], que podem estar divididos em dois principais sistemas: controle de ciclo térmico e detecção de fluorescência [41]. A temperatura e as alterações da taxa de resfriamento são consideradas um dos principais fatores limitantes em sistemas comerciais volumosos, os quais geralmente utilizam resfriador termoelétrico [40,42]. É importante considerar os volumes de reação que o termociclador pode aceitar, o que geralmente depende do tipo de “bloco térmico” do instrumento – que pode variar entre as capacidades de 32, 96 ou 384 poços) [43]. Além disso, é plausível ponderar sobre quantos canais você precisa ou como você pretende identificar seu produto de PCR por fluorescência, mesmo considerando que a maioria das termocicladores de tempo real possuam quatro canais – útil para realizações de PCR *multiplex*, por exemplo [43]. Algo adicional a ser considerado é o quanto o sistema é “amigável” ao usuário para posterior obtenção dos dados, que serão manipulados em programas de análise estatística. Alguns programas de análise de dados são providenciados pelos produtores/fornecedores do próprio equipamento [43].

Devido à existência de diversos termocicladores para qPCR disponíveis no mercado atualmente e suas especificidades, estes não serão abordados individualmente nesta seção introdutória. Para mais detalhes, é possível encontrar em Lee et al. [42] informações reunidas para as principais empresas ou facilmente no site das empresas fornecedoras.

## 2.7 Limitações

Apesar de ser uma técnica revolucionária e extremamente valiosa, a PCR apresenta algumas limitações que devem ser mencionadas, para que o pesquisador possa considerá-las durante seus experimentos.

Por exemplo, um desenho inadequado dos *primers* pode levar a ampliações de produtos inespecíficos, comprometendo fundamentalmente o experimento. Adicionalmente, a PCR é tão sensível e eficiente que é necessária apenas uma única molécula para que a amplificação ocorra; assim, contaminação da reação com DNA não desejado pode comprometer a precisão dos resultados [39,44]. Contaminações são sempre indesejadas e podem ser ainda mais comprometedoras em dadas situações, como na cena de um crime ou mesmo na identificação da espécie-alvo de um estudo.

É necessário mencionar ainda que a visualização dos resultados de uma PCR convencional ocorre por eletroforese via aplicação destes produtos em um gel de agarose ou poliacrilamida acrescido de brometo de etídio, um reagente mutagênico e potencialmente perigoso para o pesquisador [45], apesar de haver divergências [46]. Embora já existam alternativas ao brometo de etídeo (Redsafe® Chembio Ltd, Hertfordshire, UK ou Gelred® Biotium Inc., Hayward, CA, USA), este ainda é amplamente utilizado. A visualização dos resultados em gel por si só tem também suas limitações, pois informa se houve ou não amplificação e qual o tamanho do fragmento, mas não é capaz de precisar numericamente a quantidade ou a qualidade do produto obtido (*i.e.*, trata-se de um método semiquantitativo).

## Referências

- [1] Watson JD et al. Nature 1953. 171(4356):737-8.
- [2] Meselson M et al. Proc Natl Acad Sci USA 1958. 44(7):671-82.
- [3] Alberts B et al., Molecular biology of the cell. Garland Science. 4ª Edição (2002).
- [4] Griffiths AJF et al., An introduction to genetic analysis. W. H. Freeman. 7ª Edição (2000).
- [5] Lodish H et al., Molecular cell biology. W. H. Freeman. 4ª Edição (2000).
- [6] Frick DN et al. Annu Rev Biochem 2001. 70(1):39-80.
- [7] Bell SD. Nature 2006. 439(7076):542-3.
- [8] Ishino S et al. Front Microbiol 2014. 5:465.
- [9] Saiki R et al. Science 1988. 239(4839):487-91.
- [10] Lawyer FC et al. J Biol Chem 1989. 264(11):6427-37.
- [11] Ishino Y et al. J Biochem 1994. 116:1019-24.
- [12] Steitz TA. J Biol Chem 1999. 274(25):17395-8.
- [13] Yamagami T et al. Gene 2016. 576(2):690-5.
- [14] Beard WA et al. Structure 2003. 11(5):489-96.
- [15] Friedberg EC et al. Encycl Life Sci 2005:1-5.
- [16] Lundberg KS et al. Gene 1991. 108(1):1-6.
- [17] Kong H et al. J Biol Chem 1993. 268(3):1965-75.
- [18] Jannasch HW et al. Appl Environ Microbiol 1992. 58(11):3472-81.
- [19] Takagi M et al. Appl Environ Microbiol 1997. 63(11):4504-10.
- [20] Cline J et al. Nucleic Acids Res 1996. 24(18):3546-51.
- [21] Lehmann A. Curr Biol 2003. 13(15):R585.
- [22] Krutyakov VM. Mol Biol 2006. 40(1):1-8.
- [23] Nilsson J et al. Biotechniques 1997. 22(4):744-51.
- [24] Kermekchiev MB et al. Nucleic Acids Res 2003. 31(21):6139-47.
- [25] Yamagami T et al. Front Microbiol 2014. 5:461.
- [26] Drum M et al. PLoS One 2014. 9(5):e96640.
- [27] Kermekchiev MB et al. Nucleic Acids Res 2009. 37(5):e40.
- [28] Baar C et al. Nucleic Acids Res 2011. 39(8):e51.
- [29] Rocha AJ et al. Biotechnol Rep 2014. 3(2):1.
- [30] Weier HU et al. DNA. 7(6):441-7.
- [31] Schoder D et al. Clin Chem 2003. 49(6):960-3.
- [32] Sharkey FH et al. Appl Environ Microbiol 2004. 70(7):3795-806.
- [33] Shirafkan R et al. Trans Inst Meas Contr 2016. 38(3):293-304.
- [34] Morey JS et al. Biol Proced Online 2006. 8(1):175-93.
- [35] Slatko BE. Mol Biotechnol 1996. 6(3):311-22.
- [36] Wang S et al. Appl Environ Microbiol 2007. 73(15):5048-51.
- [37] Aboud M et al. Electrophoresis 2013. 34(11):1539-47.
- [38] Kaltenboeck B et al., Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. (2005). p. 219-59.
- [39] Smith CJ et al. FEMS Microbiol Ecol 2009. 67(1):6-20.
- [40] Jones M et al. J Virol Methods 2014. 202:46-53.
- [41] Ahrberg CD et al. Lab Chip 2016. 16(3):586-92.
- [42] Lee D et al. Biosens Bioelectron 2010. 25(7):1820-4.
- [43] Wong G et al. PLoS One 2015. 10(7):e0131701.
- [44] Hajia. Mod Med Lab J 2017. 1(1):1-6.
- [45] Paiva-Cavalcanti et al. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2010. 16(4):537-42.
- [46] Lowe D. Disponível em: <<http://blogs.sciencemag.org/pipeline/archives/2016/04/18/the-myth-of-ethidium-bromide>>. Acesso em: 16 jul 2018.