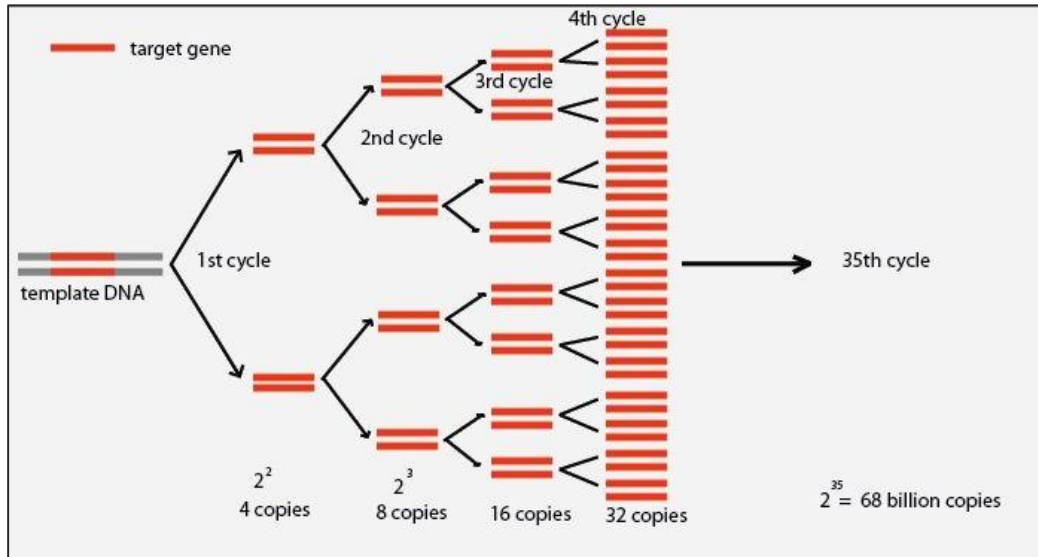


# Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)



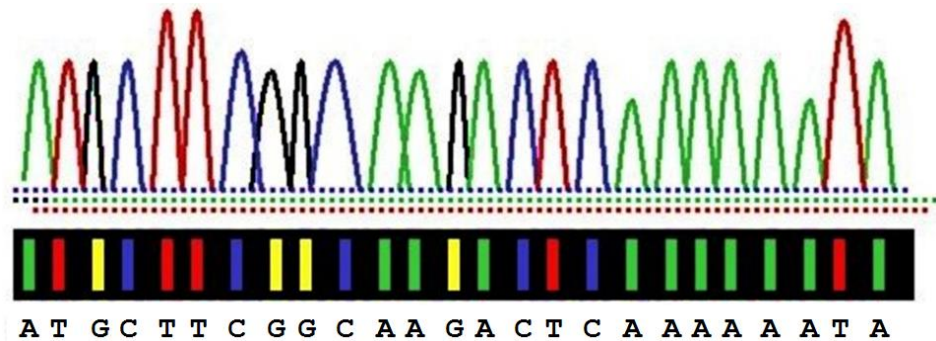
# Design de Primers



# Análise de sequências

		30		40		50		60																																				
V	E	E	A	K	K	V	K	P	T	V	V	N	A	A	N	V	Y	L	K	H	G	G	G	-	V	A	G	A	L	N	K	A	T	N	N	A	M	Q	V	E	S	I		
-	G	D	I	T	L	L	E	V	D	A	I	V	N	A	A	N	A	S	L	L	G	G	G	G	-	V	D	G	C	I	H	R	A	A	G	P	C	L	L	A	E	-	-	
-	S	D	I	T	K	L	E	V	D	A	I	V	N	A	A	N	A	S	L	L	G	G	G	G	-	V	D	G	C	I	H	R	A	A	G	P	L	L	T	D	E	-	-	
-	G	D	I	A	T	E	Q	V	D	V	I	V	N	S	T	A	R	T	F	N	R	K	S	G	-	V	S	R	A	I	L	E	G	A	G	Q	A	V	E	S	E	-	-	
-	G	D	I	T	K	E	E	A	D	V	I	V	N	S	T	S	N	S	F	N	L	K	A	G	-	V	S	K	A	I	L	E	C	A	G	Q	N	V	E	R	E	-	-	
-	G	D	V	L	Y	I	W	A	D	V	I	V	N	S	V	P	M	N	L	Q	L	G	G	G	P	L	S	R	A	F	L	Q	K	A	G	P	M	L	Q	K	E	L	I	-
-	E	G	V	Q	N	A	K	T	D	V	V	V	N	S	V	P	L	D	L	V	L	S	R	G	P	L	S	K	S	L	L	E	K	A	G	P	E	L	Q	E	E	L	I	-

# Sequenciamento de DNA



Nicolas Hoch  
QBQ2457 – 2023

Aula 2

## Como “re-combinar” DNA?

- Uma forma de cortar DNA para gerar um inserto



Enzimas de restrição

- Uma forma de ligar esse inserto em outro DNA

- Uma sequência de DNA “receptora” adequada



Plasmídeos

- Uma maneira de fazer cópias (clones) da nova molécula gerada

## Como “re-combinar” DNA?

- Uma forma de obter o DNA que desejamos clonar
- Uma forma de cortar DNA para gerar um inserto
- Uma forma de ligar esse inserto em outro DNA
- Uma sequência de DNA “receptora” adequada
- Uma maneira de fazer cópias (clones) da nova molécula gerada



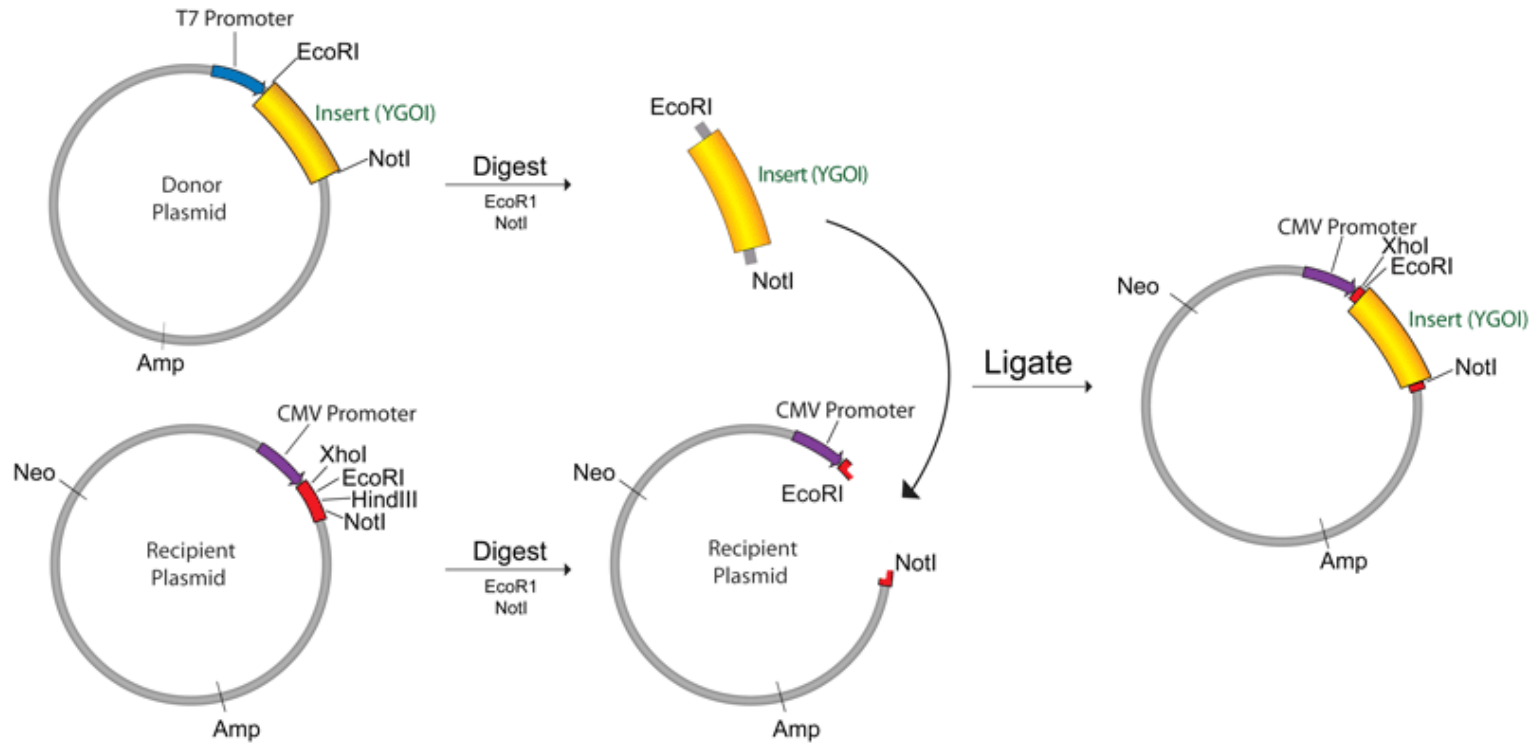
Enzimas de restrição



Plasmídeos

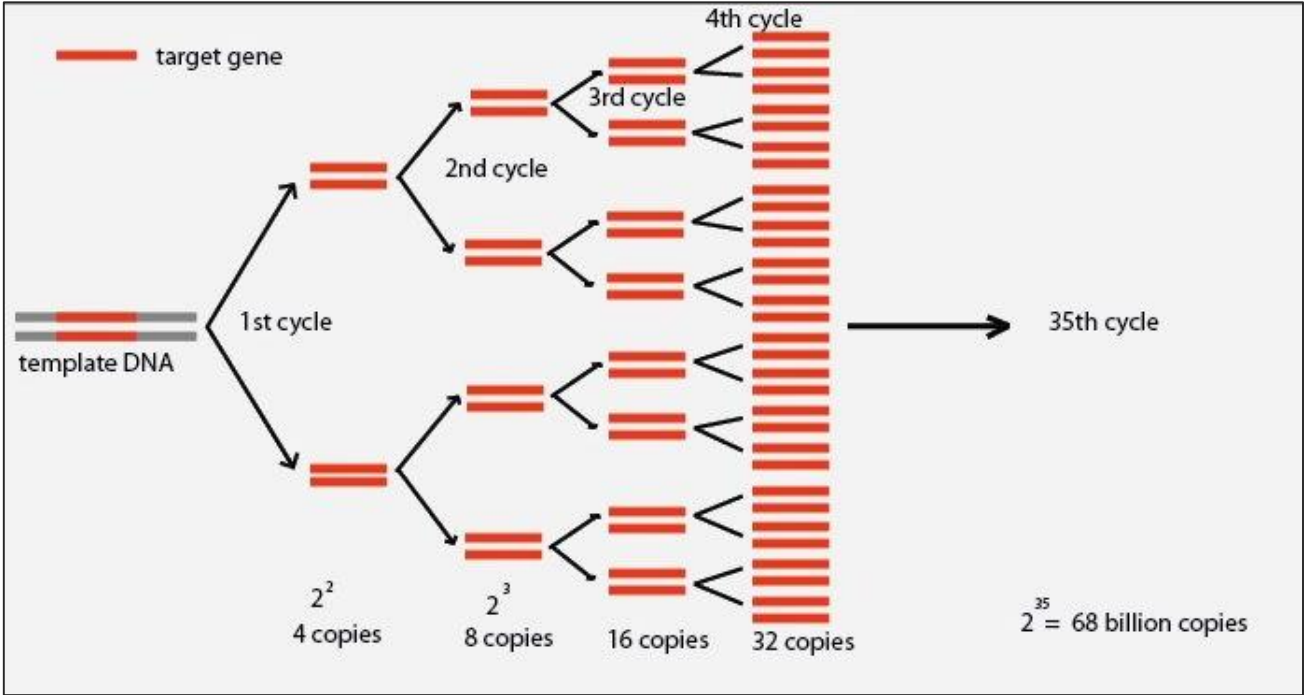
# Como obter o DNA de interesse?

Subclonagem não exige amplificação do DNA alvo

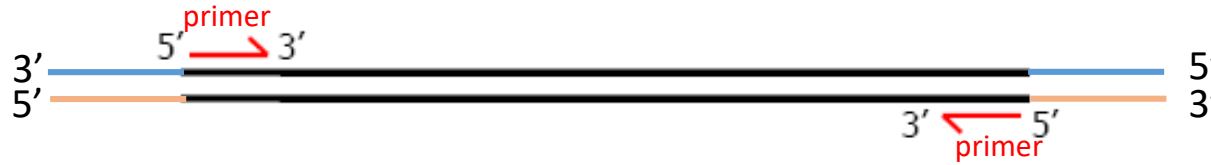


# Como obter o DNA de interesse?

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

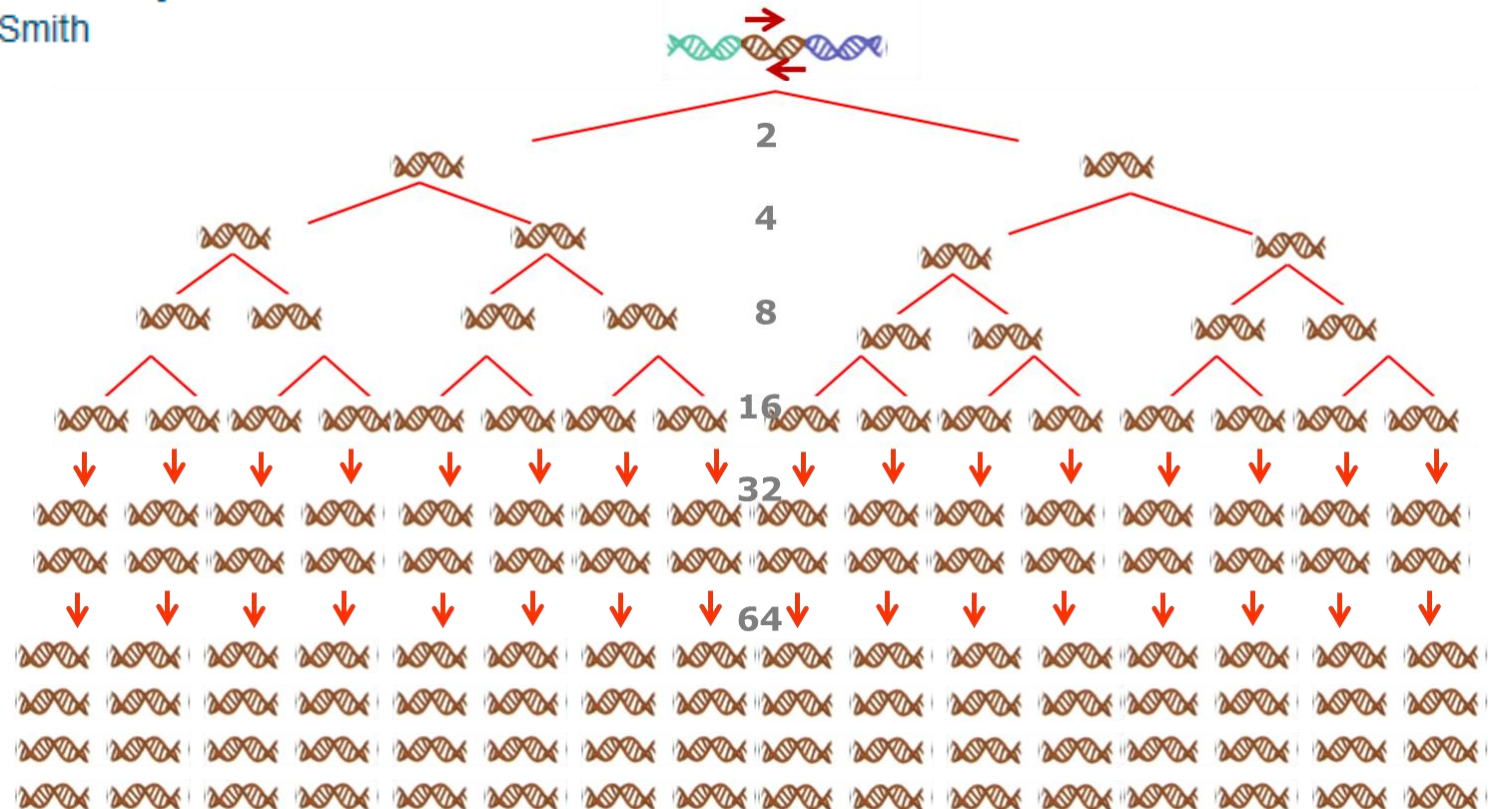


# PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

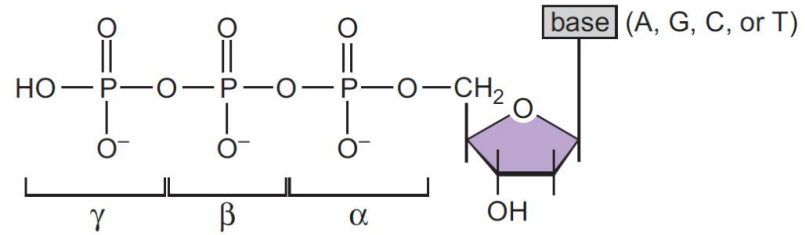


The Nobel Prize in Chemistry 1993

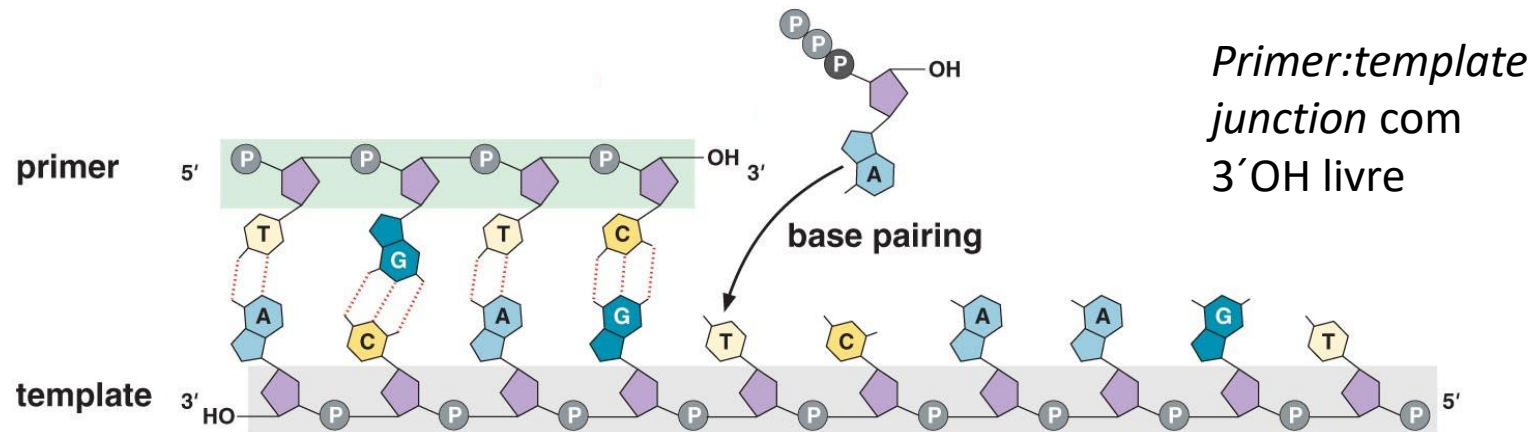
Kary B. Mullis, Michael Smith



# A química da replicação - substratos

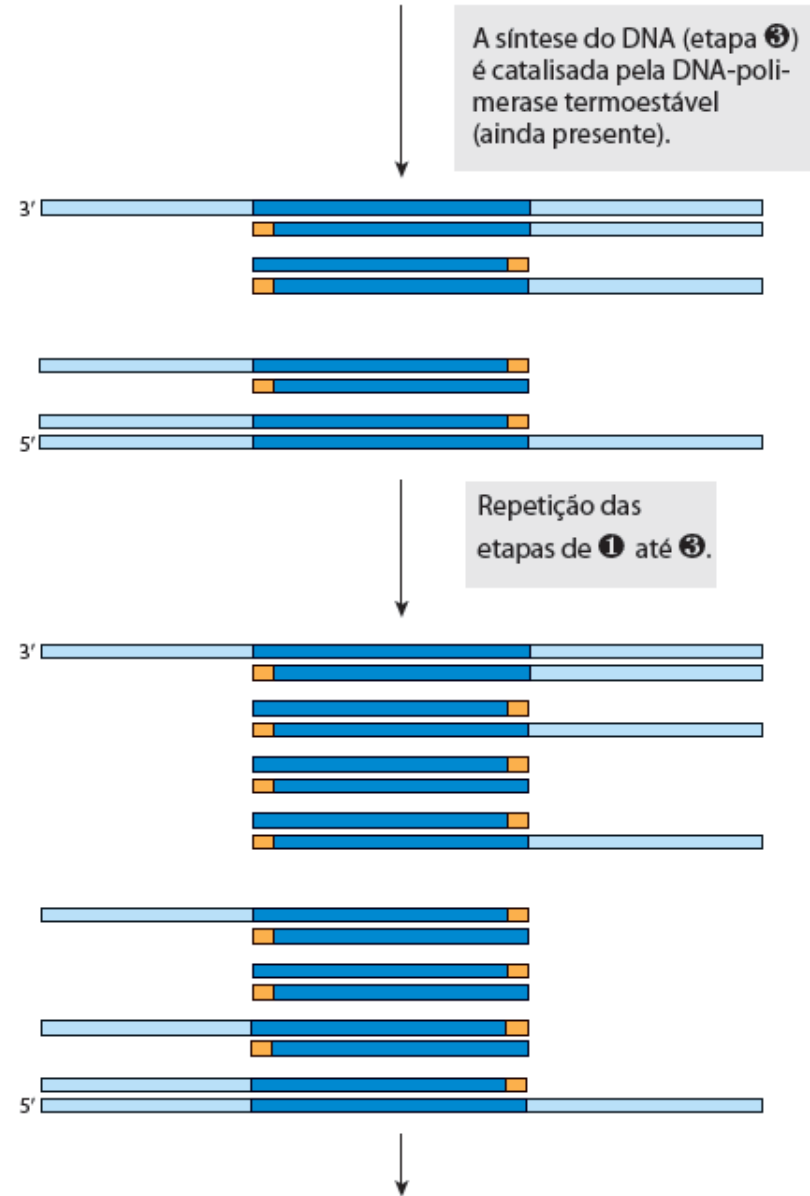
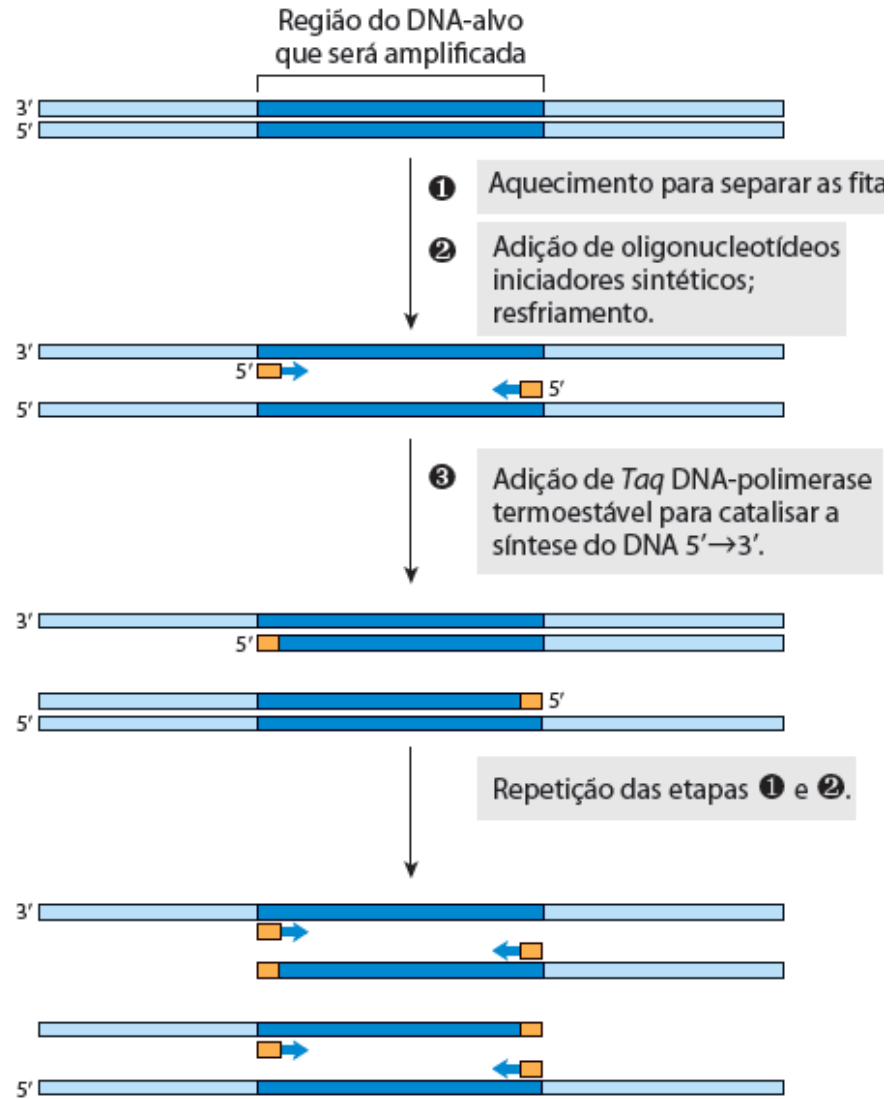


dNTPs



Pareamento de base com molde é que seleciona nucleotídeo a ser incorporado !

(a)



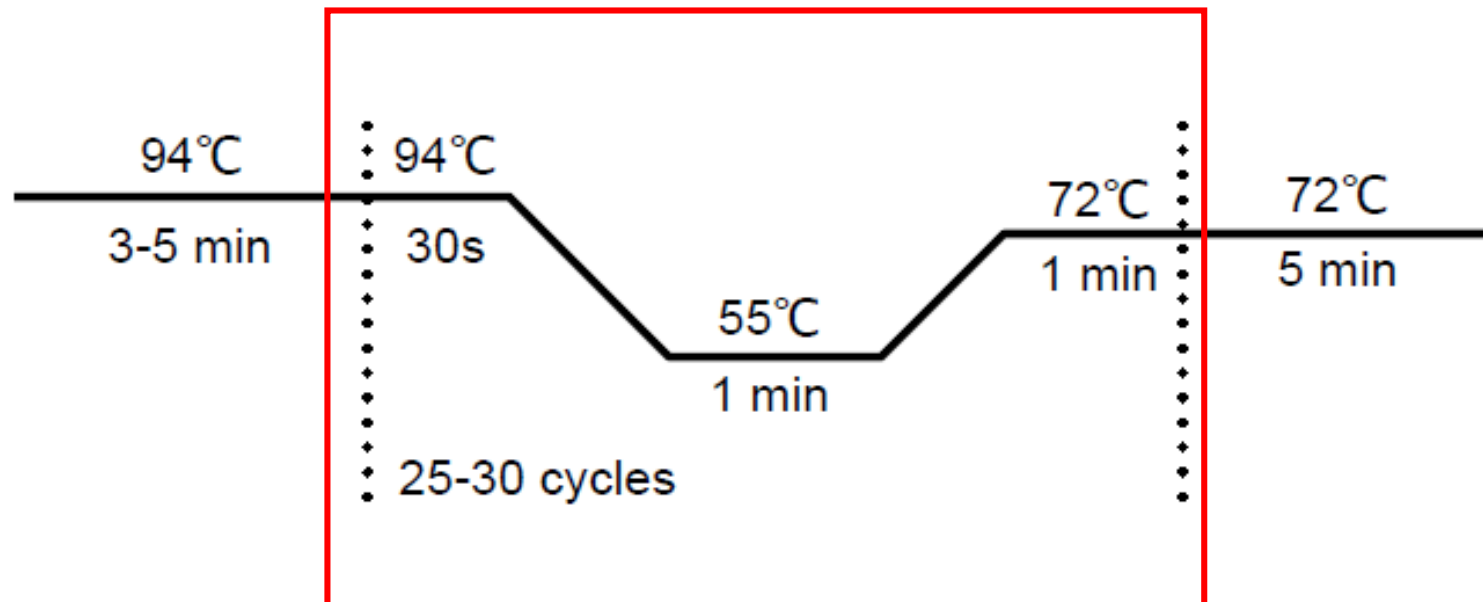
Após 20 ciclos, a sequência-alvo foi amplificada em cerca de  $10^6$  vezes.



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

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

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



# O que precisamos ter nesse tubo?

Água ultra-pura autoclavada

Solução de dNTPs

MgCl<sub>2</sub>

Primer Forward

Primer Reverse

Buffer *Taq* 10x

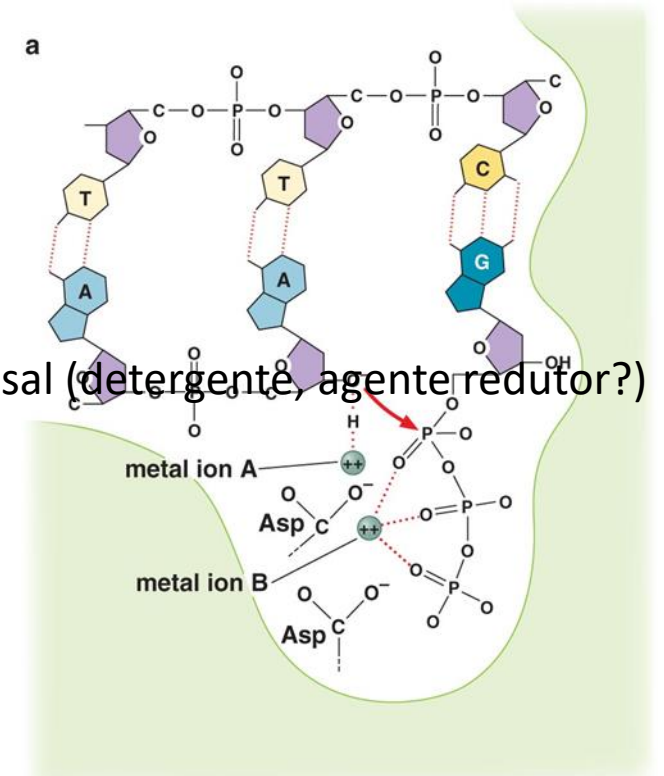
***Taq* Polimerase padrão (NEB, Invitrogen, ou equivalente)**

DNA molde (50ng/uL)\*

→ “tijolos”

→ co-fator da DNA polimerase

→ pH, sal (detergente, agente redutor?)



# Tipos de enzimas para PCR

- precisa ser termoestável (Taq)
- exonuclease (proofreading) = aumenta fidelidade
- domínio (ou proteína associada) que aumenta estabilidade da interação com DNA = aumenta processividade

PRODUCT NAME (SUPPLIER)	POLYMERASE FIDELITY (Reported by supplier)	MAXIMUM AMPLICON LENGTH <sup>5</sup>	EXTENSION TIME <sup>5</sup> (For simple templates <sup>4</sup> )	EXTENSION TIME <sup>5</sup> (For complex templates <sup>4</sup> )
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	~280X <i>Taq</i> <sup>1</sup>	20 kb simple; 10 kb complex	10 s/kb	10 s/kb (< 1 kb) 20–30 s/kb (> 1 kb)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB)	39X <i>Taq</i> <sup>1</sup>	20 kb simple; 10 kb complex	15 s/kb	30 s/kb
AccuPrime™ <i>Pfx</i> (Life)	26X <i>Taq</i> <sup>2</sup>	12 kb <sup>3</sup>	60 s/kb <sup>3</sup>	
<i>PfuUltra</i> ™ II Fusion HS (Agilent)	20X <i>Taq</i> <sup>2</sup>	19 kb <sup>3</sup>	15 s/kb (< 10 kb <sup>3</sup> ) 30 s/kb (> 10 kb <sup>3</sup> )	
<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerase (Agilent)	19X <i>Taq</i> <sup>2</sup>	17 kb simple; 6 kb complex	60 s/kb (< 10 kb) 120 s/kb (> 10 kb)	60 s/kb (< 6 kb) 120 s/kb (> 6 kb)
KOD DNA Polymerase (EMD)	12X <i>Taq</i> <sup>1</sup>	6 kb simple; 2 kb complex	10–20 s/kb	30–60 s/kb
Platinum <i>Taq</i> HiFi (Life)	6X <i>Taq</i> <sup>2</sup>	20 kb <sup>3</sup>	60 s/kb <sup>3</sup>	

# O que precisamos ter nesse tubo?

Água ultra-pura autoclavada

---

Solução de dNTPs

---

MgCl<sub>2</sub>

---

Primer Forward

---

Primer Reverse

---

Buffer *Taq* 10x

---

*Taq* Polimerase padrão (NEB,  
Invitrogen, ou equivalente)

---

DNA molde (50ng/uL)\*

# Fontes de DNA molde?

- DNA genômico
- DNA previamente clonado em outro vetor
- DNA complementar (cDNA)

Extrair RNA → transcriptase reversa + primers oligodT ou de sequência aleatória → cDNA

(portanto, cDNA não tem regiões regulatórias, íntrons, etc. e pode conter isoformas diferentes → splicing alternativo)

# O que precisamos ter nesse tubo?

Água ultra-pura autoclavada

---

Solução de dNTPs

---

MgCl<sub>2</sub>

---

Primer Forward

---

Primer Reverse

---

Buffer *Taq* 10x

---

*Taq* Polimerase padrão (NEB,  
Invitrogen, ou equivalente)

---

DNA molde (50ng/uL)\*

# Características de um bom primer?

- Precisa ser complementar à sequência de interesse (e APENAS essa sequência de interesse)
- O par de primers precisa gerar um produto de tamanho compatível com as condições de PCR (definidos pela enzima + tempo de extensão – geralmente algo na casa de 100pb a 2kb, mas pode chegar a 15 ou 20kb)
- %GC razoável (afeta Tm)
- Tm dos dois primers parecida entre eles
- Evitar sequências que podem formar estruturas secundárias
- Evitar dímeros entre primers (entre moléculas do mesmo primer “self-dimer” ou entre moléculas do par – “cross-dimer”)
- Porção 5’ do primer rica em GC, porção 3’ rica em AT → maior especificidade (reduz chance da polimerase amplificar sequência semelhante à porção 3’)
- Porção 3’ do primer rica demais em AT → menor eficiência da reação (pareamento incompleto) → 3’ GC clamp



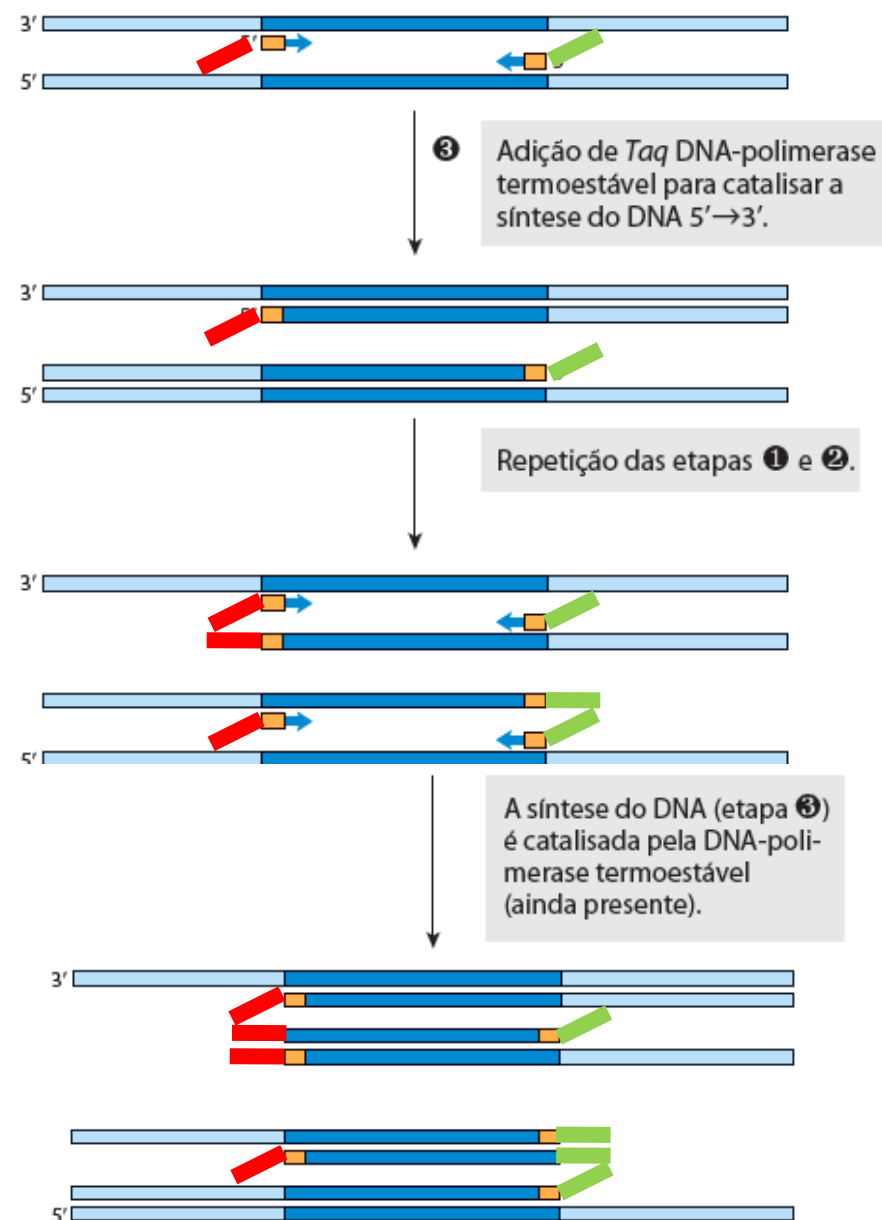
# Posso adicionar sequência adicional (não complementar ao alvo)?

SIM!

Como o PCR funciona nesse caso e qual será a sequência do produto?

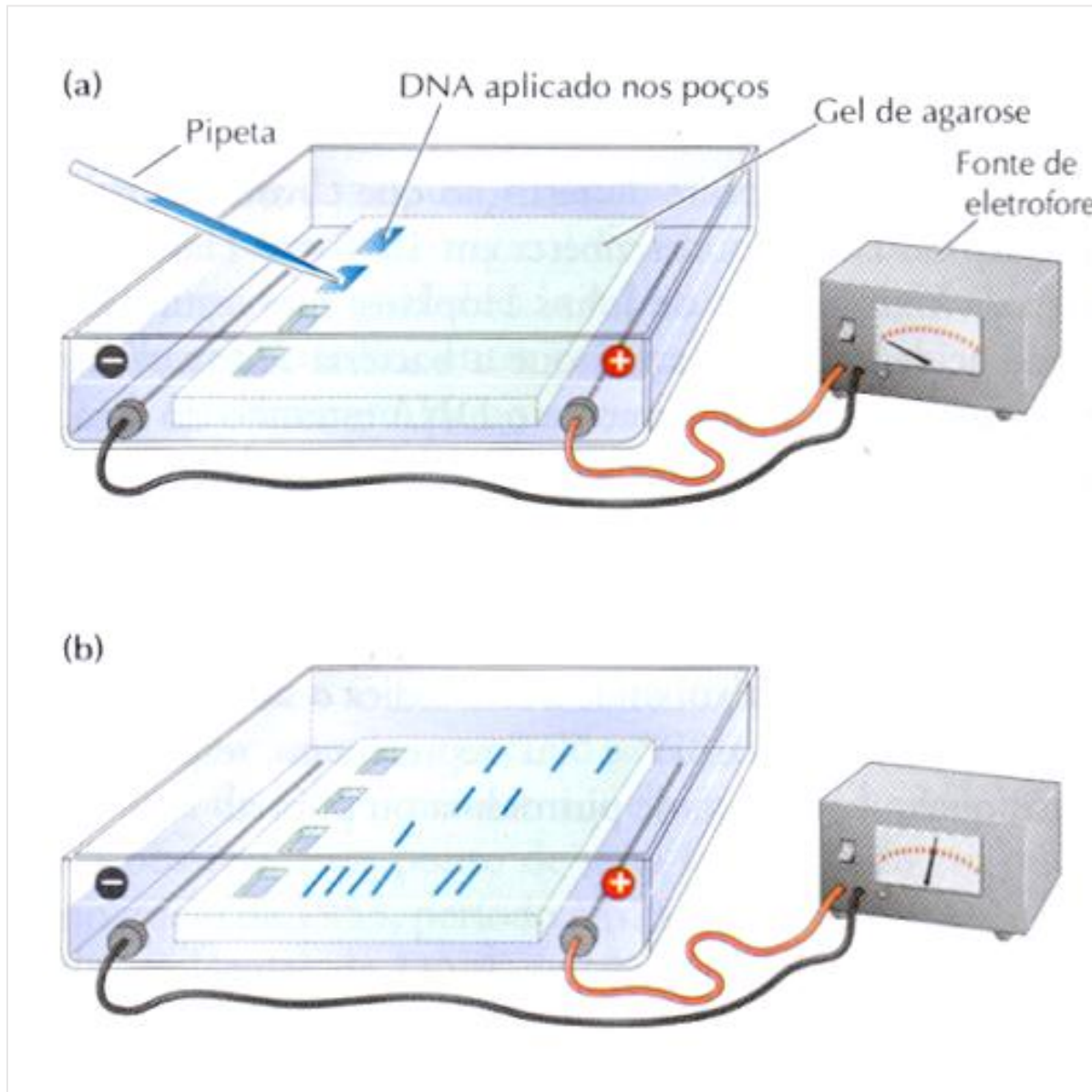
Utilidade disso:

- Inserir sítio para enzima de restrição na ponta do primer
- Incluir tags pequenos (6x HIS, Myc, FLAG, etc)
- Ajeitar o quadro de leitura do produto para clonagem in-frame
- Outros elementos para auxiliar clonagem (outra aula)

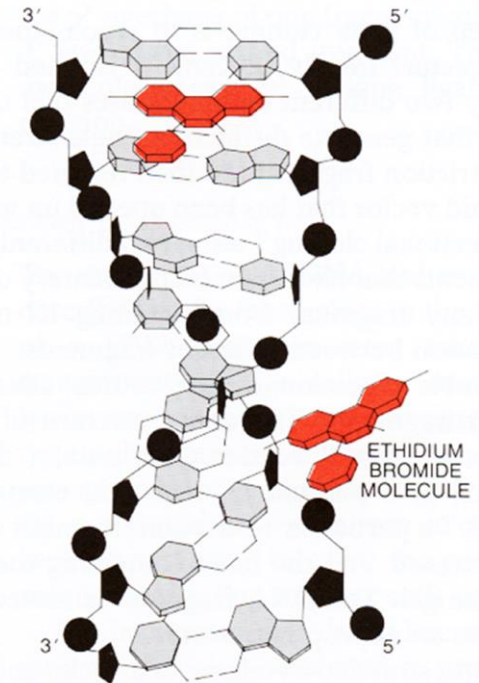
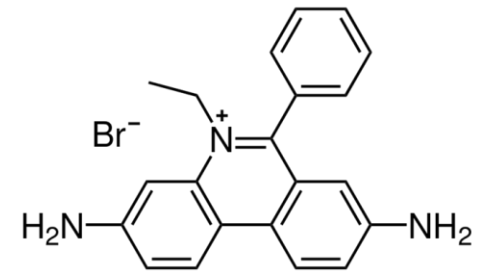




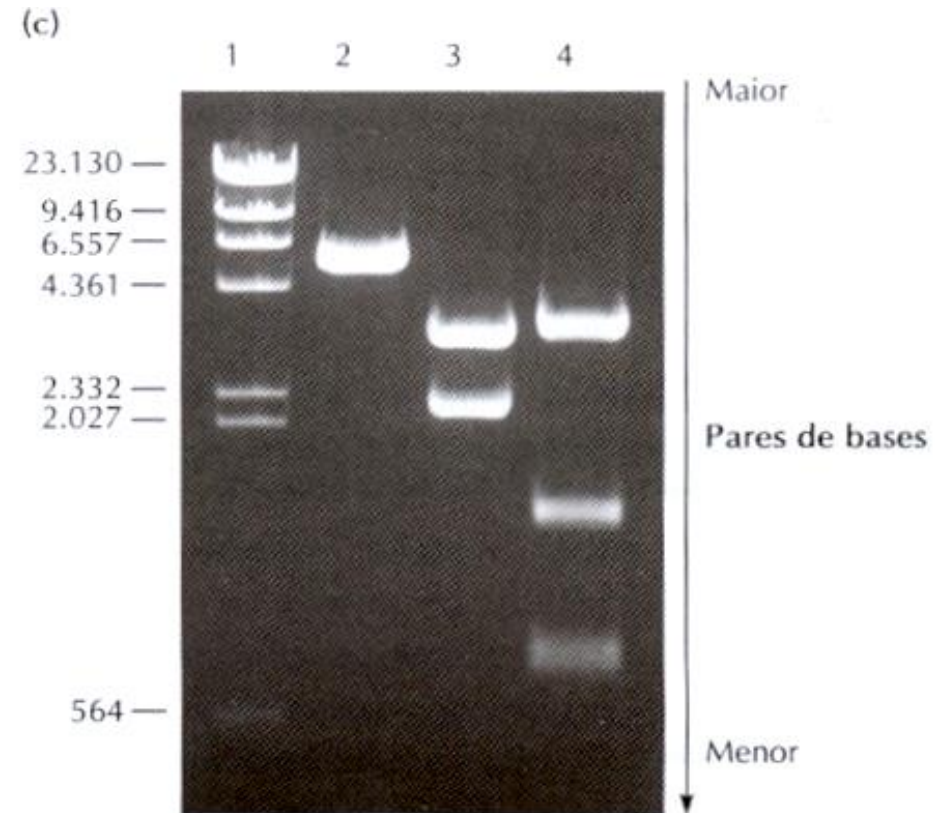
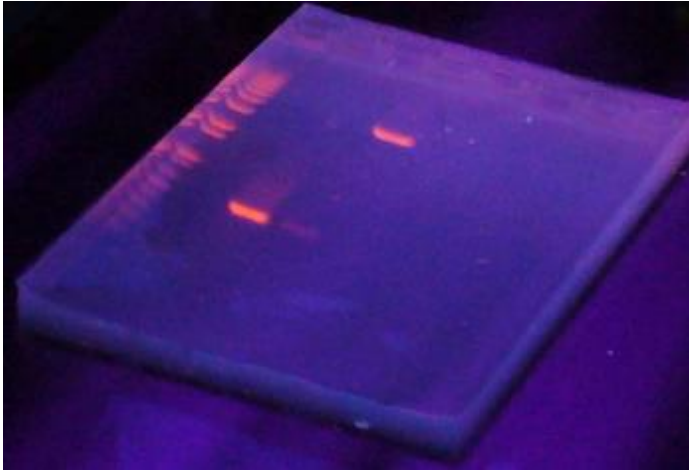
# Eletroforese em Gel de Agarose



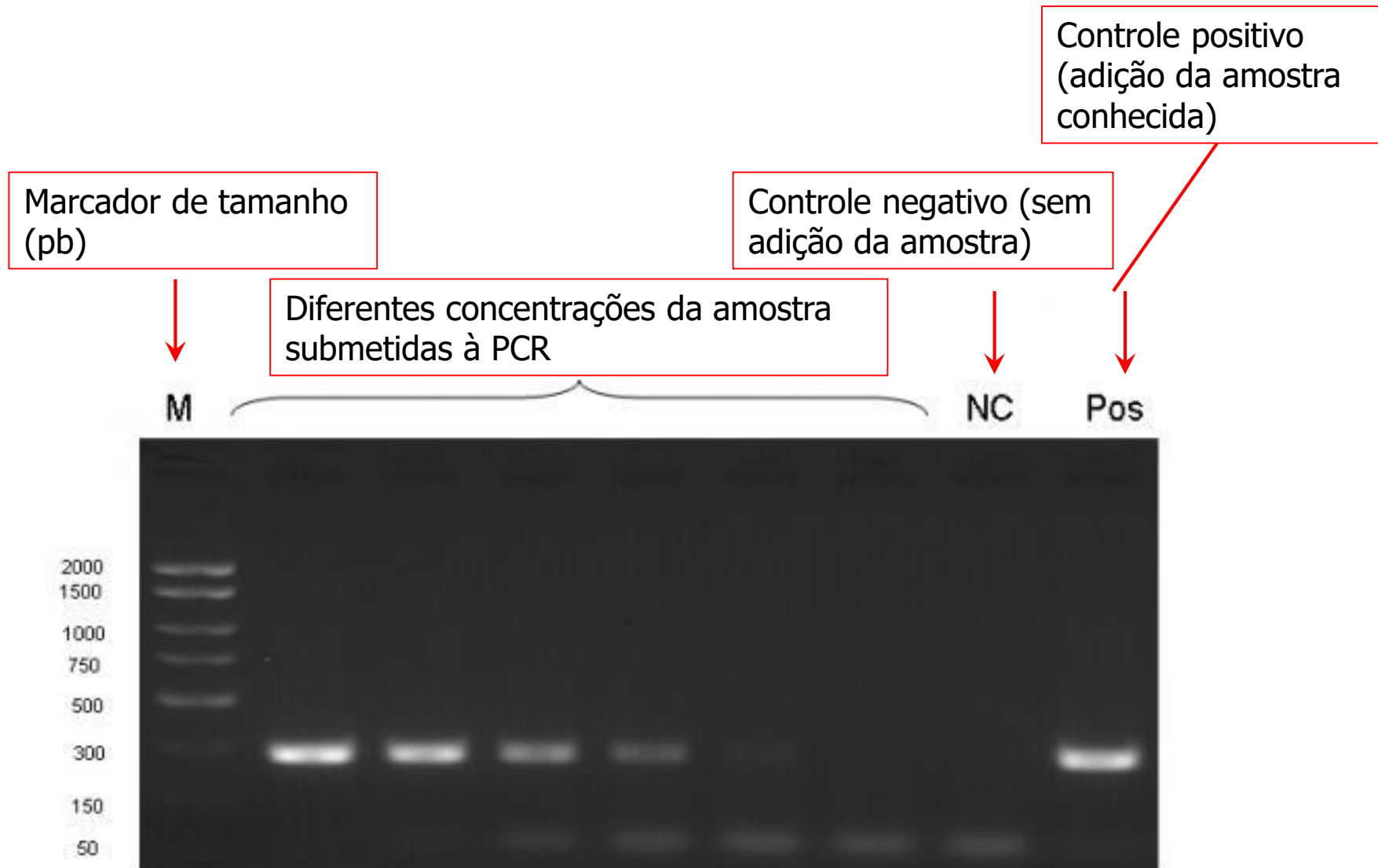
Brometo de Etídio



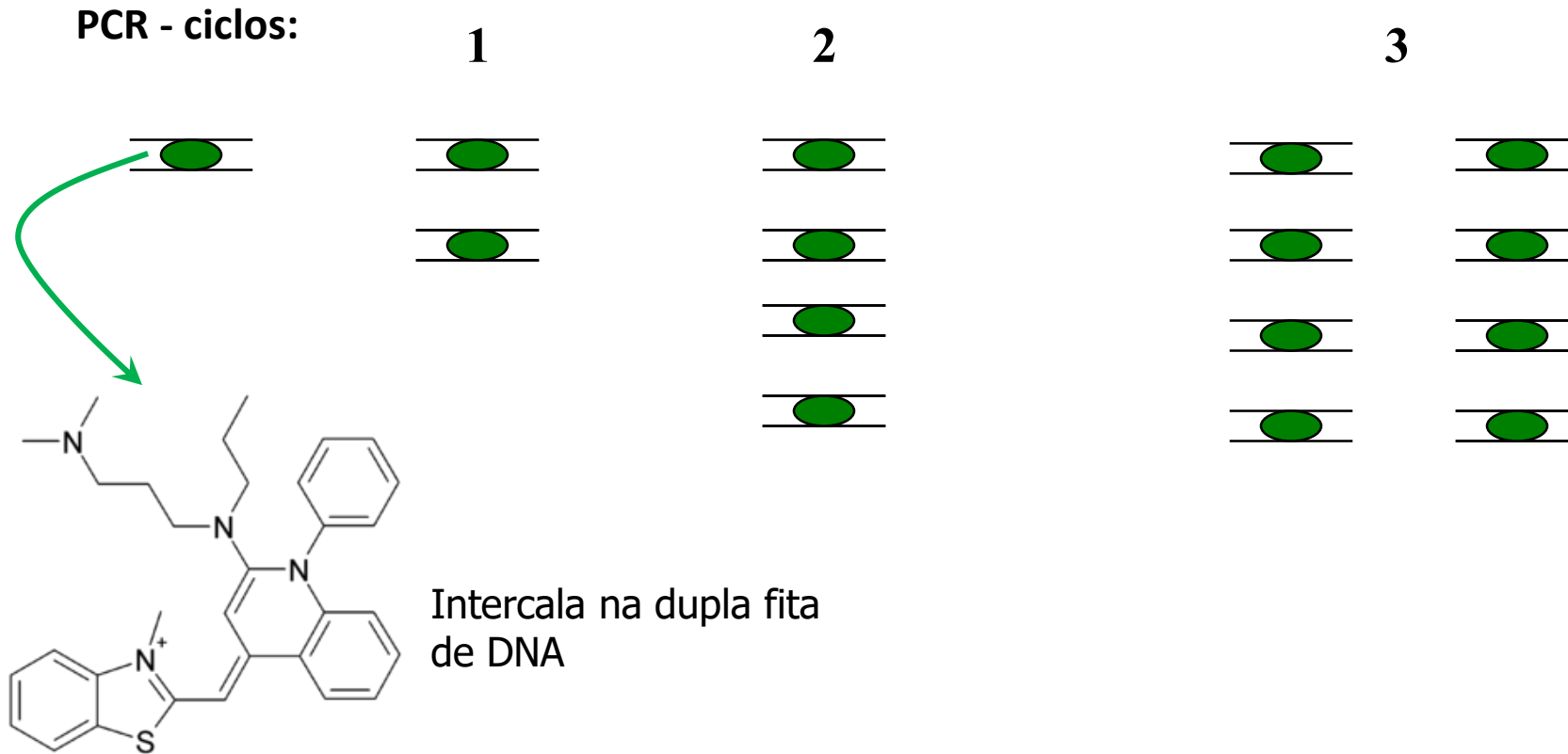
# Eletroforese em Gel de Agarose



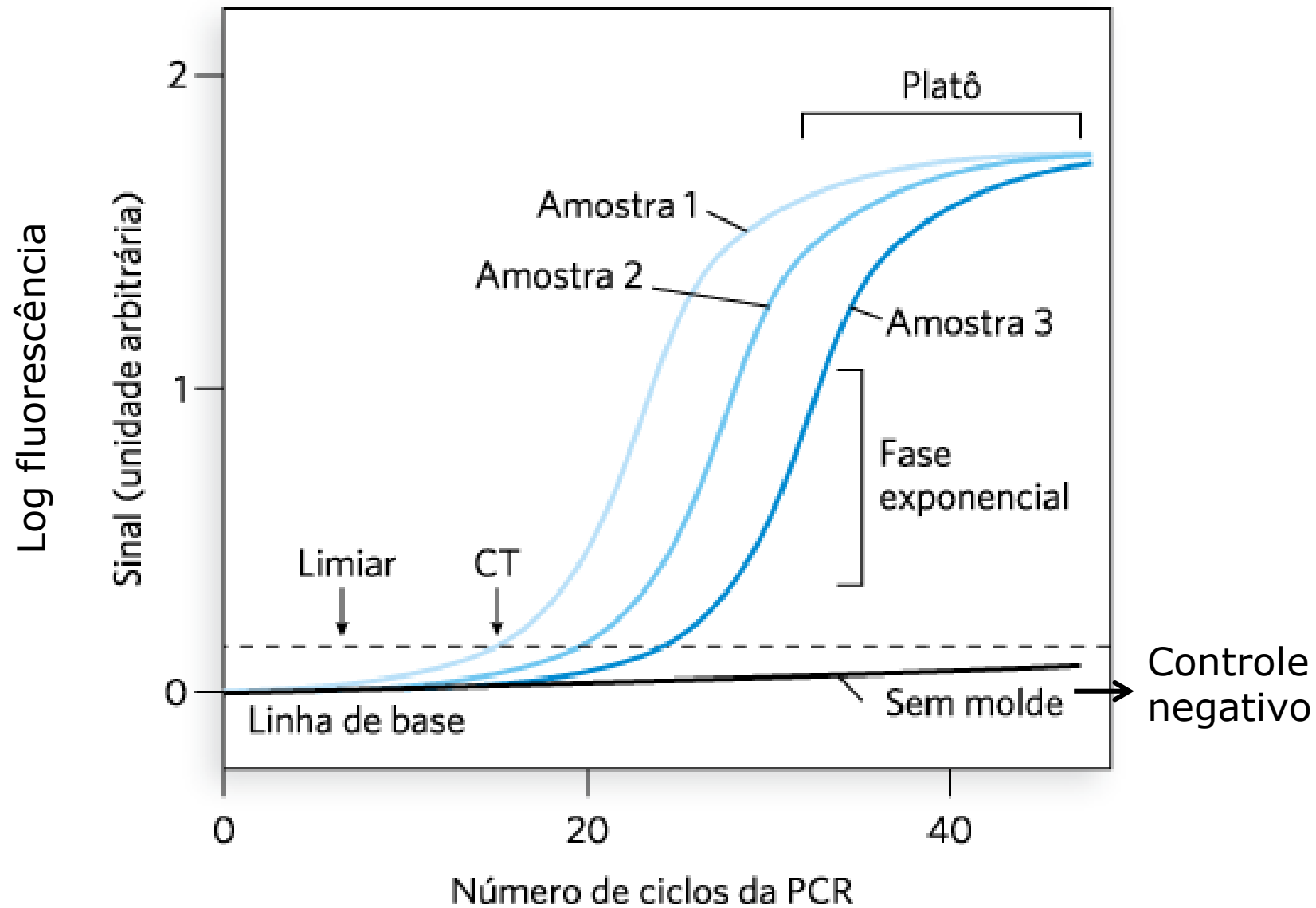
# PCR convencional é semi-quantitativo



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



A fluorescência do Sybr Green é proporcional à 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*)

# Esclarecendo a nomenclatura

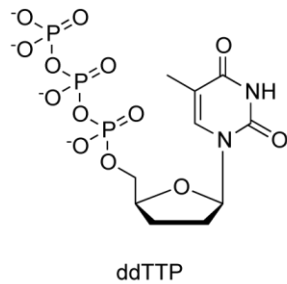
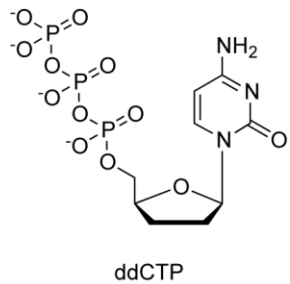
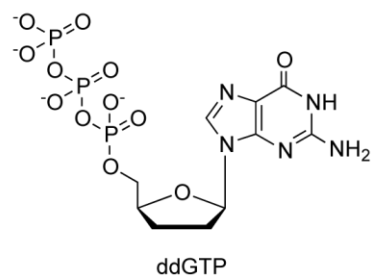
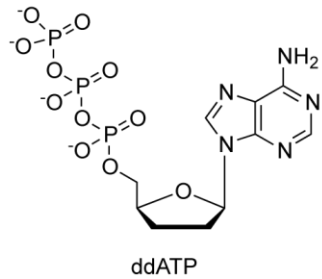
qPCR → PCR quantitativo (usando tecnologia real-time)

RT-PCR → termo dúbio, pode ser “Real-time”-PCR mesmo (ou seja qPCR a partir de DNA) ou “Reverse Transcriptase”-PCR, ou seja, PCR a partir de cDNA (geralmente a pessoa está se referindo a RT-qPCR)

RT-qPCR → deixa claro que foi feito cDNA usando reverse transcriptase e depois real time para quantificar

Sabendo que o genoma de SARS-CoV-2 é feito de RNA, qual dessas técnicas é usada para diagnóstico?

# Sequenciamento de Sanger é uma variante de PCR



Método original =  
4 reações separadas  
uma com cada terminador  
Correr gel

Hoje em dia=  
Uma reação com os quatro  
Eletroforese capilar  
Leitor de fluorescência

- dNTPs terminadores de cadeia
- reação também contém dNTPs comuns (mais do que os terminadores)
- Usa-se apenas um primer
- Os produtos são terminados aleatoriamente
- Separação por tamanho e/ou detecção do nucleotídeo terminador

