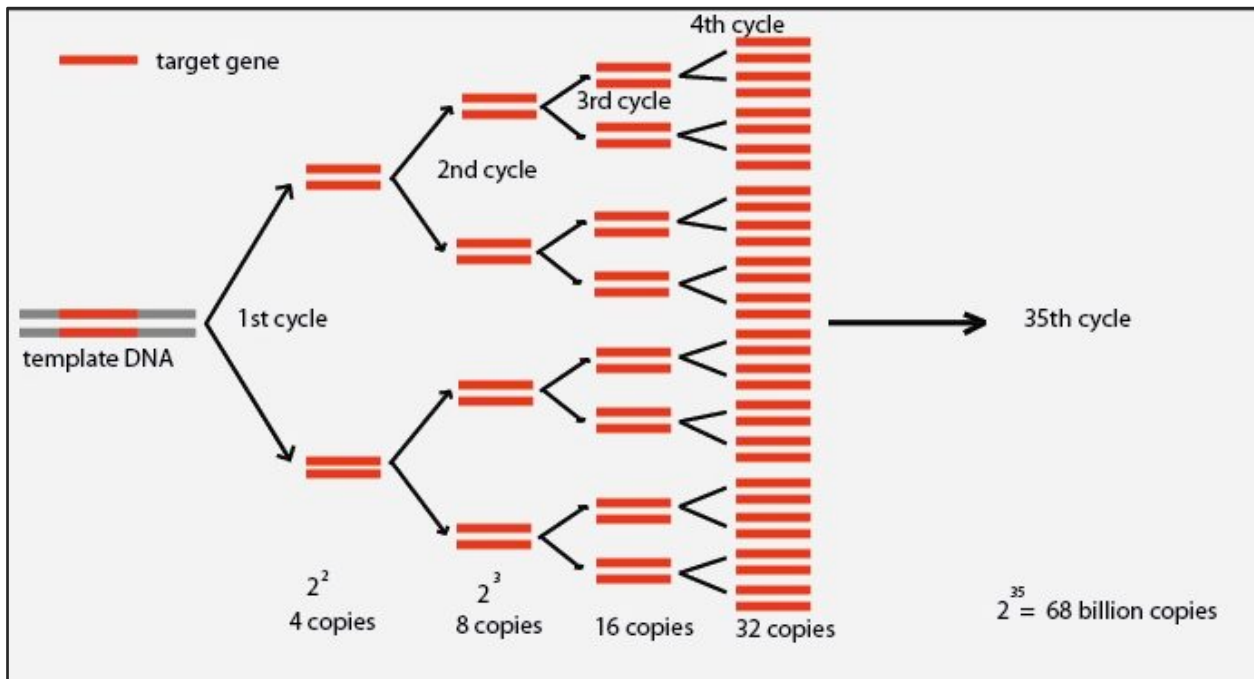


# QBQ1354 - Biologia Molecular 2020



Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

# PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

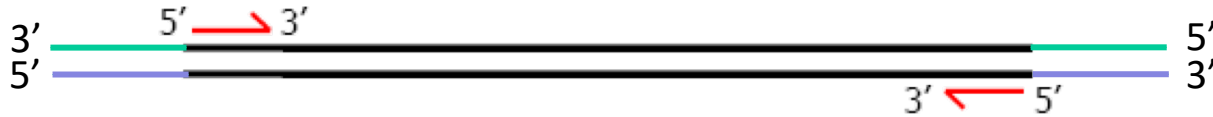
- Desenvolvida por Kary Mullis em 1983



The Nobel Prize in Chemistry 1993  
Kary B. Mullis, Michael Smith

- Revolucionou a biologia molecular
- Um método *in vitro* rápido, sensível e versátil para **amplificação seletiva de sequências de DNA (ou RNA)** a partir de amostras de ácidos nucleicos puras ou complexas
- “No tubo de ensaio”, a PCR produz quantidades de DNA suficientes para análises subsequentes

# PCR: amplificação de um segmento de DNA

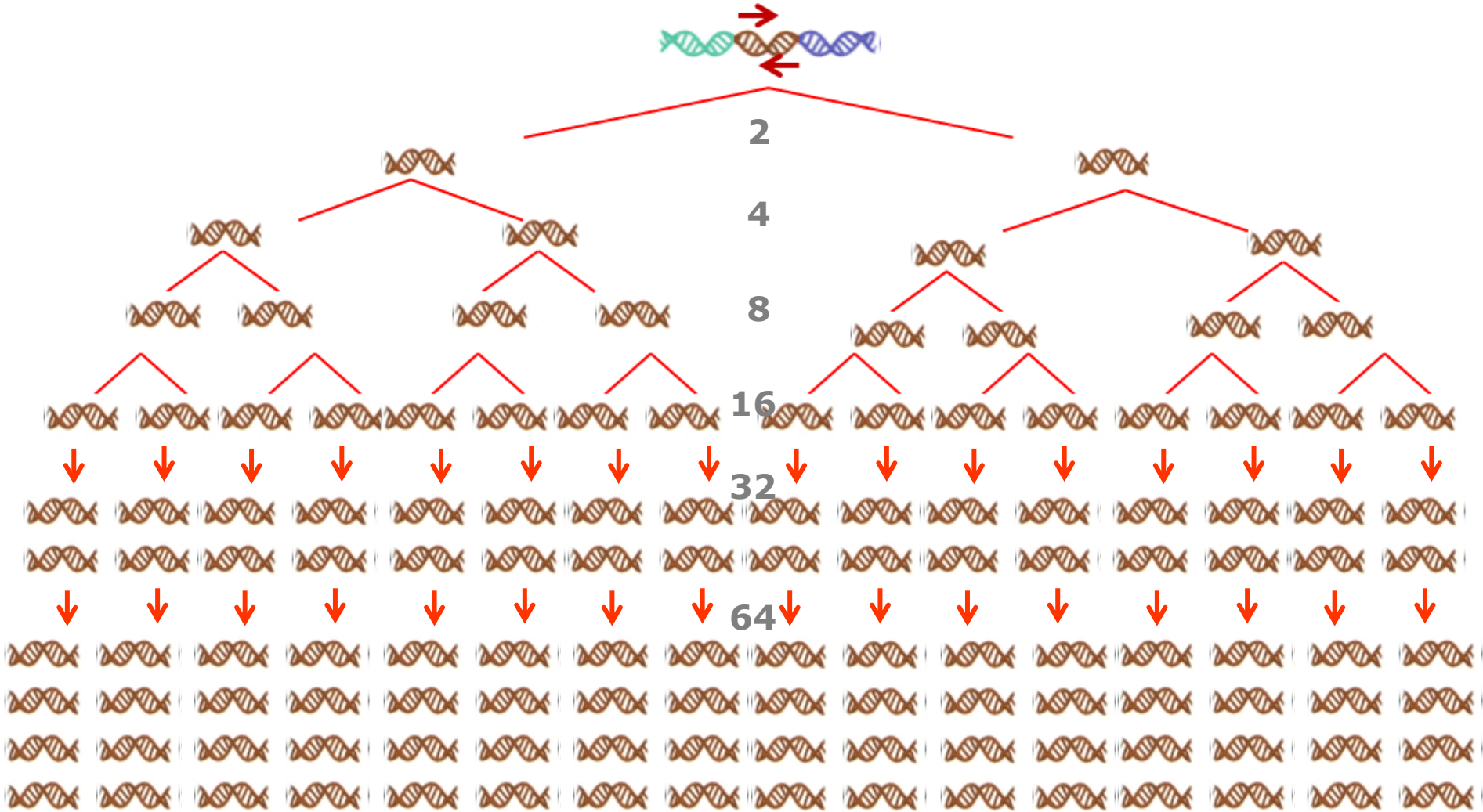


- Requer o anelamento de iniciadores (pequenos segmentos de **DNA**) a sequências complementares que flanqueiam a região alvo a ser amplificada. **Portanto as sequências que flanqueiam a região a ser amplificada devem ser conhecidas!**

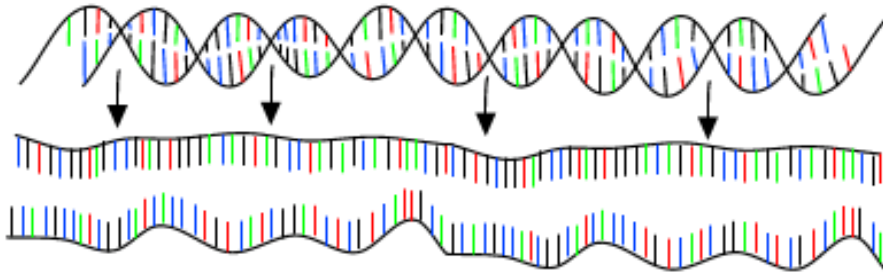
- Requer a ação da enzima DNA polimerase para sintetizar novas cópias idênticas a região alvo a ser amplificada

Iniciadores = oligonucleotídeos ou *primers* de DNA

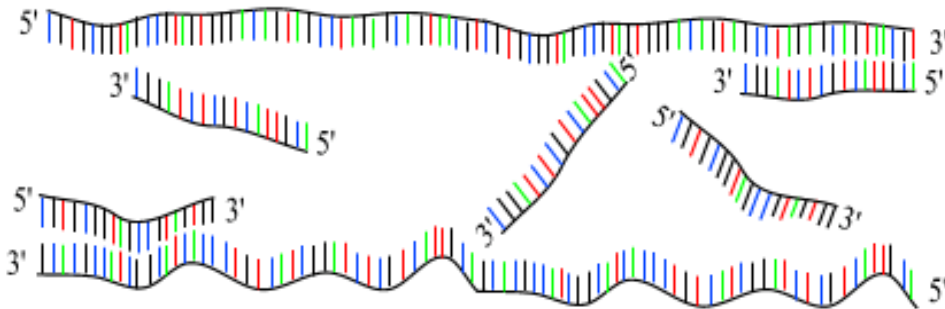
# PCR: amplificação de um segmento de DNA



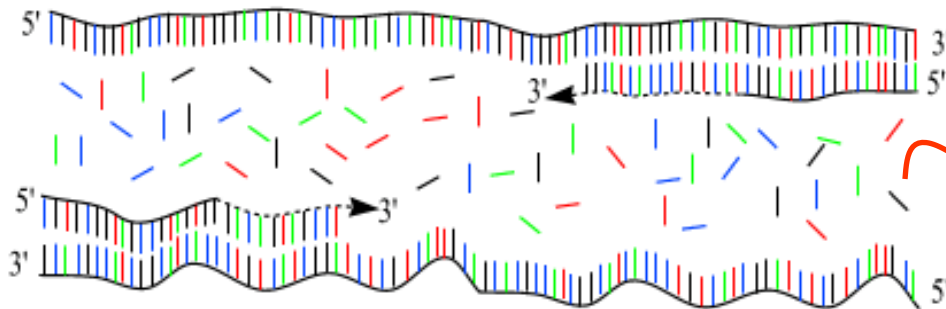
# PCR: 25-35 ciclos de três etapas



Desnaturação da fita dupla do DNA molde

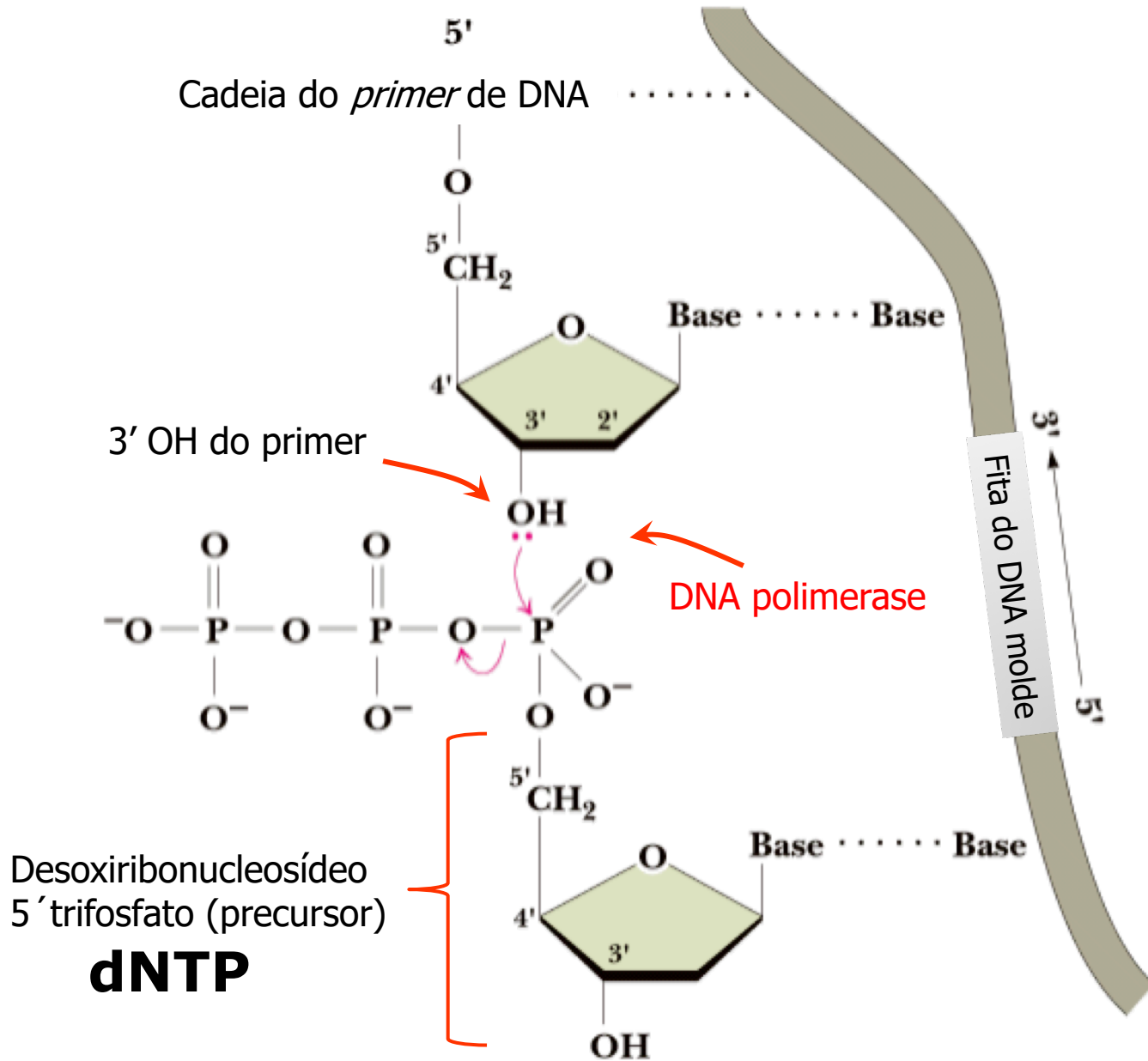


Anelamento dos oligonucleotídeos diretos e reversos (forward and reverse *primers*)



Extensão dos *primers* (síntese de DNA)

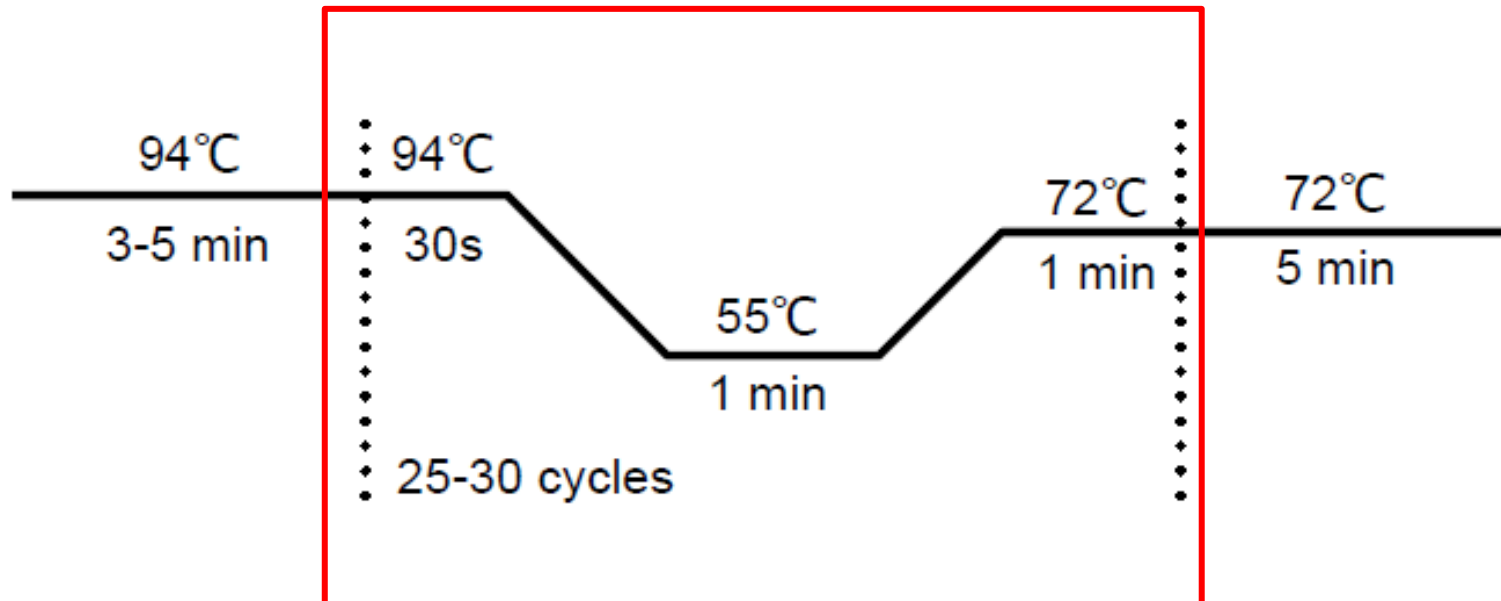
dNTPs



Cada **ciclo** da PCR tem três etapas:

- |                                  |                                |                          |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 1. <u>Desnaturação</u>           | 94°C                           | 30 secs – 30seg          |
| 2. <u>Anelamento</u>             | 55°C                           | 1min                     |
|                                  | <i>depende da Tm do primer</i> |                          |
| 3. <u>Extensão/Polimerização</u> | 72°C                           | 1min para cada 1000bases |

**DNA polimerase para PCR tem que ser termoestável!**



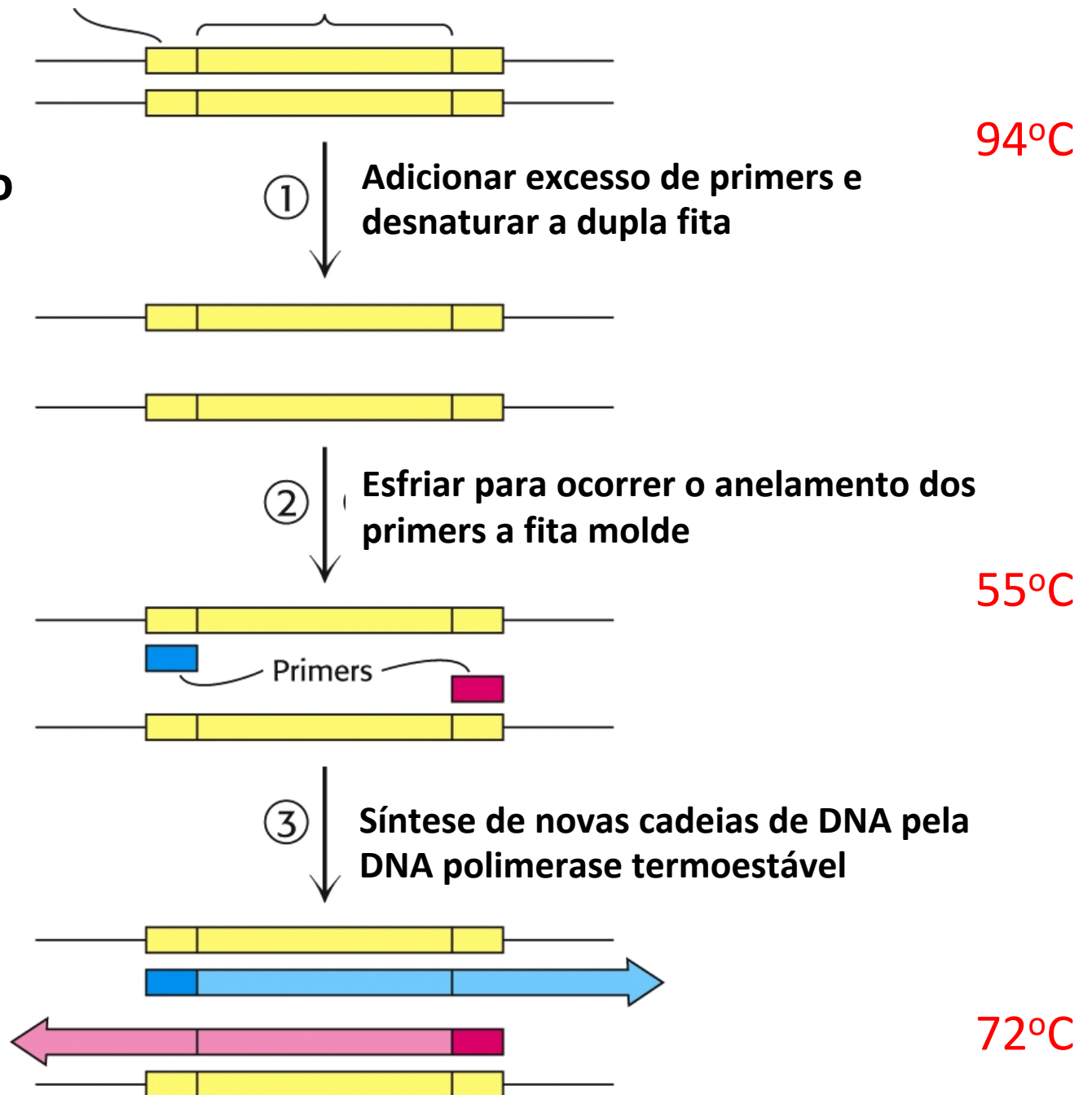
# Taq Polimerase

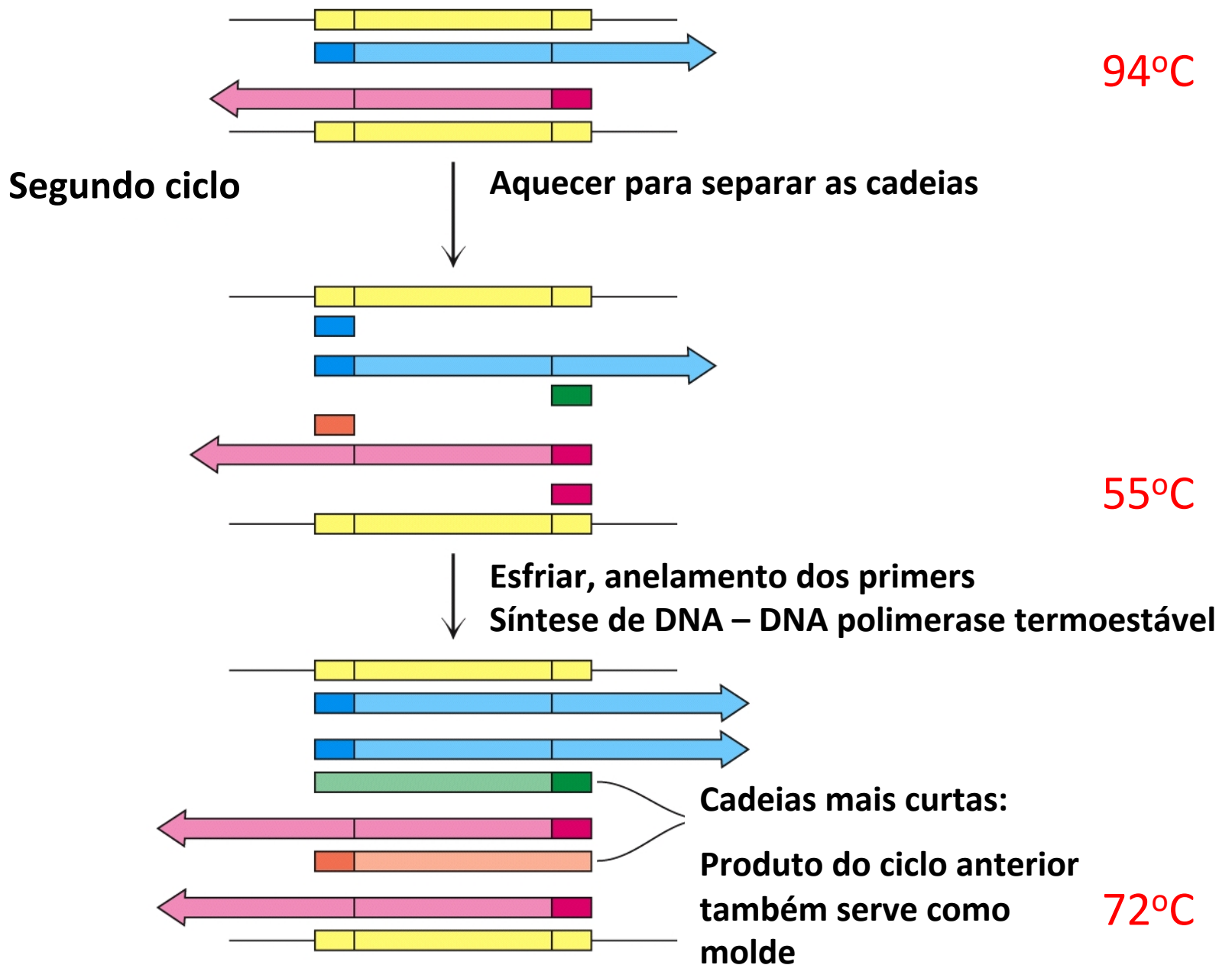
DNA polimerase termoestável isolada da bactéria  
*Thermus aquaticus*

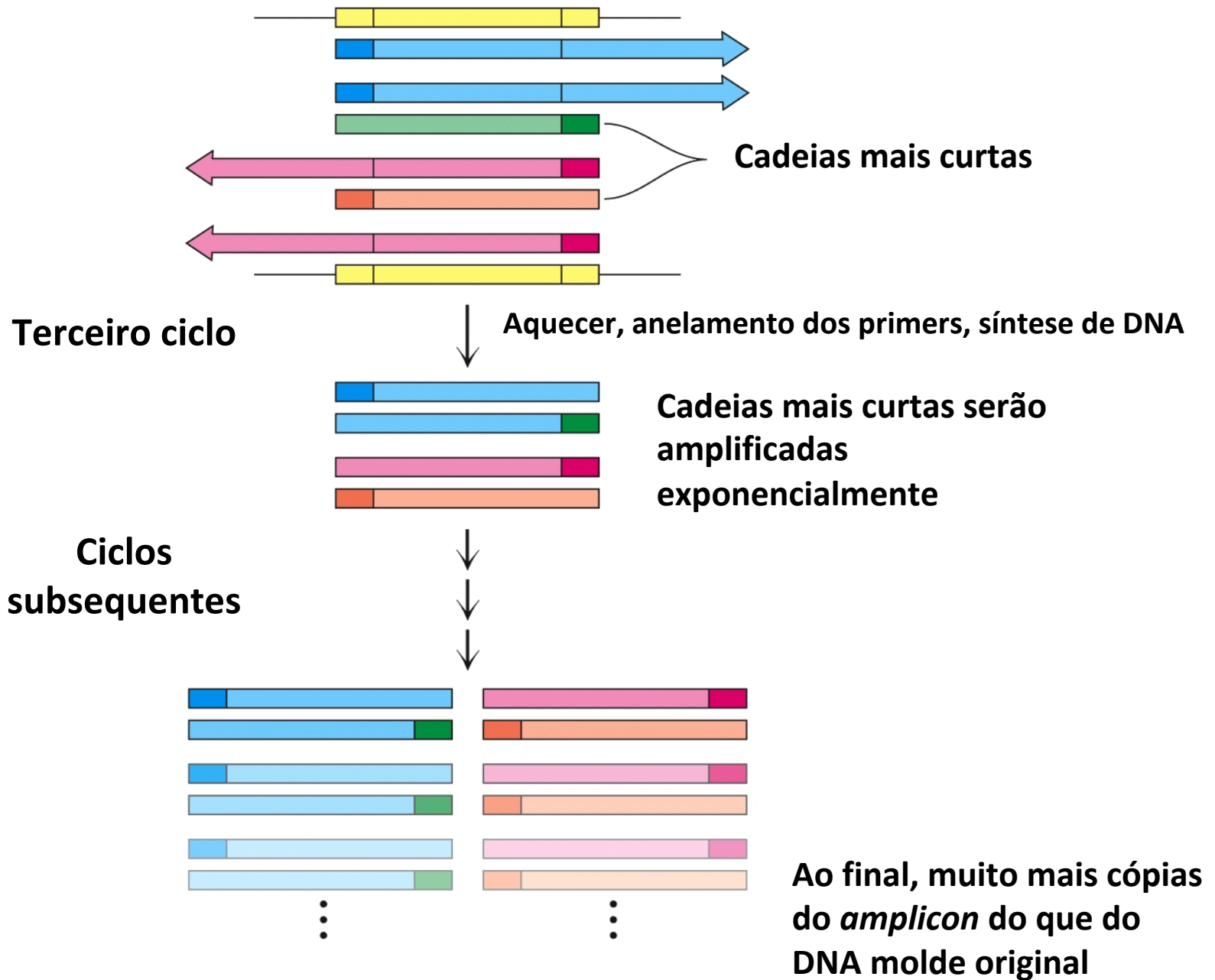




# Primeiro ciclo

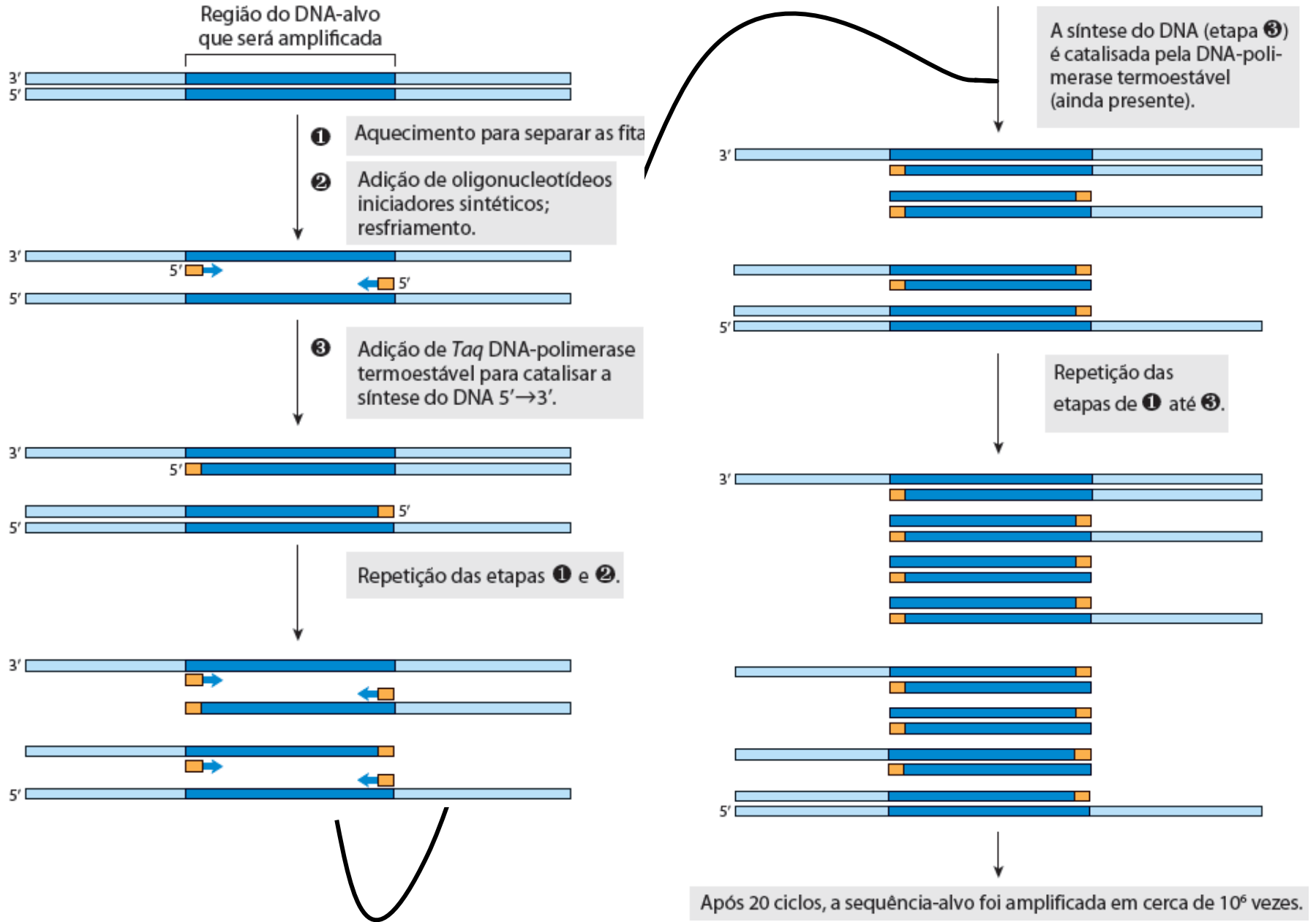




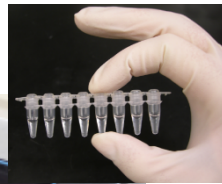
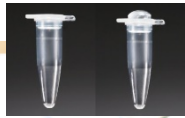


# PCR

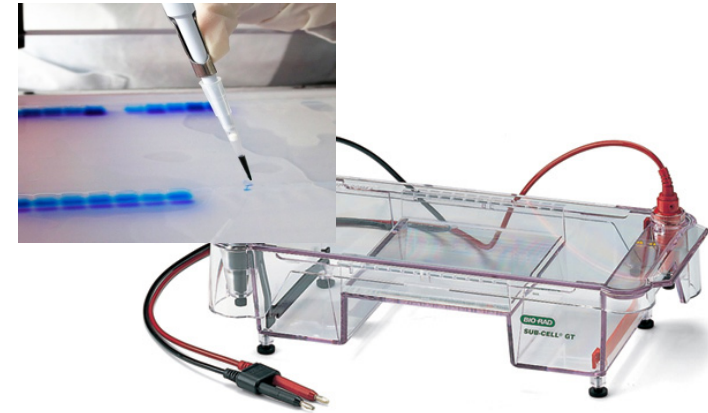
(a)



# PCR



Análise do resultado através de eletroforese em gel de agarose



2-4 horas



Termociclador

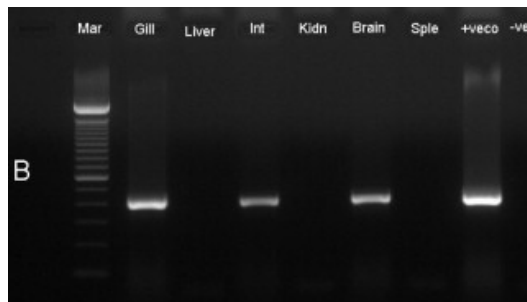
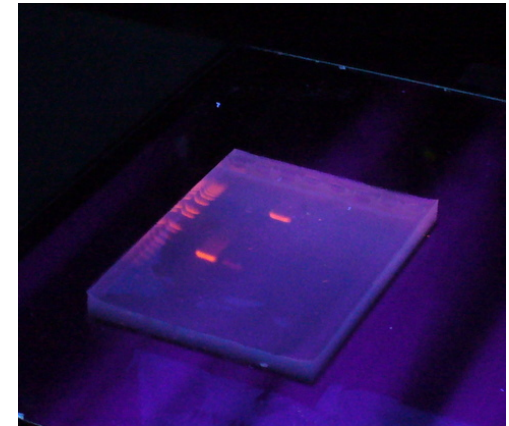
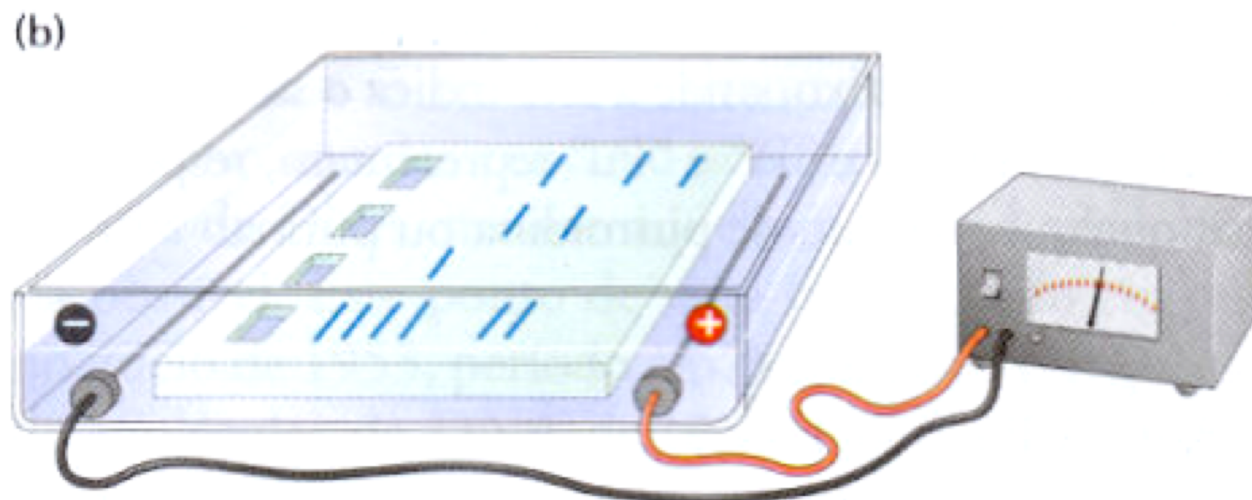
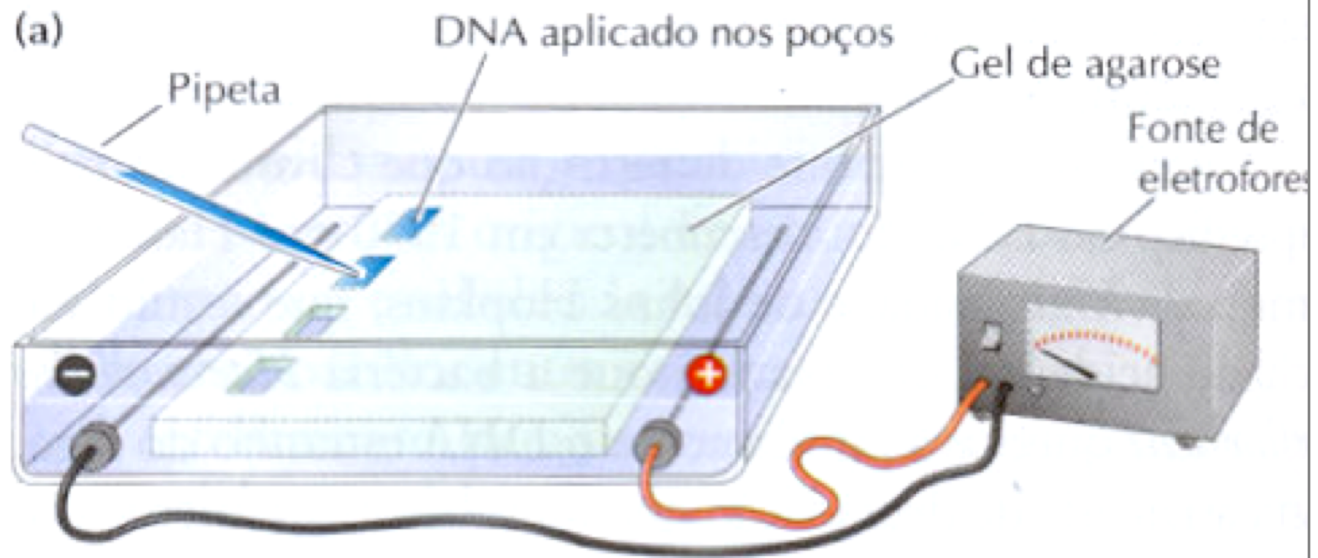


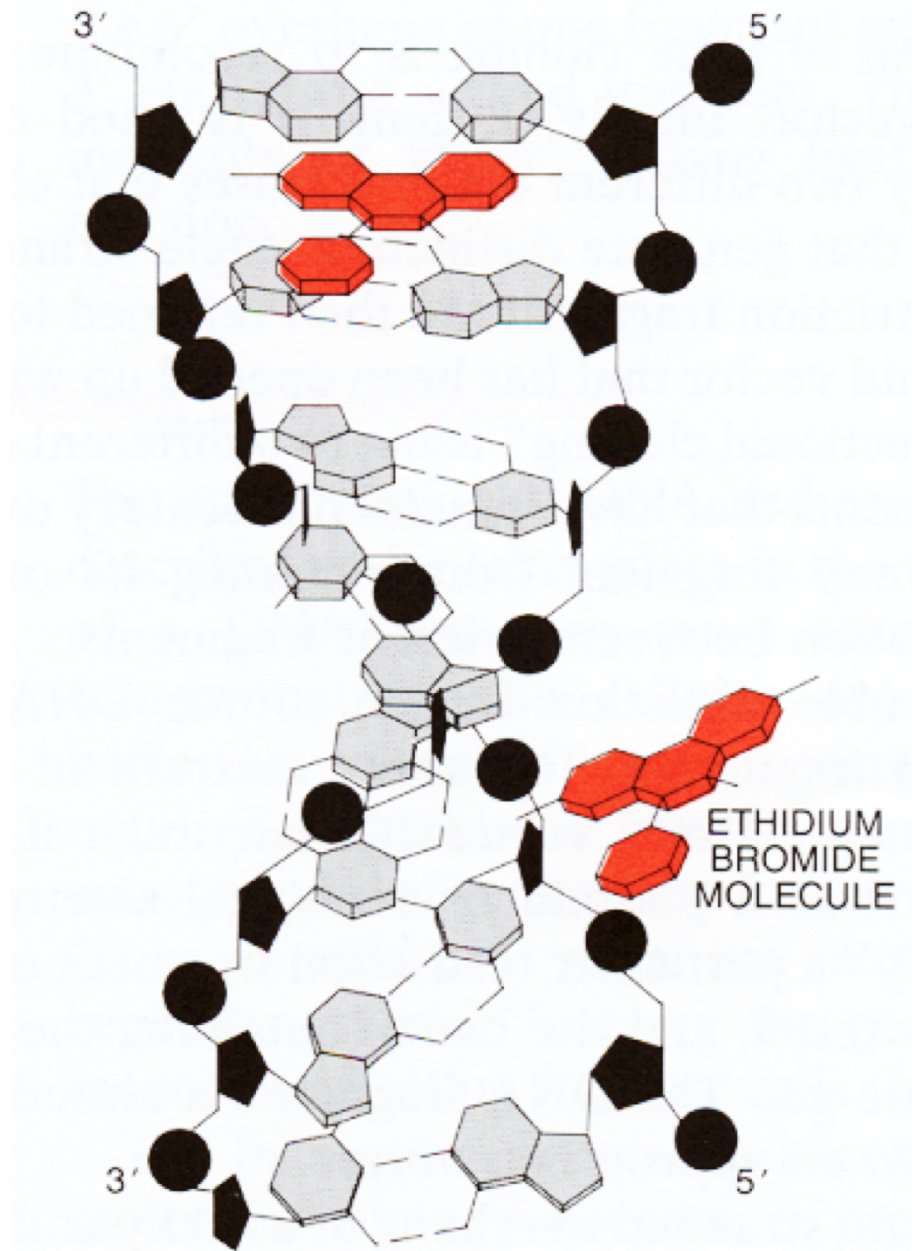
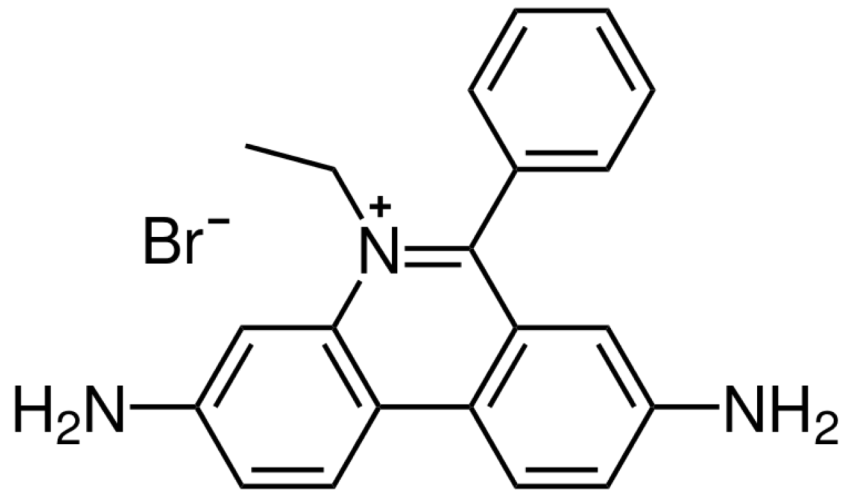
Imagem do gel mostrando os produtos de PCR obtidos (amplicon)

Visualização do DNA com luz UV (gel corado com brometo de etídio)

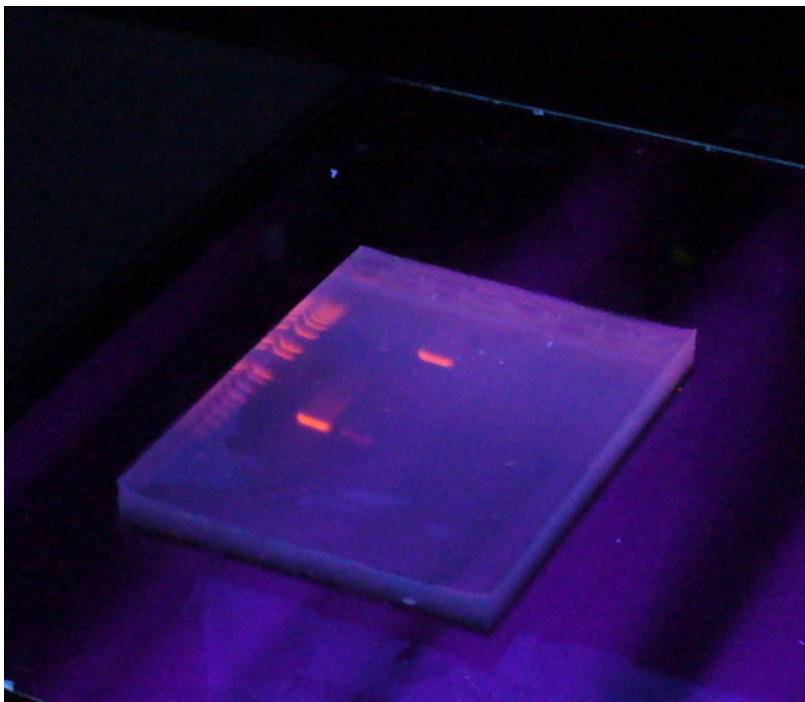


# Brometo de etídio intercalado na dupla fita de DNA

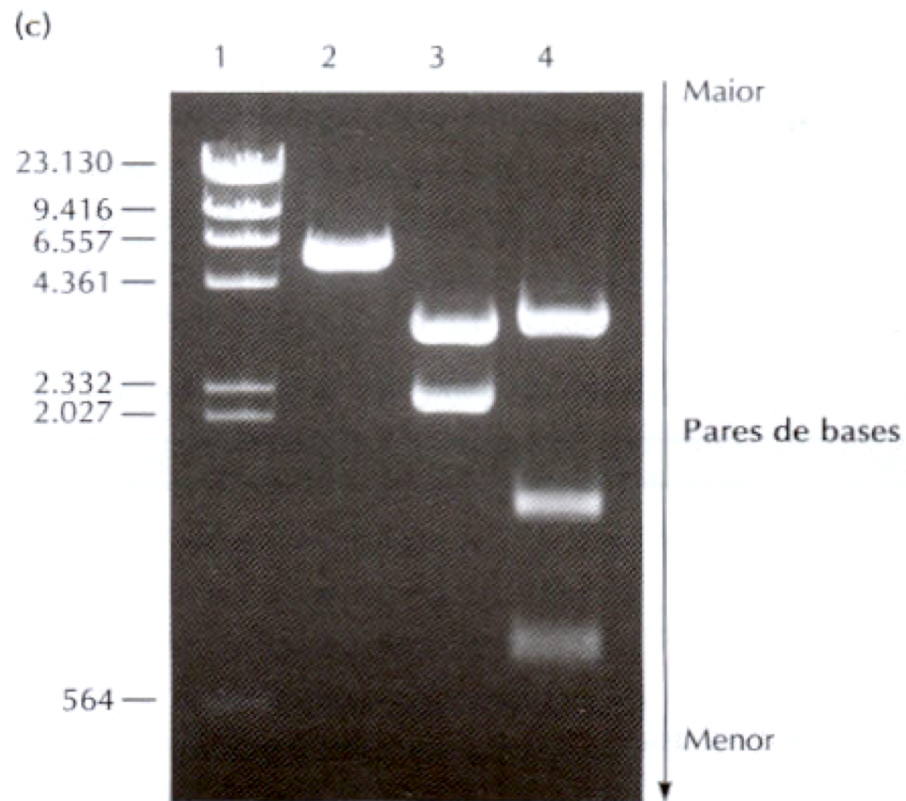
## Brometo de Etídio



## Visualização do DNA com luz UV



## Imagem digitalizada do gel





# PCR para obtenção do segmento de DNA de interesse em quantidade:

Extração de DNA



Amplificação por PCR:

Par de *primers* específico para um segmento (locus, gene) do DNA

Análise e Purificação do produto de PCR (amplicon)

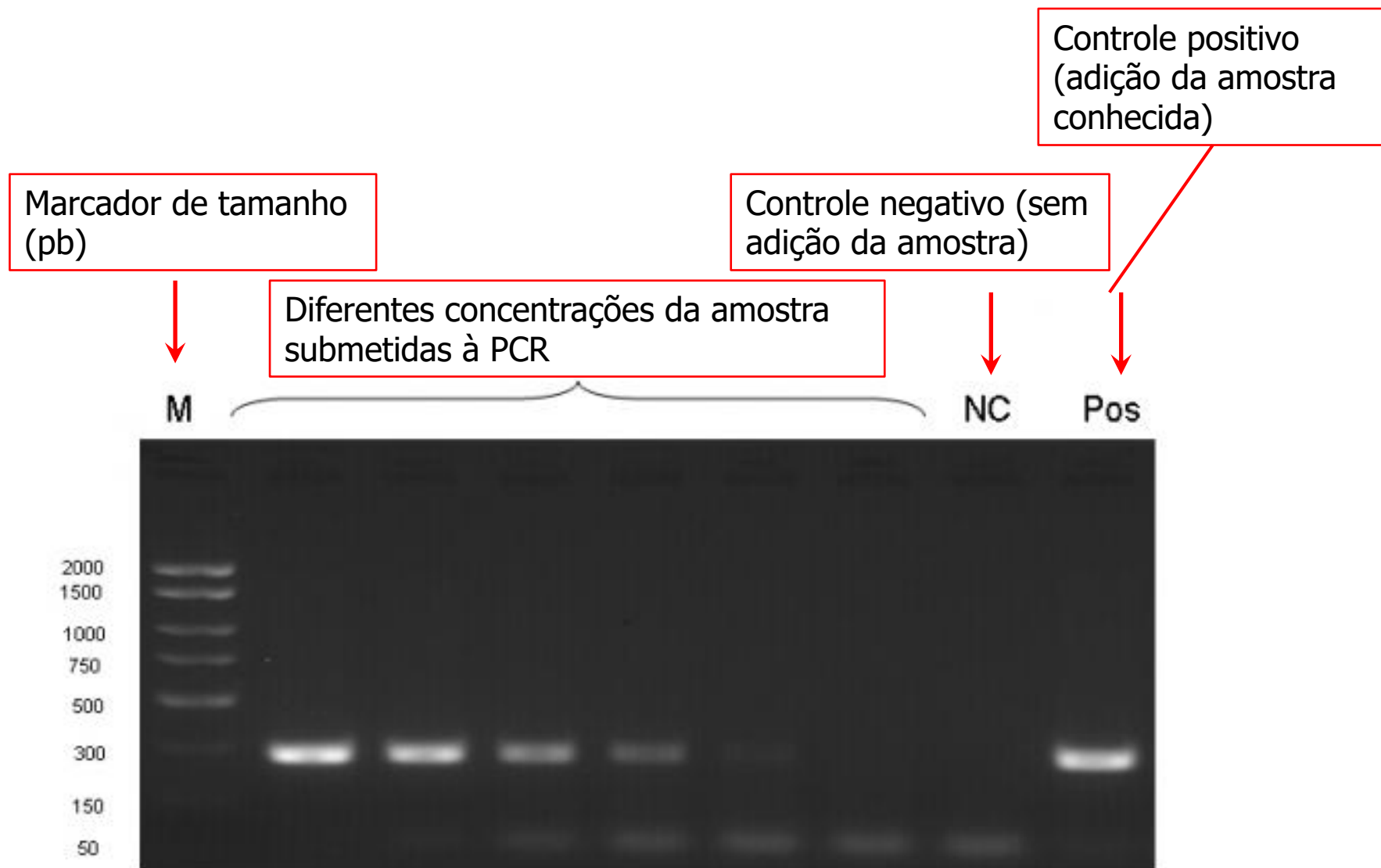
## **Amostras:**

Cultura de bactérias, sangue, urina, cabelo, dente, ossos, sêmen, tecido animal ou vegetal, solo, água, etc.....

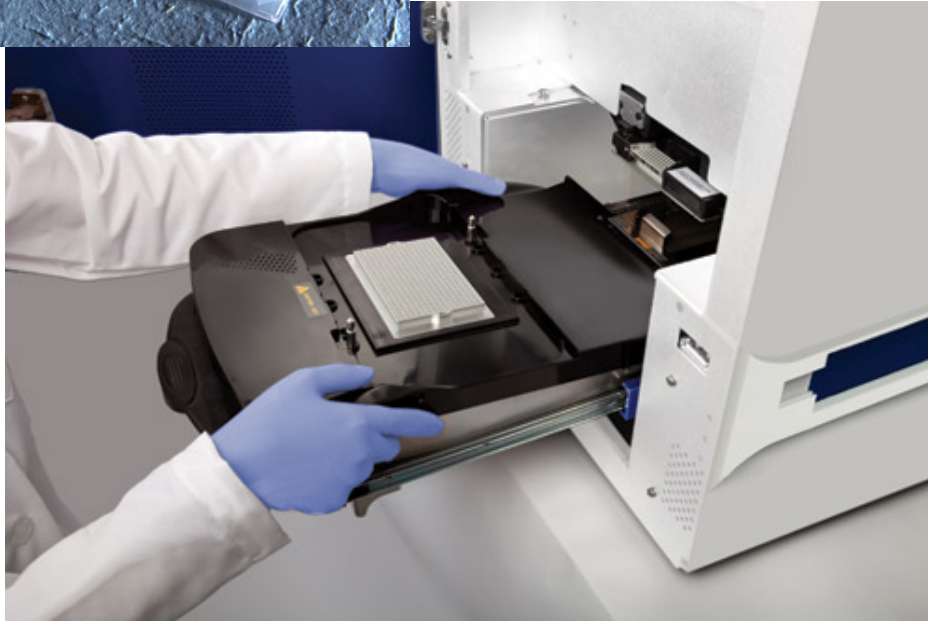
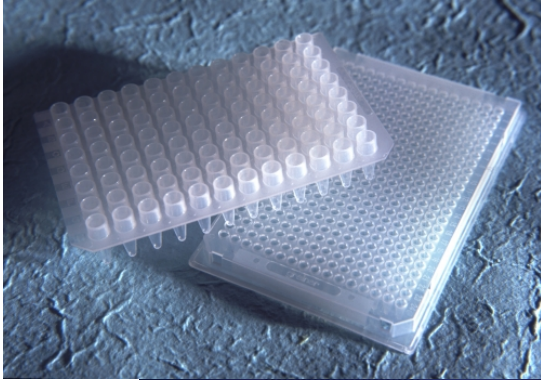
# PCR

- Técnica é muito sensível
- Contaminação pode ser um problema
- Controles positivo e negativo são importantes
- Cada protocolo deve ser otimizado para cada tipo de amostra e cada par de primers

# PCR convencional é um método semi-quantitativo



# Real Time PCR (qPCR = PCR quantitativo)



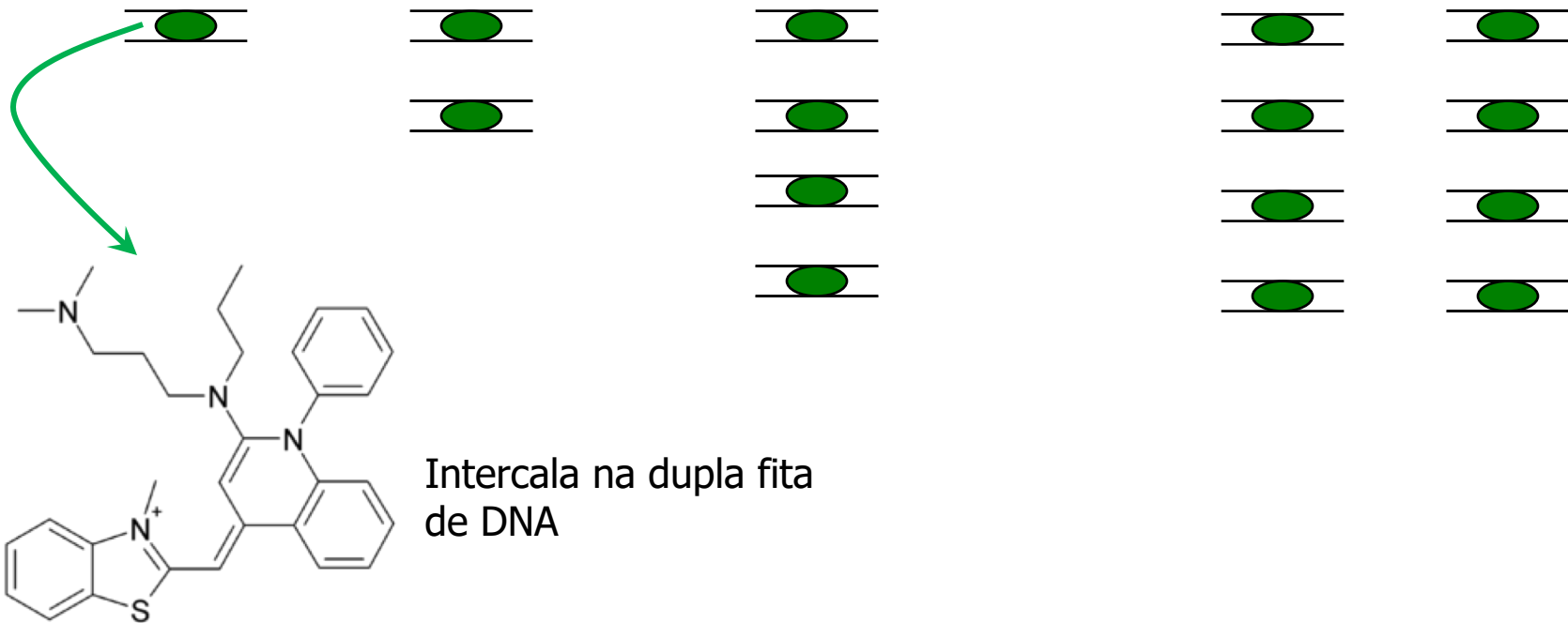
# “Real-time PCR”: Detecção dos produtos de PCR com fluoróforo Sybr Green

PCR - ciclos:

1

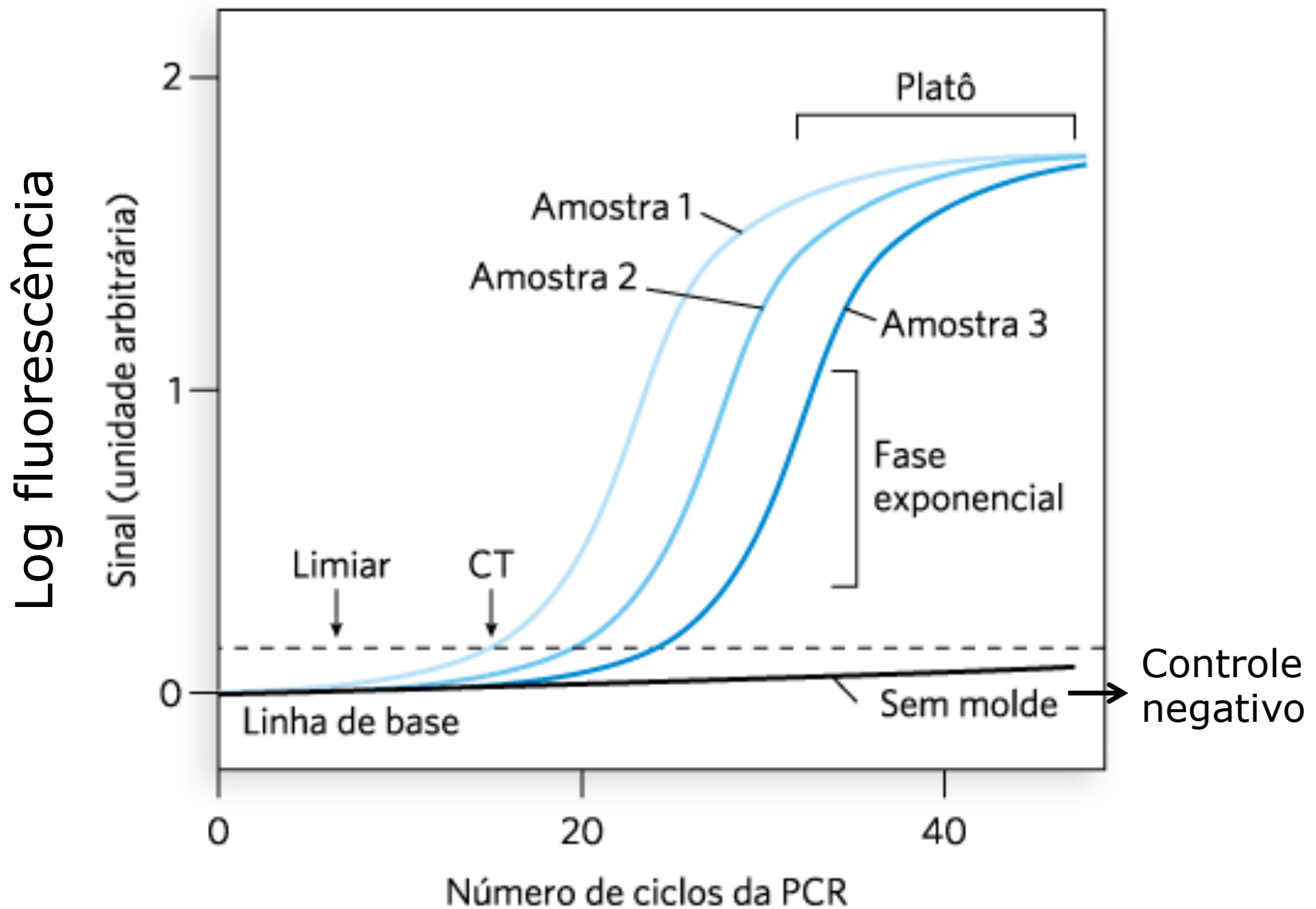
2

3



A fluorescência do Sybr Green é proporcional a quantidade de produto de PCR gerado





**$C_T$  – (Cycle Threshold)** = Número de ciclos em que a fluorescência detectada ultrapassa o limite da fluorescência basal (*threshold*)

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>



[Home](#) / [Virtual Labs](#) / PCR

## PCR

PCR (short for Polymerase Chain Reaction) is a relatively simple and inexpensive tool that you can use to focus in on a segment of DNA and copy it billions of times over. PCR is used every day to diagnose diseases, identify bacteria and viruses, match criminals to crime scenes, and in many other ways. Step up to the virtual lab bench and see how it works!



# Aplicações da PCR

- Obtenção de segmentos de DNA de interesse para clonagem molecular (obtenção de proteínas recombinantes)
  
- Genotipagem do DNA
  - Detecção de infecção/contaminação por bactérias, vírus ou fungos
  - Diagnóstico de doenças genéticas
  - Identificação de indivíduos (teste de paternidade)

- Detecção de infecção/contaminação por bactérias, fungos ou vírus em amostras biológicas, água, solo e alimentos

exemplos →

*Mycobacterium tuberculosis*

*Staphylococcus Aureus resistente a meticilina (MRSA)*

*Clostridium difficile*

*Bordetella pertussis e parapertussis*

*Chlamydia pneumoniae*

*Mycoplasma pneumoniae*

*Neisseria meningitidis*

*Listeria monocytogenes*

HIV

Citomegalovírus

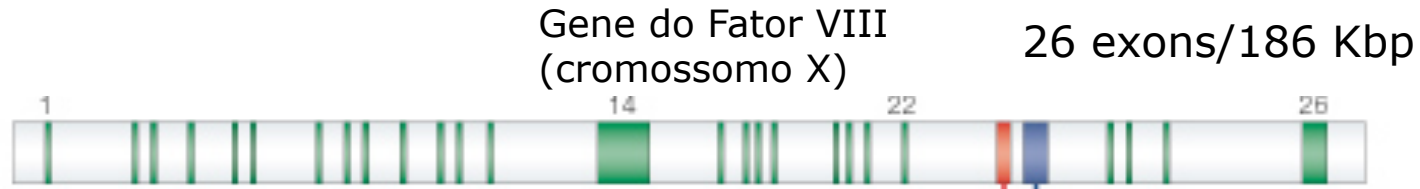
Dengue

Vírus de Epstein-Barr

Hepatite B, C, D

Herpes simplex 1 e 2

# Diagnóstico Hemofilia A utilizando PCR



Sítio do polimorfismo

Alteração na sequência do intron 18:

1. Splicing aberrante
2. Proteína não funcional
3. Perda do sítio para endonuclease BclI

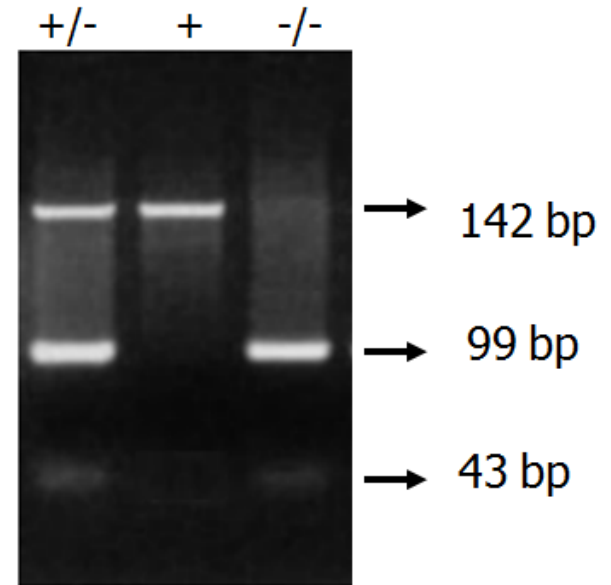
Deteção da mutação: amplificação do segmento de 142 bp do intron 18 por PCR, seguindo-se digestão com endonuclease BclI:

+/- alelo mutante/ alelo normal (portadora XX)

+ alelo mutante (XY)

-/- alelos normais (XX ou XY)

Diversos polimorfismos estão associados a hemofilia A (diversas mutações no gene do fator VIII)



Já existem plataformas totalmente integradas e automatizadas para diagnóstico molecular usando qPCR: Combinam preparação da amostra, PCR em tempo real e detecção

Detecção de micobactéria e de micobactéria resistente à rifampicina\* em ~2h

Evita a necessidade de cultivo da bactéria!

Rifampicina inibidor da RNAPolimerase

