

# TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE: PCR

*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em cadeia da polimerase

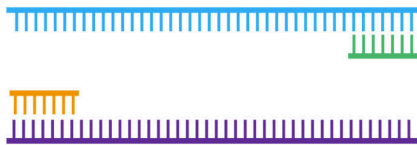
Dupla fita de DNA



Desnaturação



Anelamento



Extensão



## Aula 6

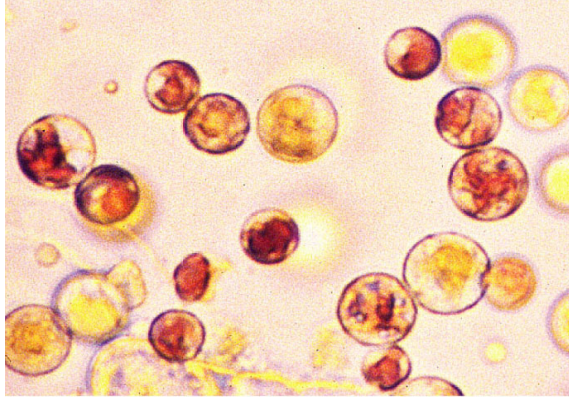
LGN0232 – Genética Molecular

Thalita Peixoto Basso  
Departamento de Genética  
tpbasso@usp.br

- ✓ **Módulo 1:** Introdução
- ✓ **Módulo 2:** Princípio da PCR
- ✓ **Módulo 3:** Aplicações da PCR
- ✓ **Questionários e-disciplinas**

# CLONAGEM MOLECULAR

Dependente de células vivas

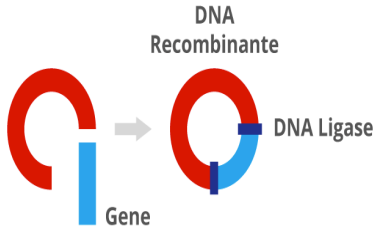


Independente de células vivas (PCR)



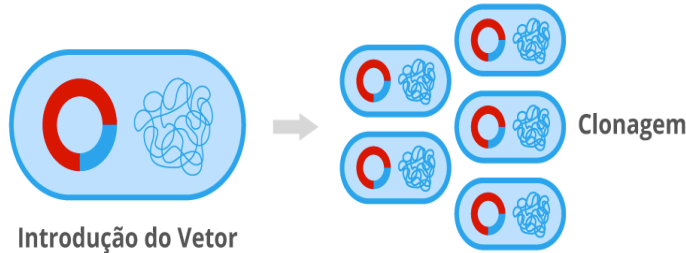
## 1ª etapa

Incorporação do gene de interesse no plasmídeo



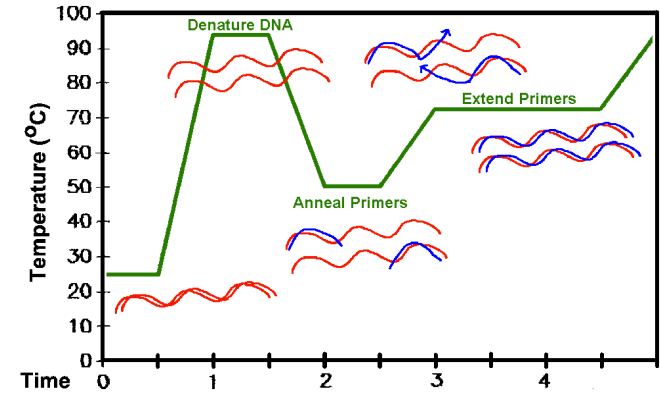
## 2ª etapa

Amplificação da molécula de DNA recombinante *in vivo*



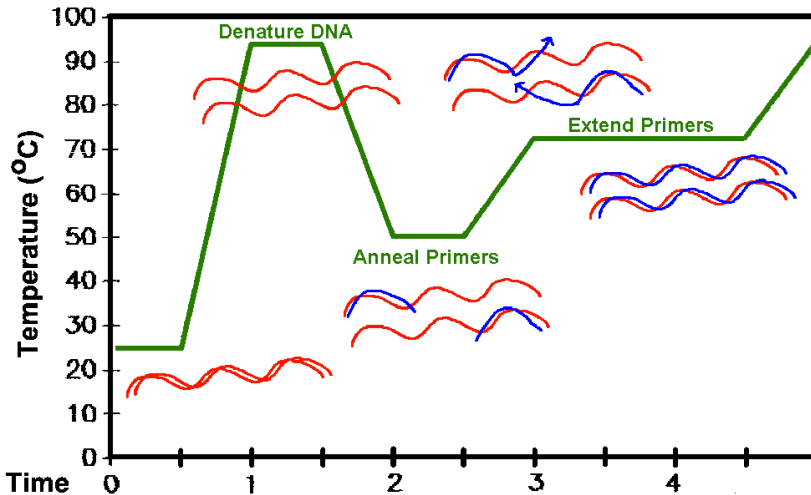
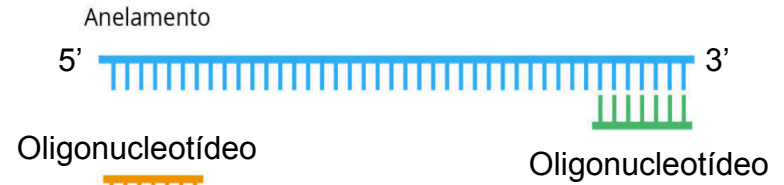
## DNA polimerase

Replicação da sequência de DNA de interesse *in vitro* - PCR



# CLONAGEM MOLECULAR INDEPENDENTE DE CÉLULAS VIVAS

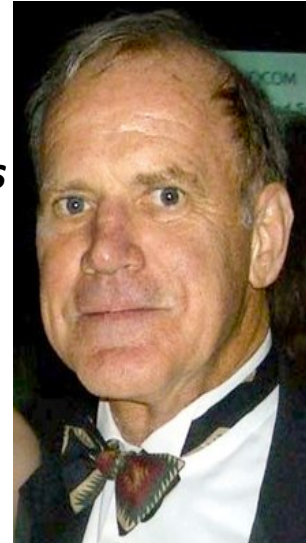
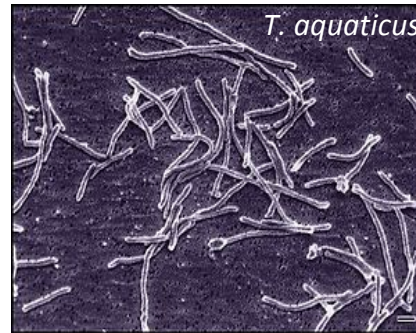
## PCR



# PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

1983: o processo de PCR foi **inventado** por Kary Mullis

1986: Mullis, Saiki e colaboradores isolaram **DNA polimerase de *Thermus aquaticus*** (Taq enzima termoestável), bactéria que tolera altas temperaturas



Kary Mullis em 2006

1993: Kary Mullis foi laureado com o Prêmio Nobel da Química

É um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA *in vitro*, **sem** o uso de um organismo vivo, por exemplo, bactérias (*Escherichia coli*) ou leveduras

Dupla fita de DNA



Desnaturação



Anelamento

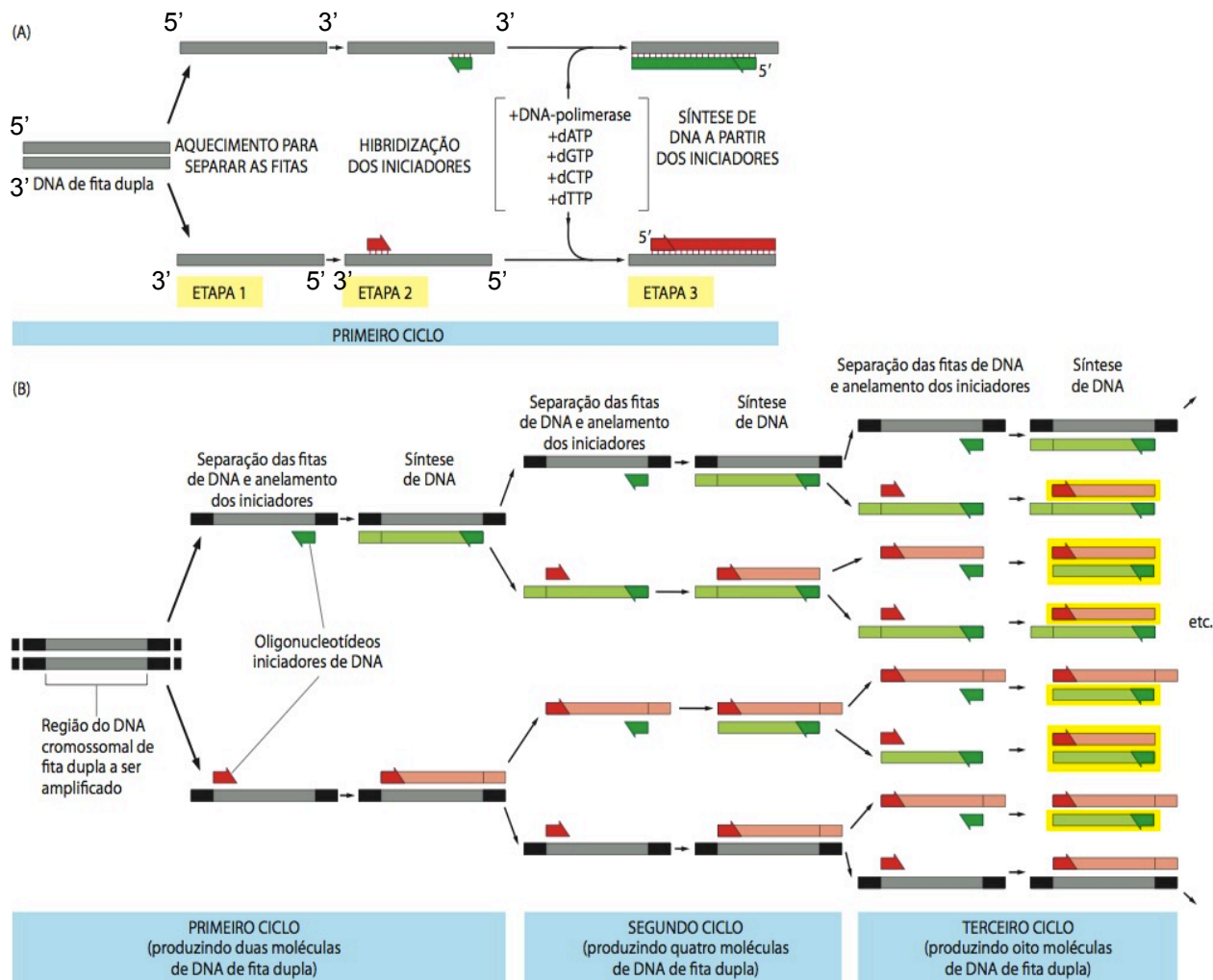


Extensão



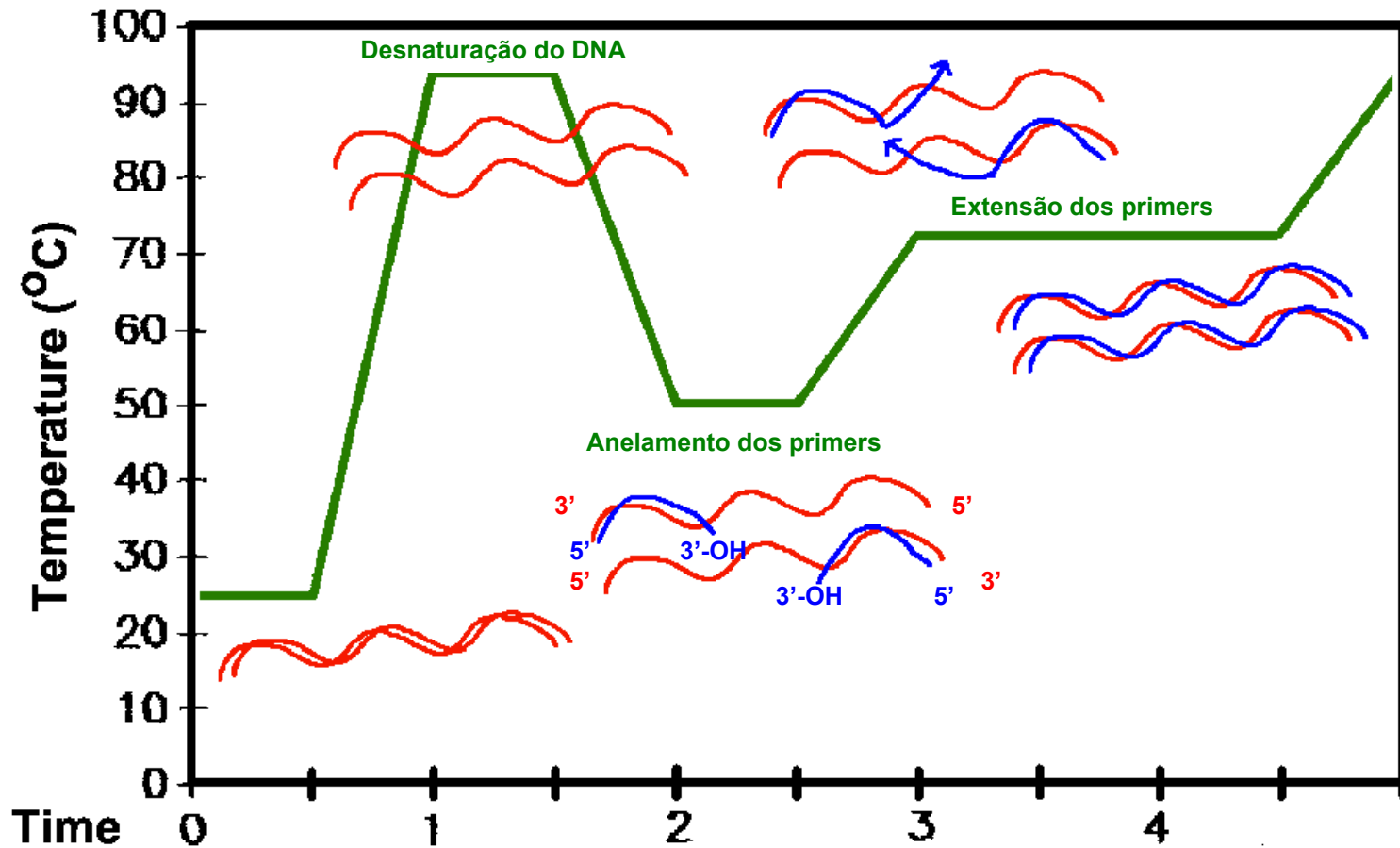
# Clonagem de DNA por PCR

PCR utiliza DNA-polimerase para amplificar seqüências selecionadas de DNA *in vitro*

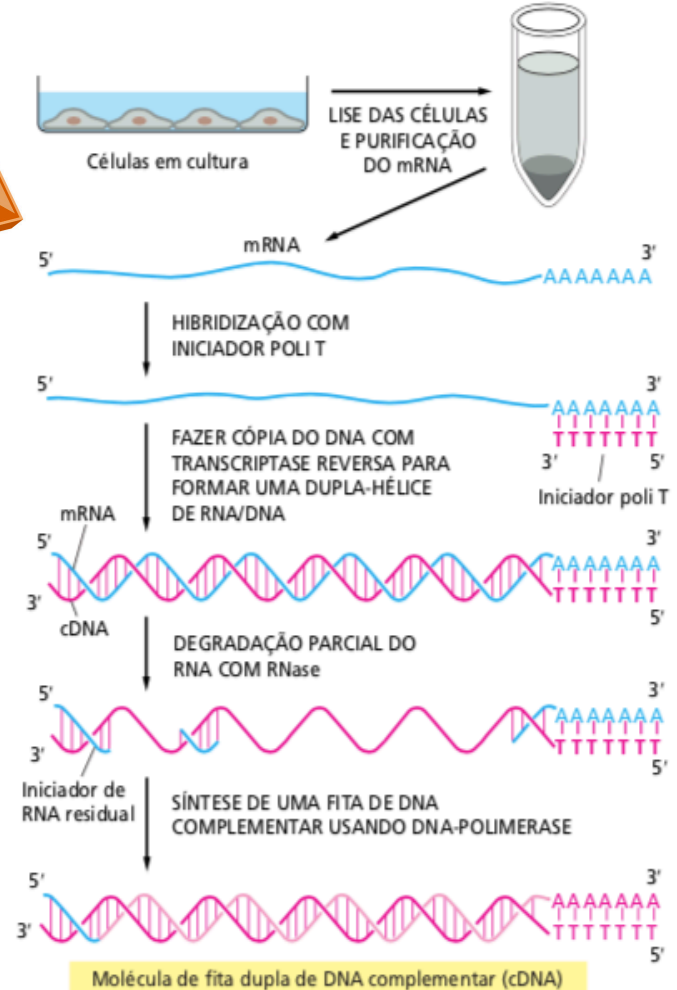
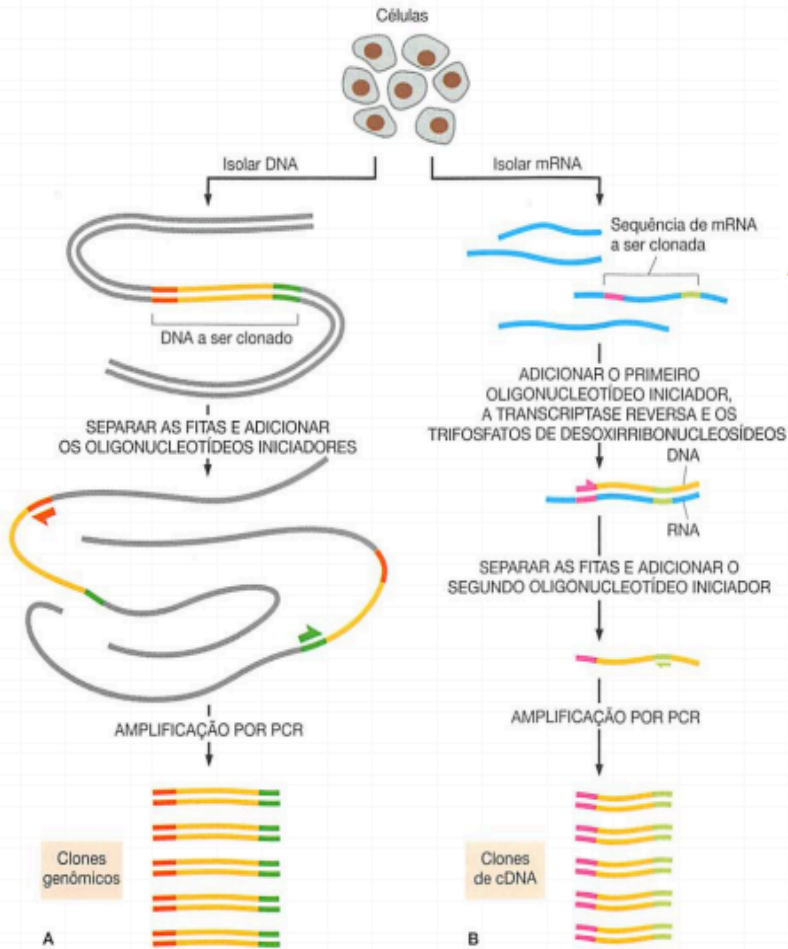


# Etapas da PCR

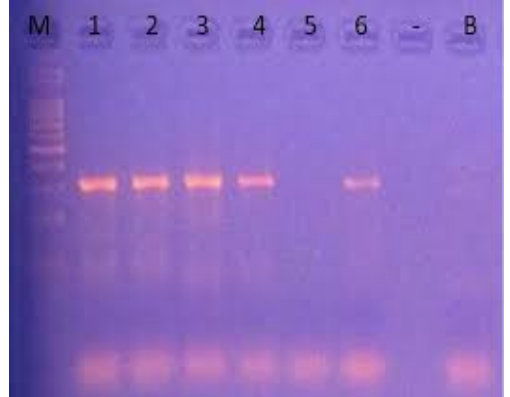
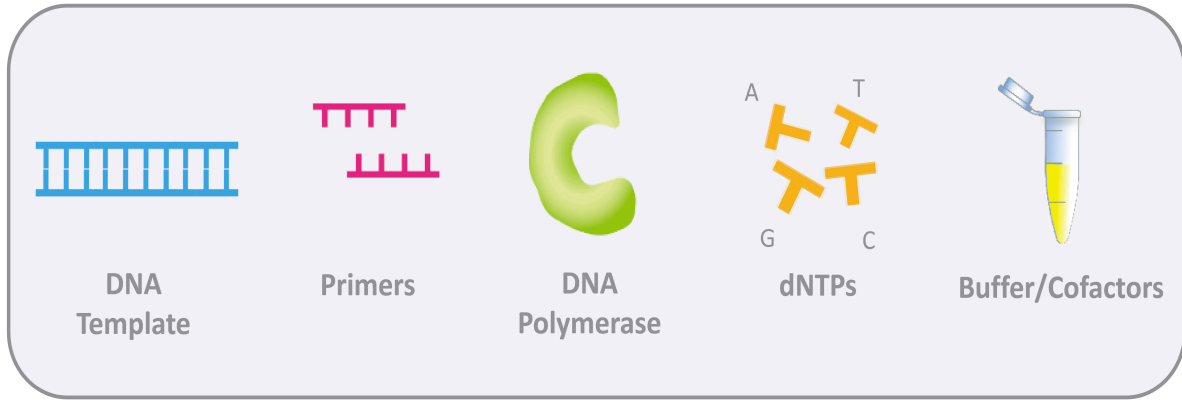
Após cada ciclo, a quantidade de DNA duplica



# A PCR pode ser utilizada para obter clones genômicos ou de cDNA



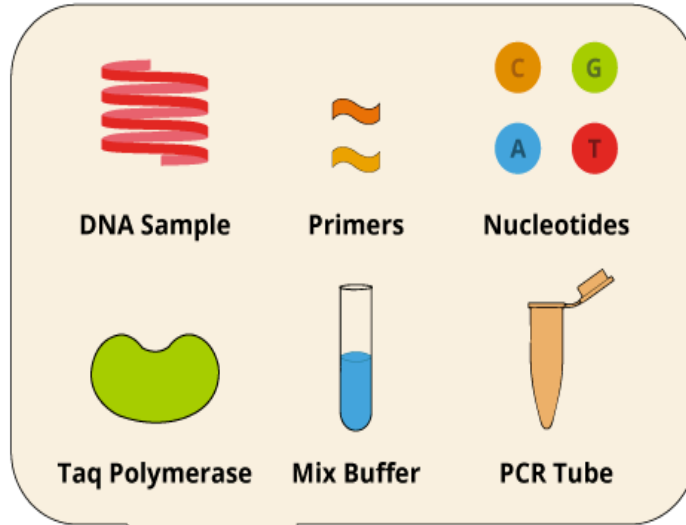
# TERMOCICLADOR





# COMPONENTES BÁSICOS DA PCR

## PCR Components



DNA Sample

Primers

Nucleotides

Taq Polymerase

Mix Buffer

PCR Tube



Thermal Cycler



PCR Cycle

## PCR Process (One Cycle)



95°C - Strands Separate

1. Desnaturação



55°C - Primers Bind Template

2. Anelamento



72°C - Synthesise New Strand

3. Extensão



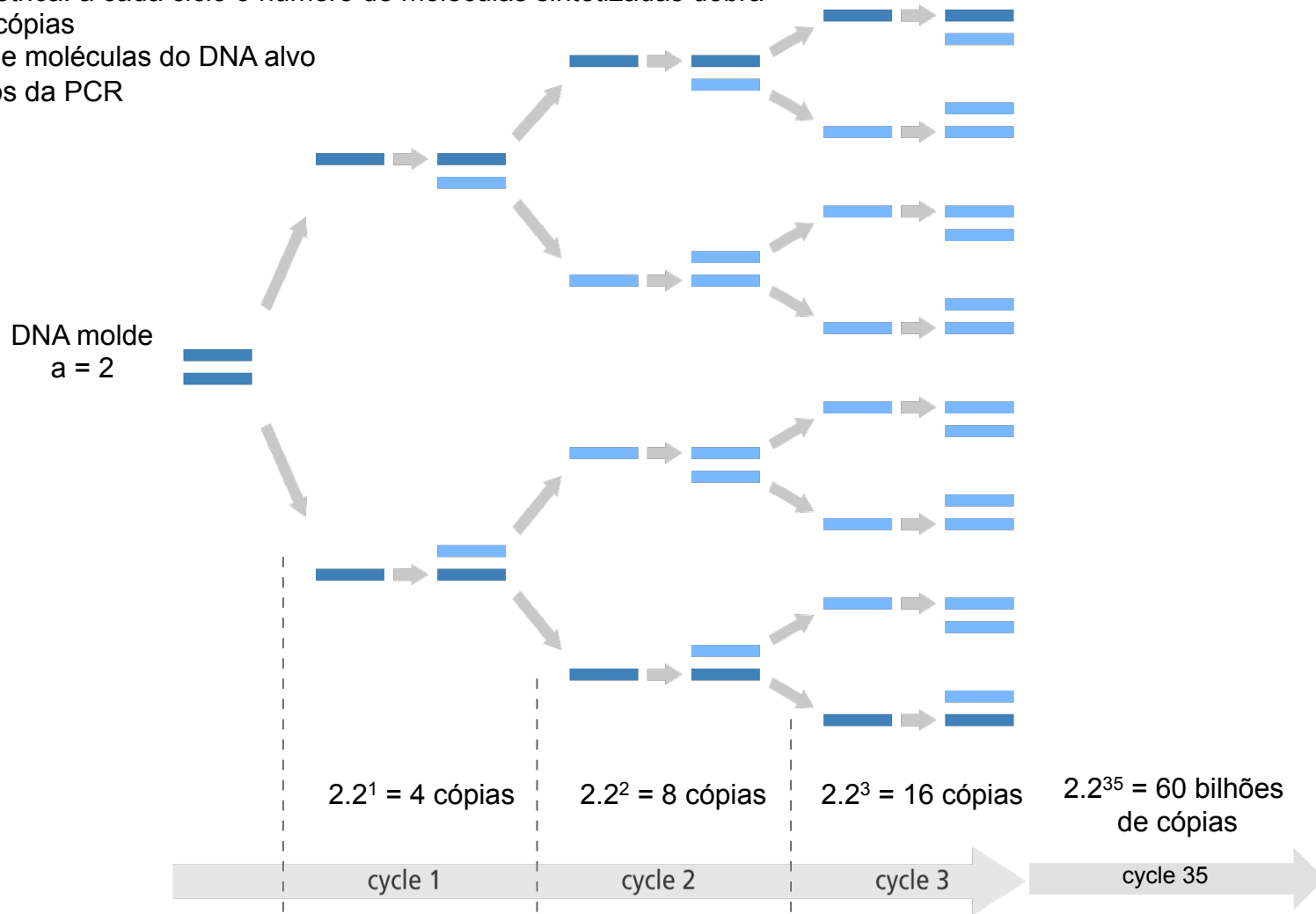
# A amplificação é exponencial

Amplificação geométrica: a cada ciclo o número de moléculas sintetizadas dobra

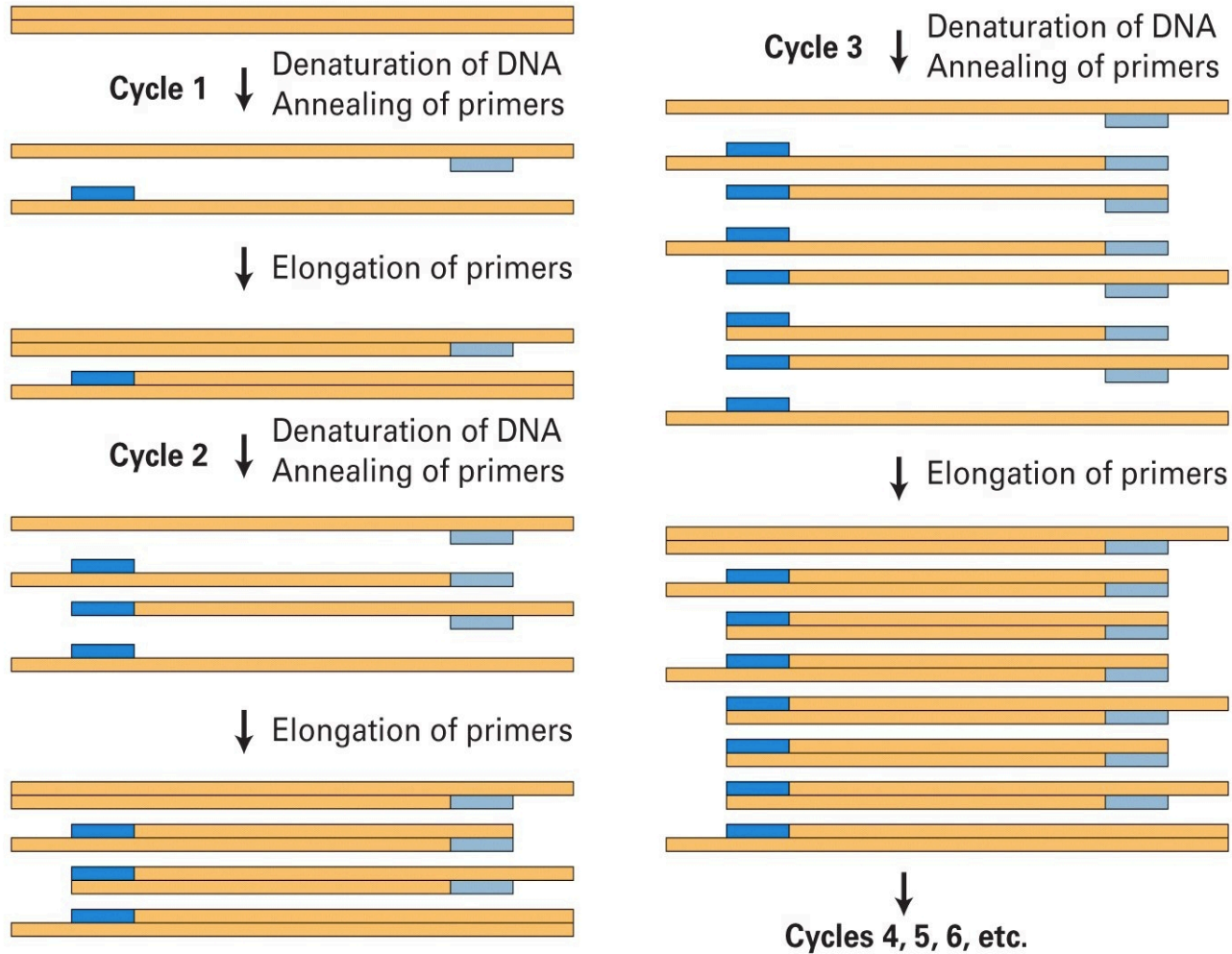
$a \cdot 2^n$  = número de cópias

$a$  = número inicial de moléculas do DNA alvo

$n$  = número de ciclos da PCR



# CICLOS DA PCR



# Aplicações da PCR

Identificação genoma, indicação de que alimentos consumir

**Consumer genomics**



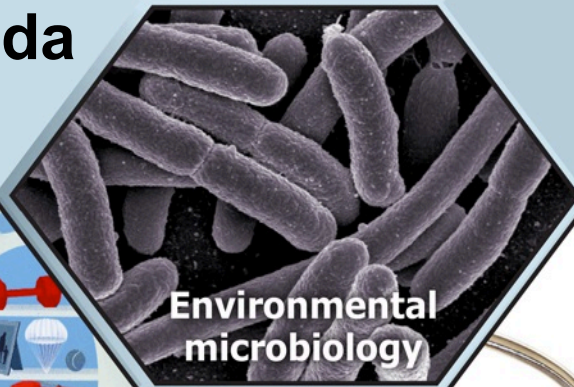
Auxilia na modificação genética de produtos agrícolas



**Food and agriculture**

Obtenção de transgênicos

Identificação da autenticidade de um alimento e de OGM



**Environmental microbiology**

Deteccção de microrganismo no ambiente

Diagnóstico de doenças



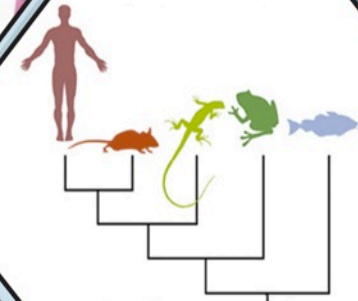
**Medicine**

Exames de pré-natal



**Genetic research**

**Forensic science**



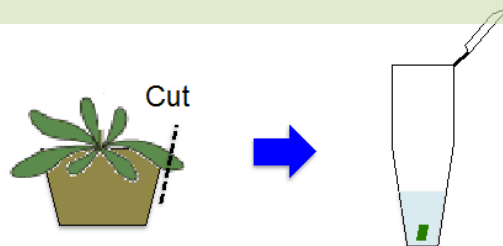
**Phylogenetics**

Análise forense para identificar criminosos, ou teste de paternidade pelo perfil do DNA

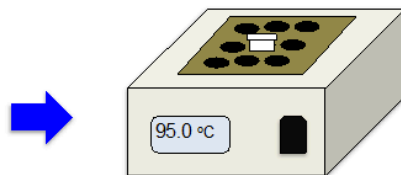
Estudos filogenéticos, para se entender a evolução e relações entre os organismos

# Aplicação da PCR na agricultura

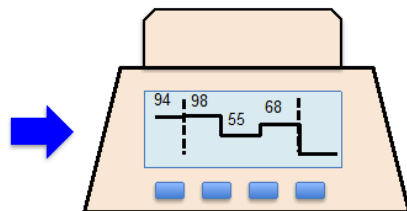
## Identificação da autenticidade de alimentos e OGM



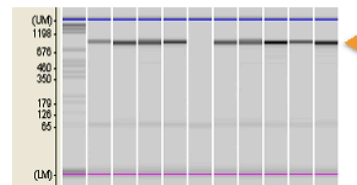
Amostragem



Extração de DNA



PCR



Eletroforese em gel

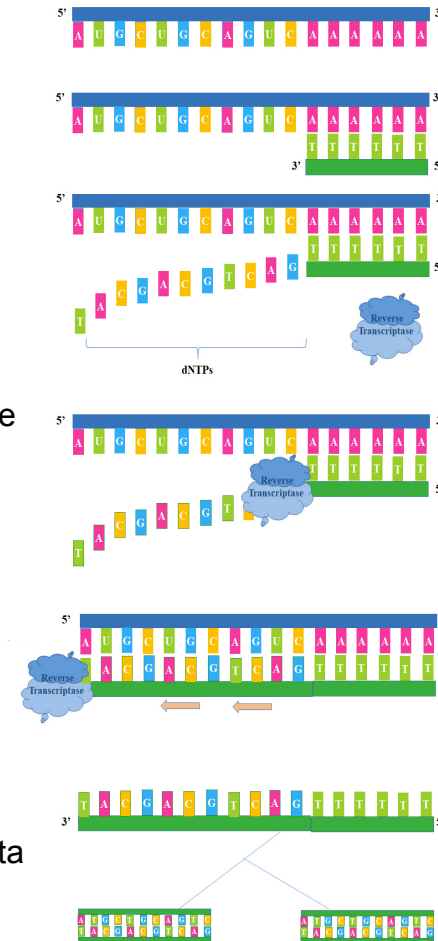
# RT-PCR

## Transcriptase reversa PCR

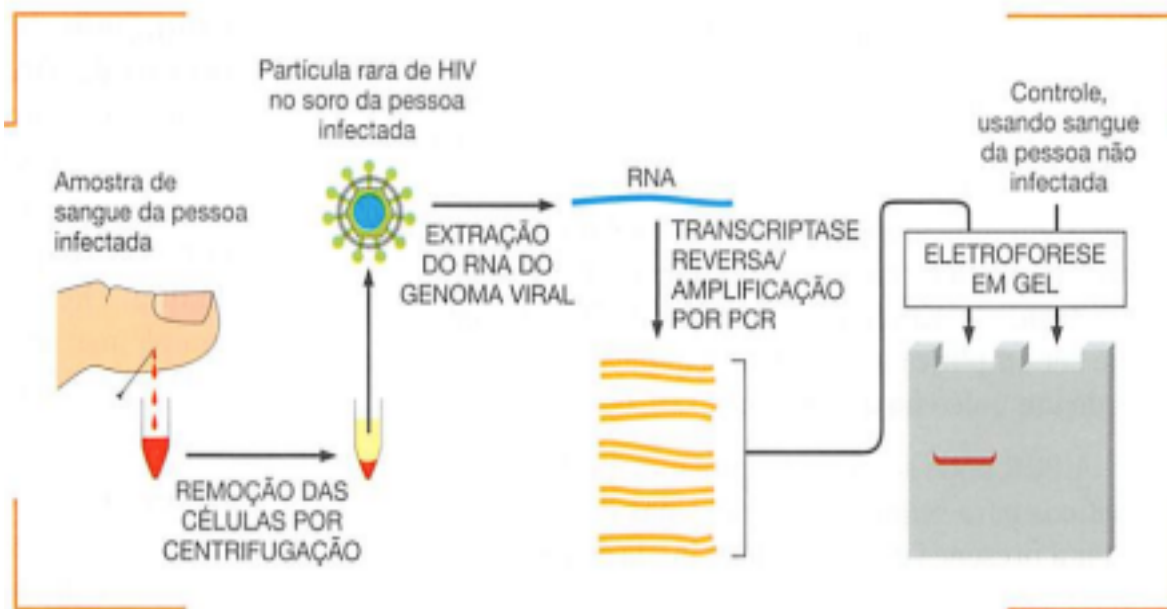
Na técnica de RT-PCR o mRNA é convertido em cDNA pela transcriptase reversa

O cDNA é amplificado pela reação em cadeia da polimerase

1. mRNA apresenta o *start codon* (AUG) e a cauda poli A
2. Oligo(dT) é anelado à cauda poli A
3. Transcriptase reversa e o mix de oligonucleotídeos dNTPs iniciam o processo de síntese da cDNA
4. Transcriptase reversa é a enzima responsável pela adição dos dNTPs, sintetizando a 1ª fita de cDNA
6. Fita híbrida de RNA e cDNA (1ª fita) é formada
7. Tratamento com RNase para degradar parcialmente o mRNA, e síntese da 2ª fita de cDNA pela DNA polimerase
8. DNA polimerase e os primers específicos amplificam o fragmento de cDNA



# RT-PCR utilizada para diagnóstico



# RT-PCR para diagnosticar SARS-CoV-2 (COVID-19)

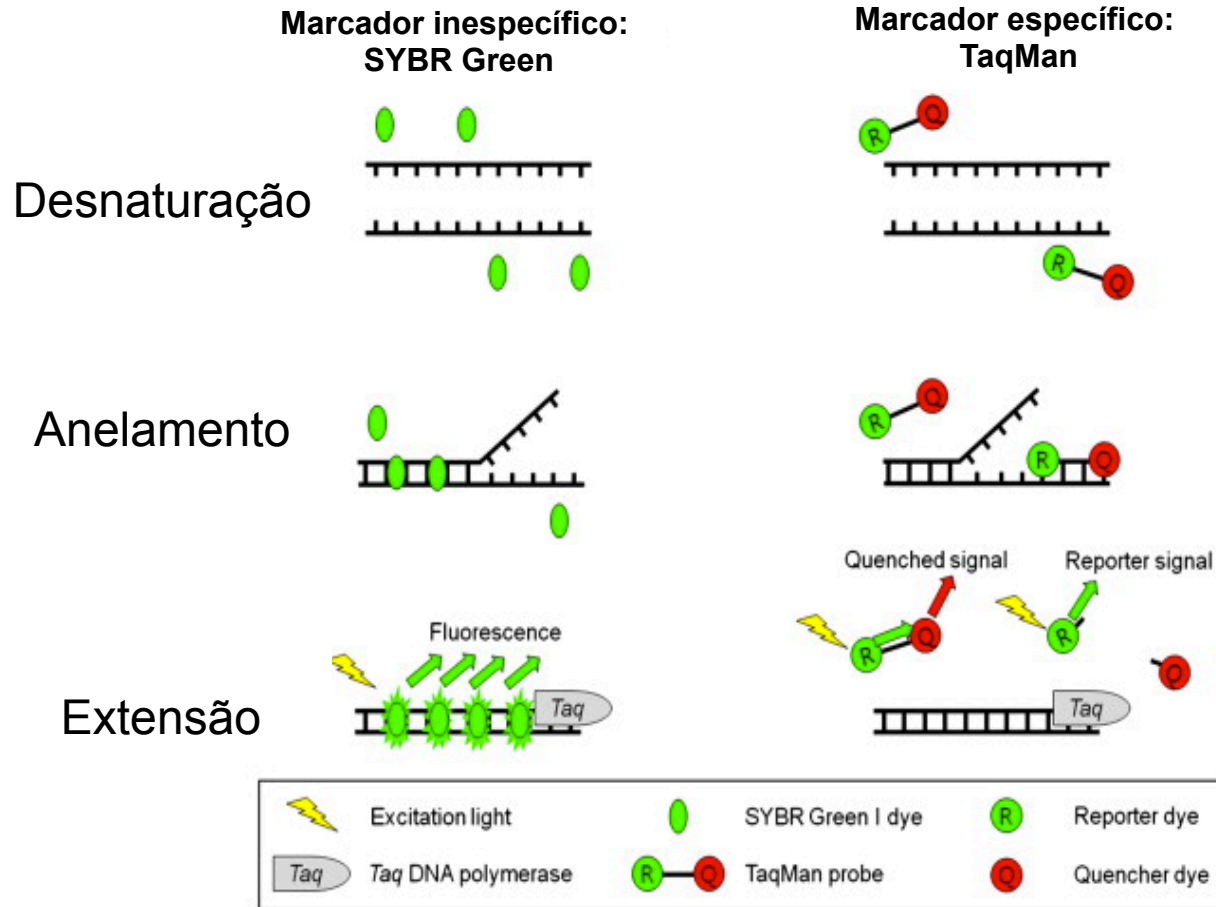
## *Reverse Transcriptase PCR*





# PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR)

## Quantificação de DNA e RNA



A fluorescência é detectada logo após a fase de extensão de cada ciclo, quando o DNA está na fita dupla

A fluorescência é detectada após a extensão pela Taq DNA polimerase

## ESTUDO DIRIGIDO

1. O que é a PCR?
2. Qual aplicação dessa técnica?

## BIBLIOGRAFIA

Capítulo 2 - Princípios da PCR convencional

Capítulo 3 - Aplicações gerais da PCR convencional. Pereira, T.C. Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital. Sociedade Brasileira de Genética, 2018.

Capítulo 5 - Técnicas de Genética Molecular. Lodish et al. Biologia Celular e Molecular. 7ª edição. Editora Artmed, 2014.

Capítulo 11 - Manipulando o gene /Técnicas de Biologia Molecular. Menck, C.F.M.; Van Sluys, M.A. Genética Molecular Básica: dos genes aos genomas. Editora Guanabara Koogan, 2017.

<https://www.youtube.com/watch?v=rn40R5w5Fkw>

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

