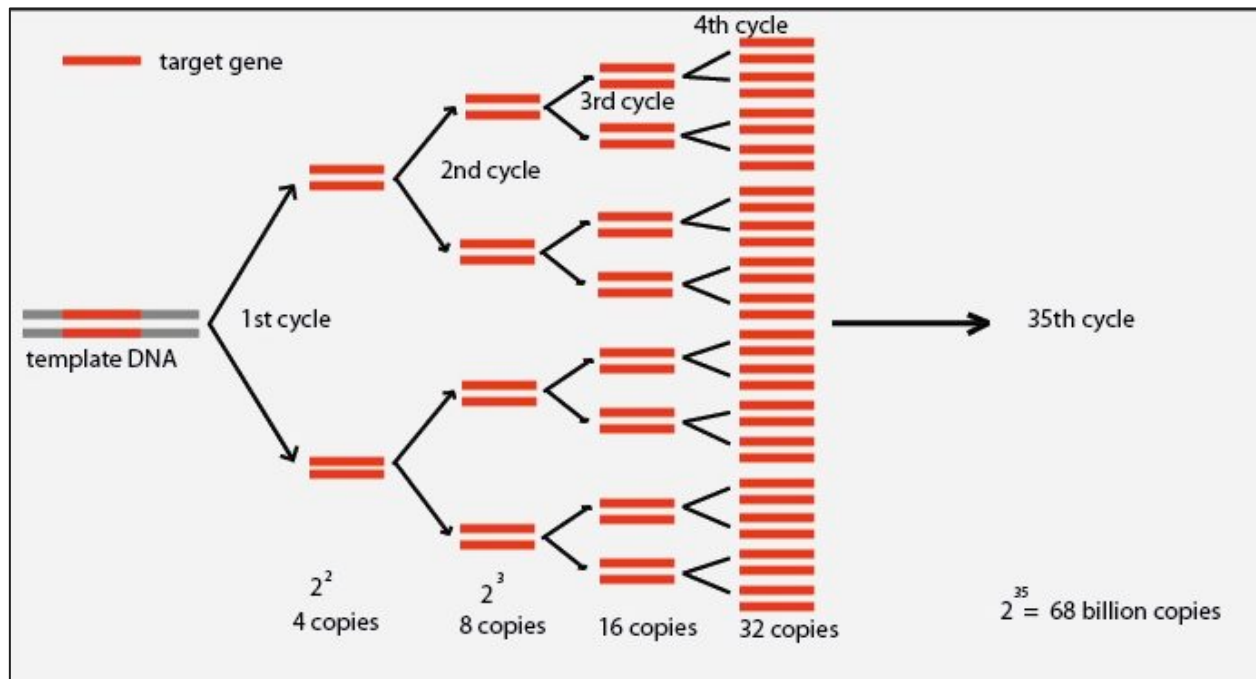
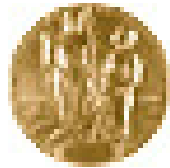


QBQ1354 - Biologia Molecular 2023



Reação em Cadeia da Polimerase
(PCR)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase



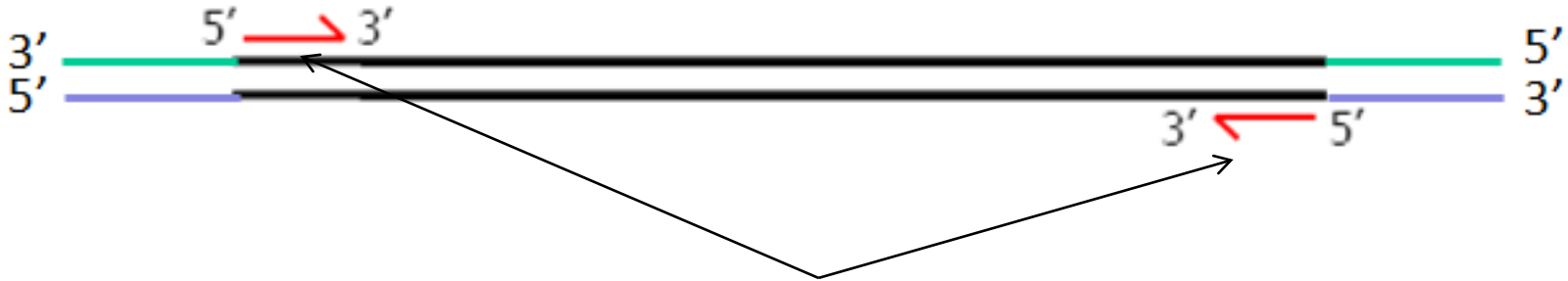
The Nobel Prize in Chemistry 1993

Kary B. Mullis, Michael Smith

- Desenvolvida por Kary Mullis em 1983
- Revolucionou a biologia molecular
- Um método *in vitro* rápido, sensível e versátil para **amplificação seletiva de sequências de DNA** a partir de amostras de ácidos nucleicos puras ou complexas
- “No tubo de ensaio”, a PCR produz quantidades de DNA suficientes para análises subsequentes:

Ex. diagnóstico molecular de patógenos, clonagem de genes de interesse.

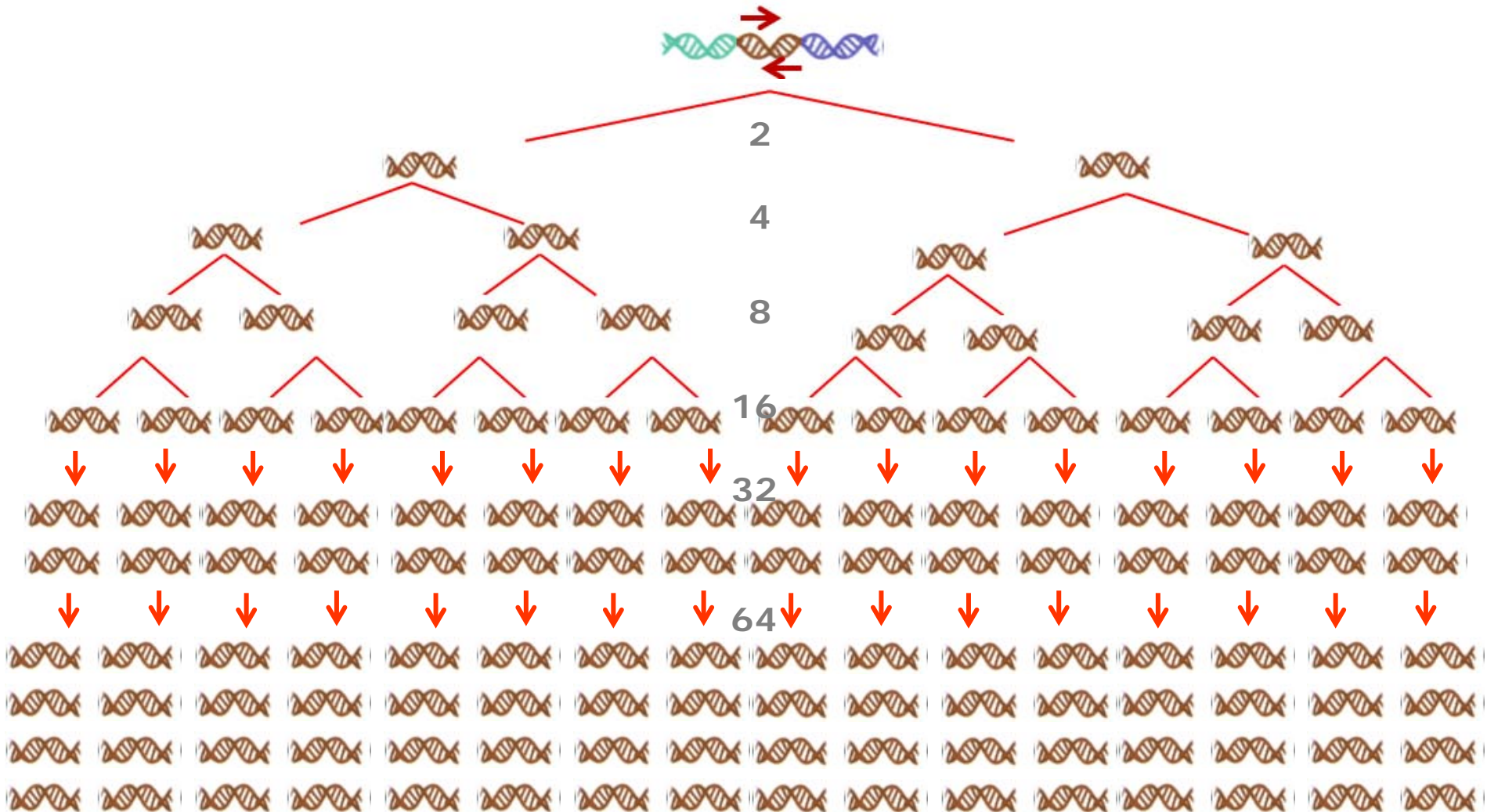
PCR: amplificação de um segmento de DNA



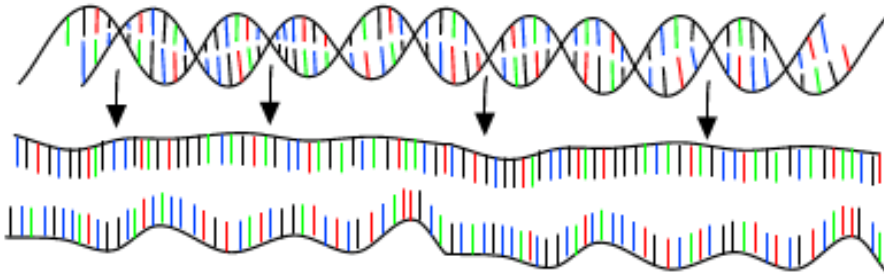
- Requer o anelamento de **dois iniciadores** ("primers"), pequenos oligonucleotídeos de DNA complementares a trechos da sequência que flanqueia a região alvo a ser amplificada.
- Requer a ação da enzima **DNA polimerase** para sintetizar novas cópias idênticas a região alvo a ser amplificada

Portanto as sequências que flanqueiam a região a ser amplificada devem ser conhecidas!

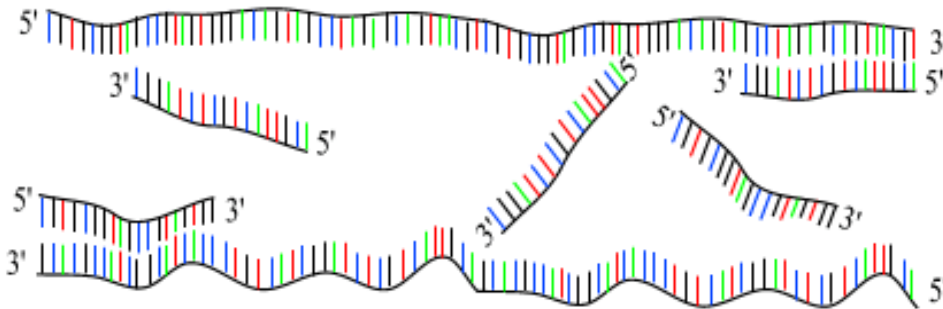
PCR: permite a amplificação exponencial de um trecho de DNA



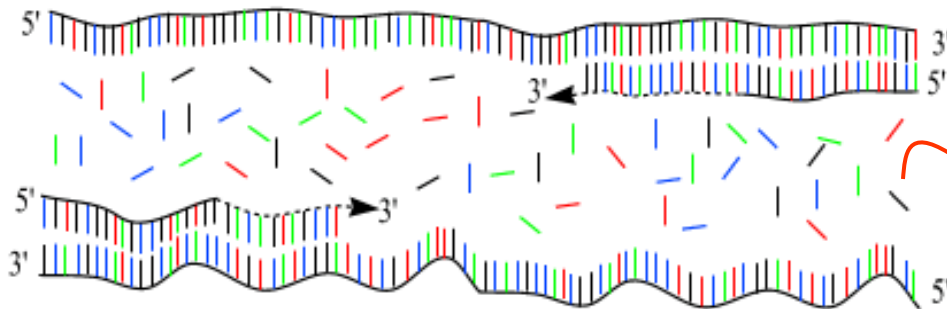
As reações de PCR envolvem ciclos com três etapas, repetidos várias vezes (25-35x)



Etapa 1: Desnaturação da fita dupla do DNA molde

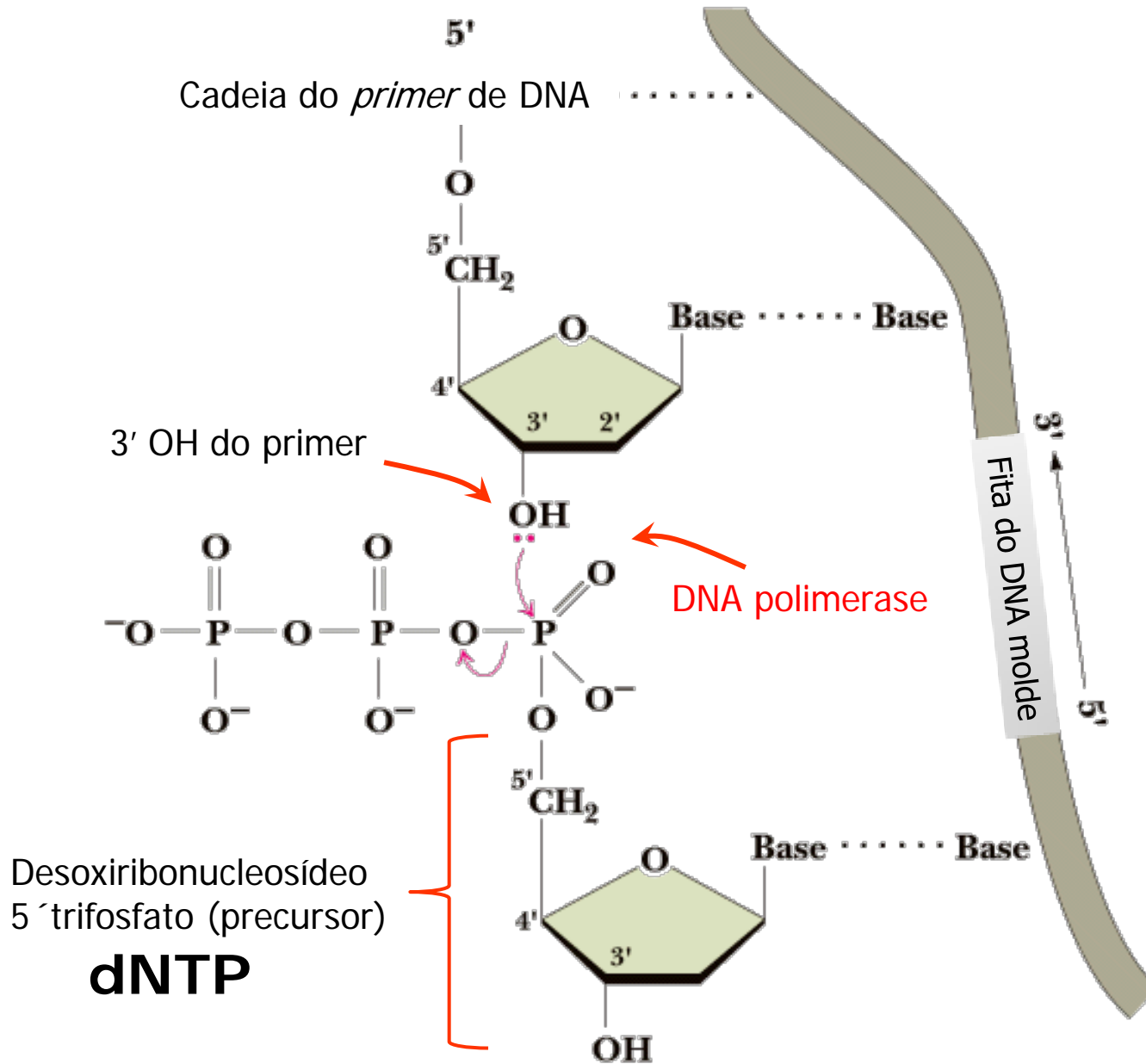


Etapa 2: Anelamento dos oligonucleotídeos diretos e reversos (forward and reverse primers)



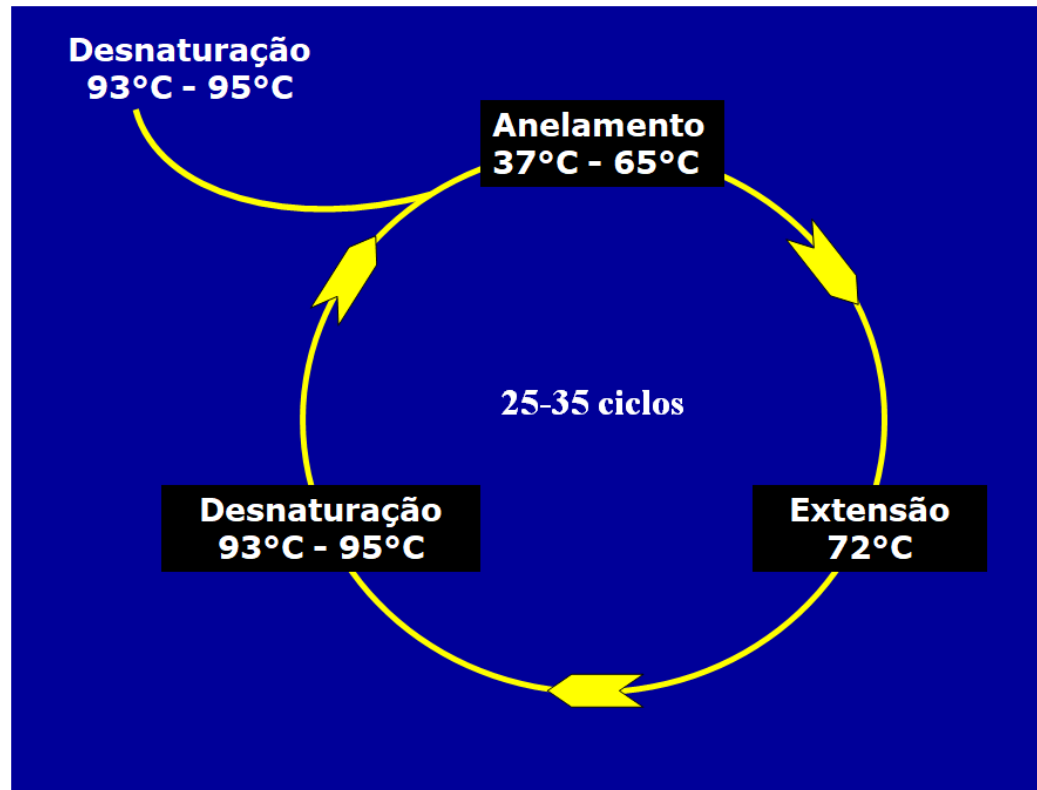
Etapa 3: Extensão dos *primers* (polimerização do DNA)

dNTPs



As etapas de cada ciclo da PCR são definidas por variações na temperatura

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



DNA polimerase para PCR tem que ser termoestável!

Taq Polimerase

DNA polimerase termoestável isolada da bactéria
Thermus aquaticus



Reagentes necessários para a PCR:

- DNA molde
- Um par de oligonucleotídeos iniciadores (18 a 30 nt em geral)
- DNA polimerase termoestável (**Taq DNA polimerase**)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Tampão (deve incluir $MgCl_2$, necessário para atividade da DNA polimerase)



DNA
molde



Iniciadores
("primers")



Taq DNA
polimerase

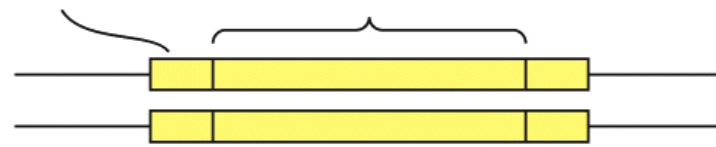


dNTPs



Tampão e
cofatores
(Mg^{2+})

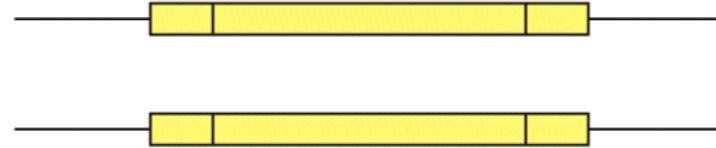
Primeiro ciclo



94°C

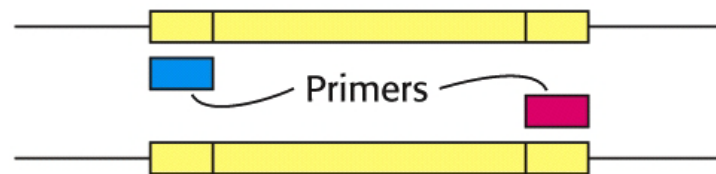
①

Adicionar excesso de primers e desnaturar a dupla fita



②

Esfriar para ocorrer o anelamento dos primers a fita molde



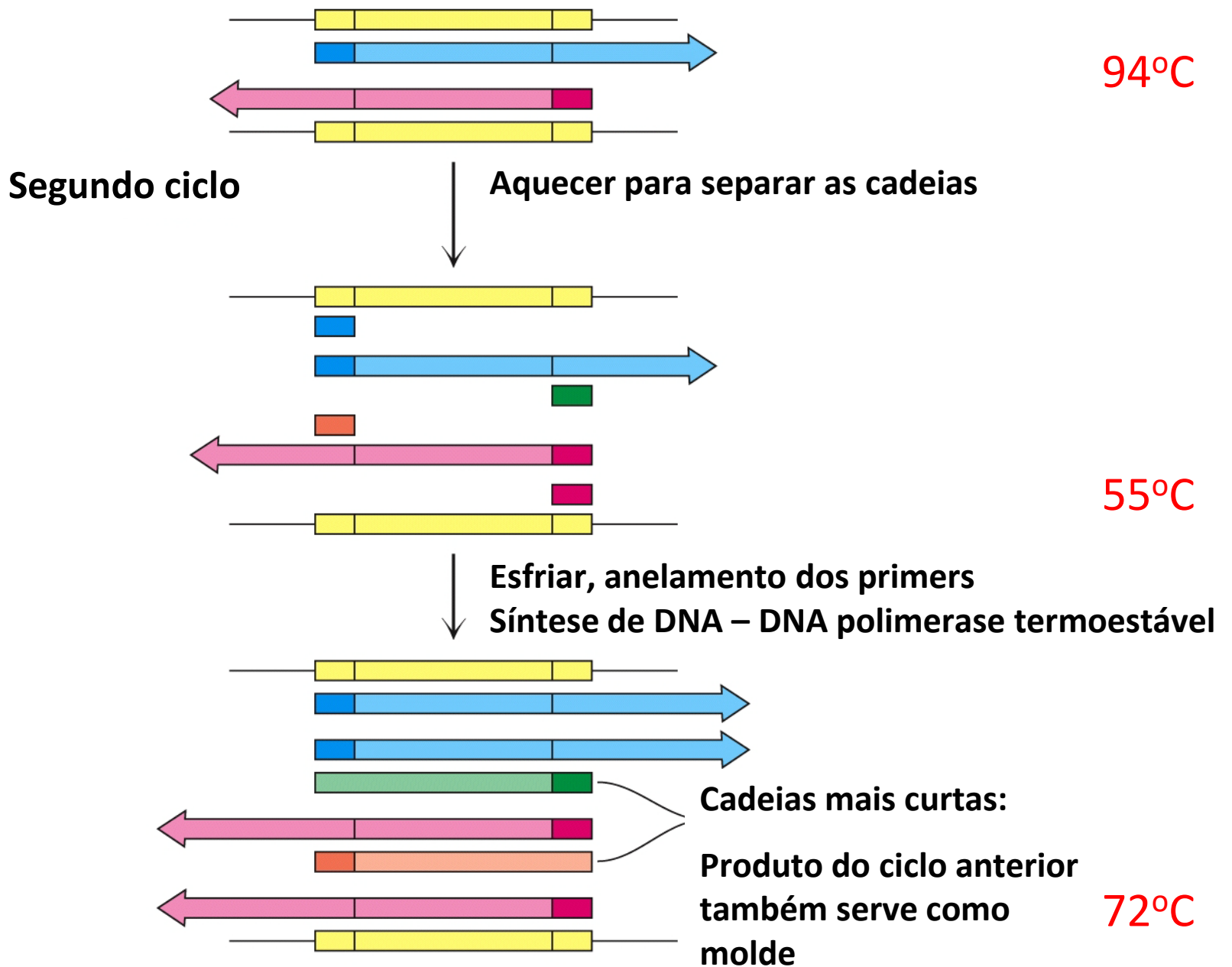
55°C

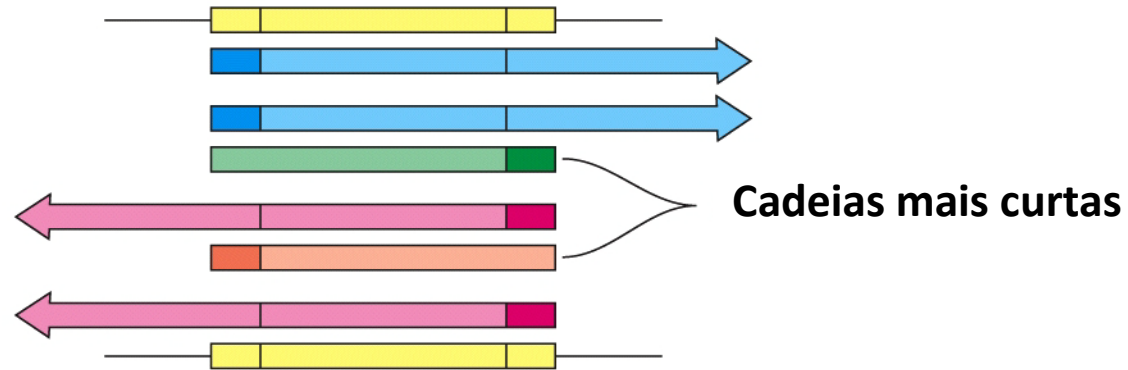
③

Síntese de novas cadeias de DNA pela DNA polimerase termoestável



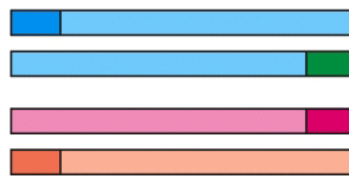
72°C





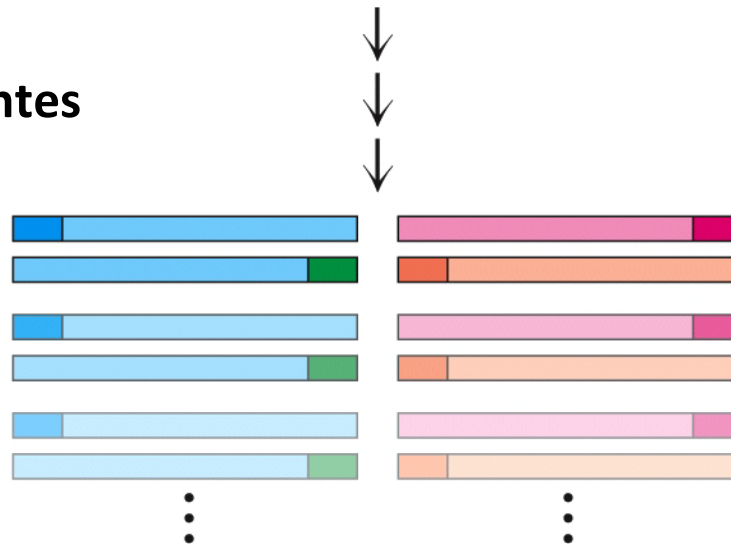
Terceiro ciclo

Aquecer, anelamento dos primers, síntese de DNA



Cadeias mais curtas serão amplificadas exponencialmente

Ciclos subsequentes



Ao final, muito mais cópias do *amplicon* do que do DNA molde original

PCR: amplificação **exponencial** do DNA alvo

CICLOS

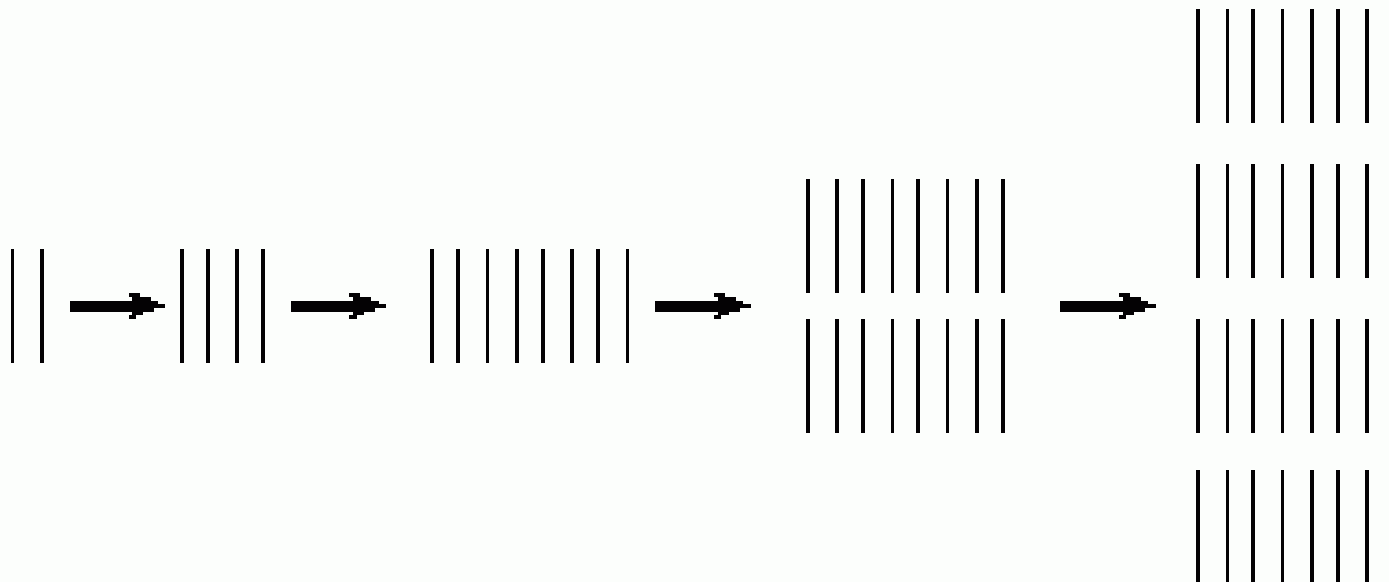
1

2

3

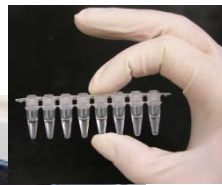
4

5



<https://youtu.be/2KoLnIwoZKU>

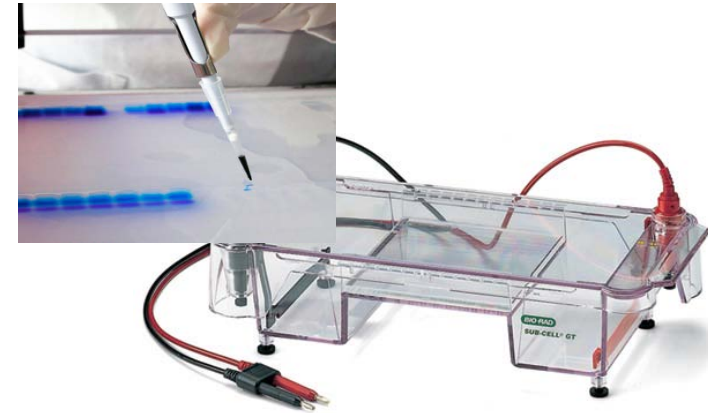
PCR



Análise do resultado através de eletroforese em gel de agarose



Termociclador



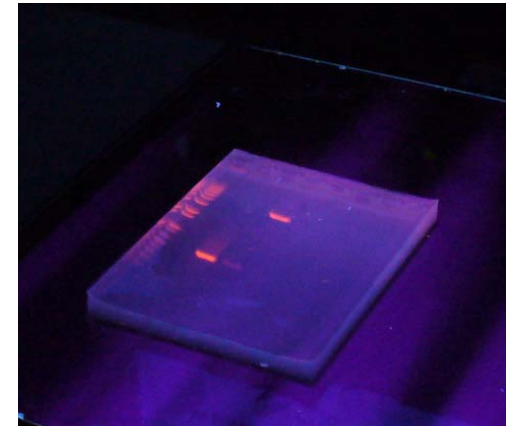
2-4 horas



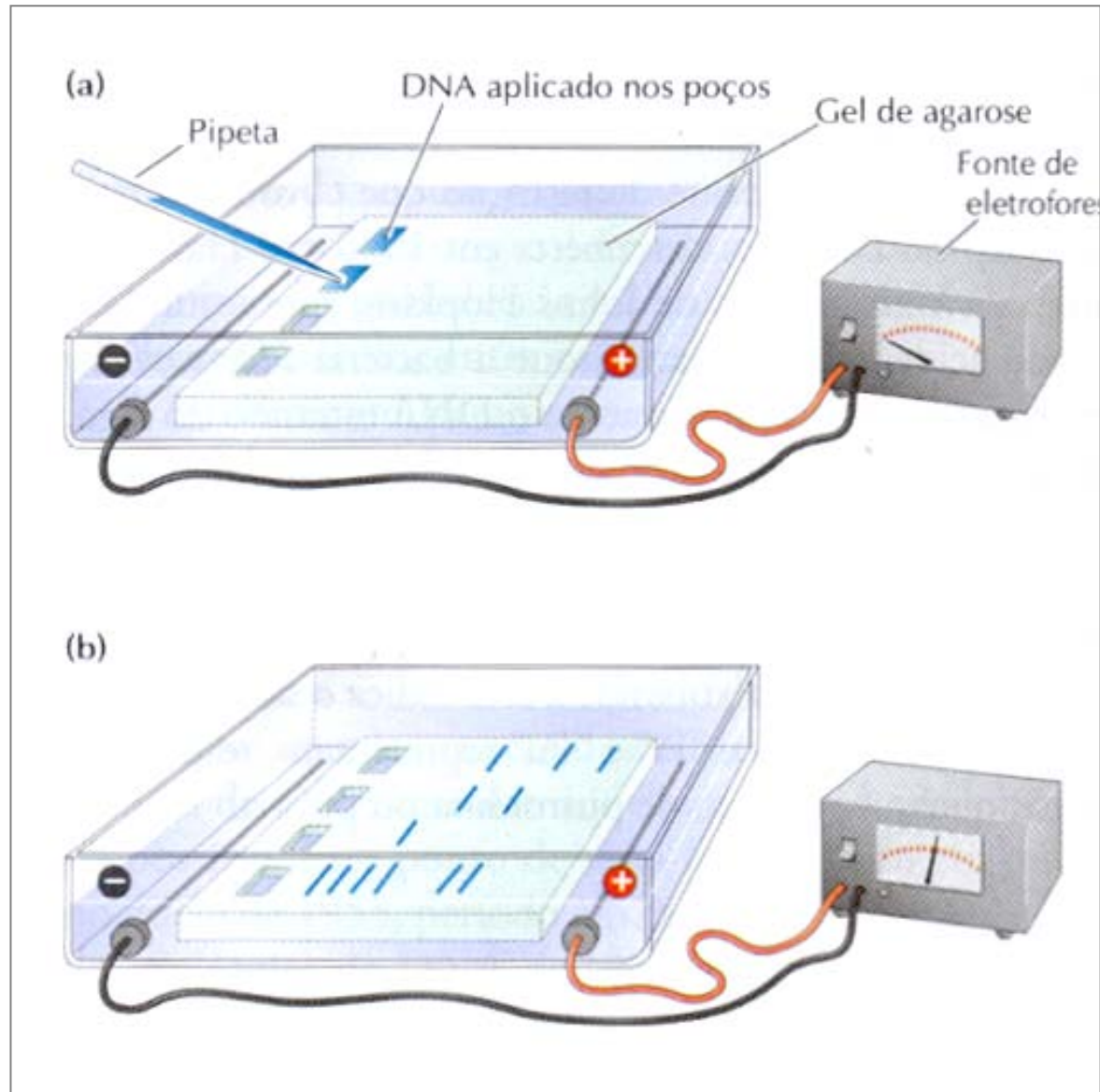
Imagem do gel mostrando os produtos de PCR obtidos (amplicon)



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

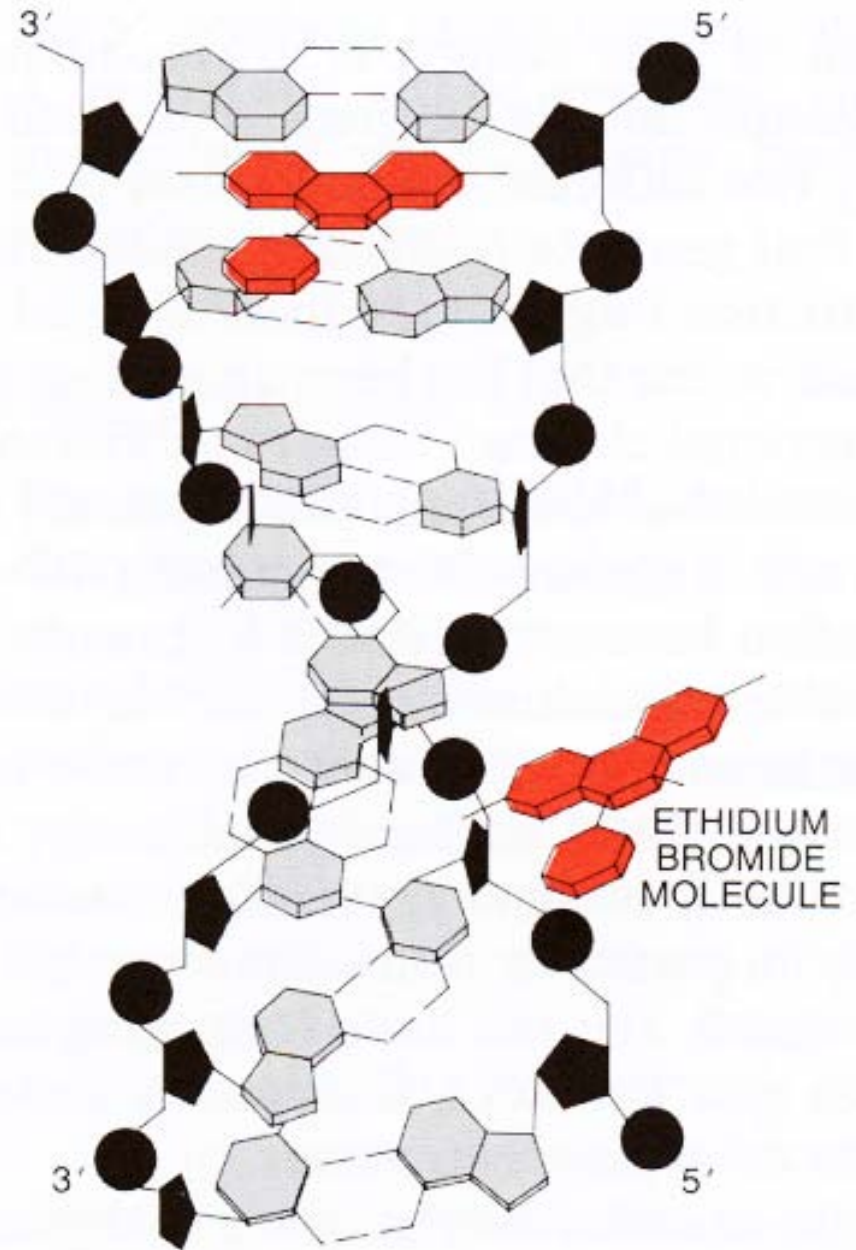
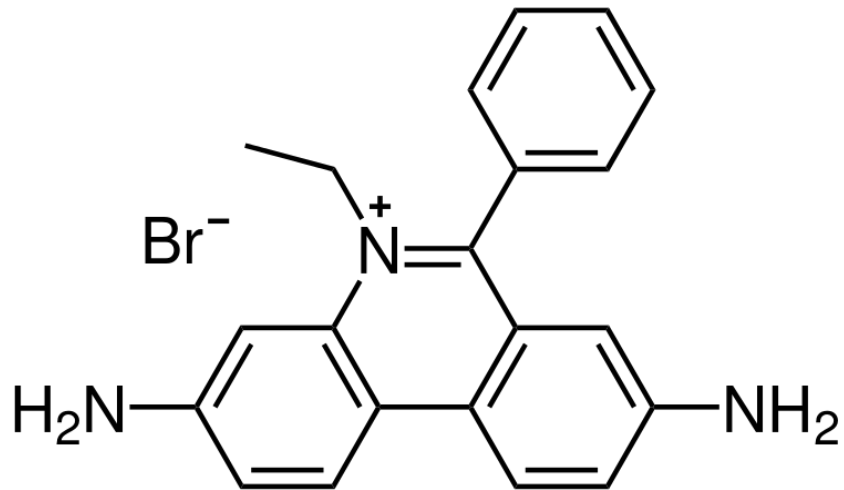


DNA possui carga líquida negativa, migra para o polo positivo na eletroforese em gel de agarose



Brometo de etídio intercalado na dupla fita de DNA

Brometo de Etídio



Visualização do DNA com luz UV

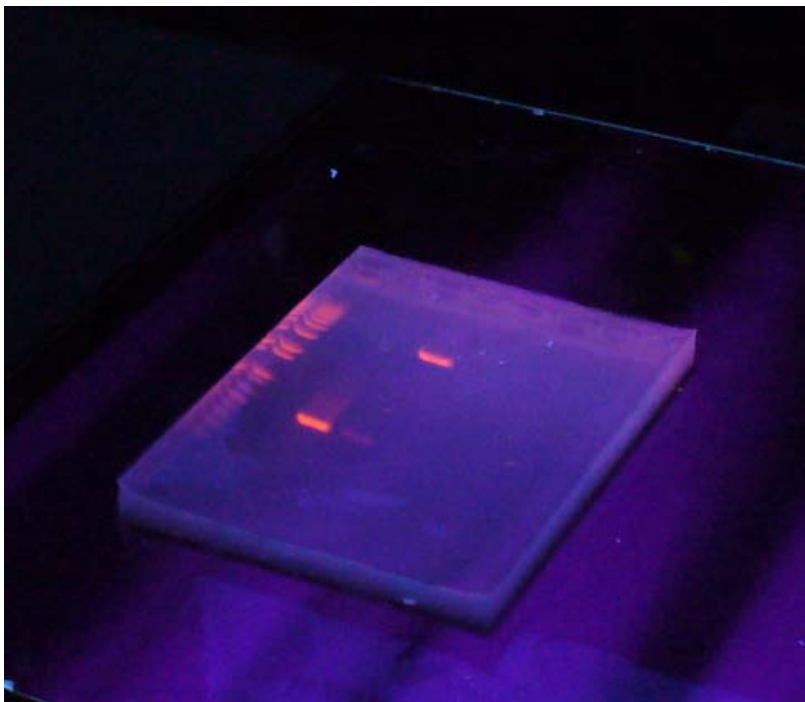
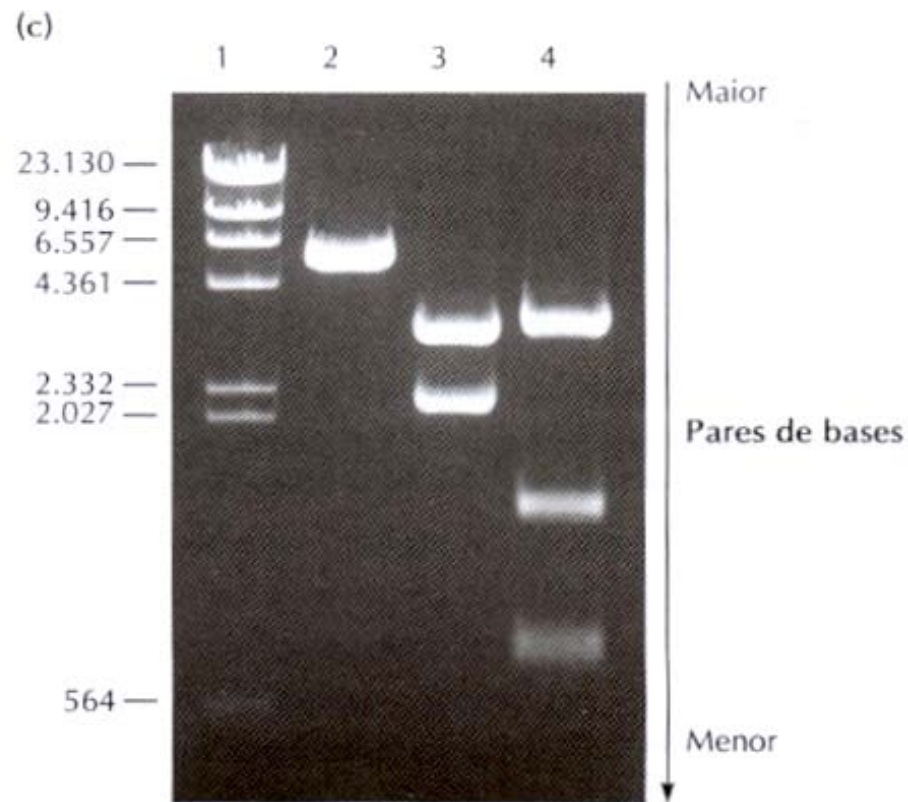


Imagem digitalizada do gel

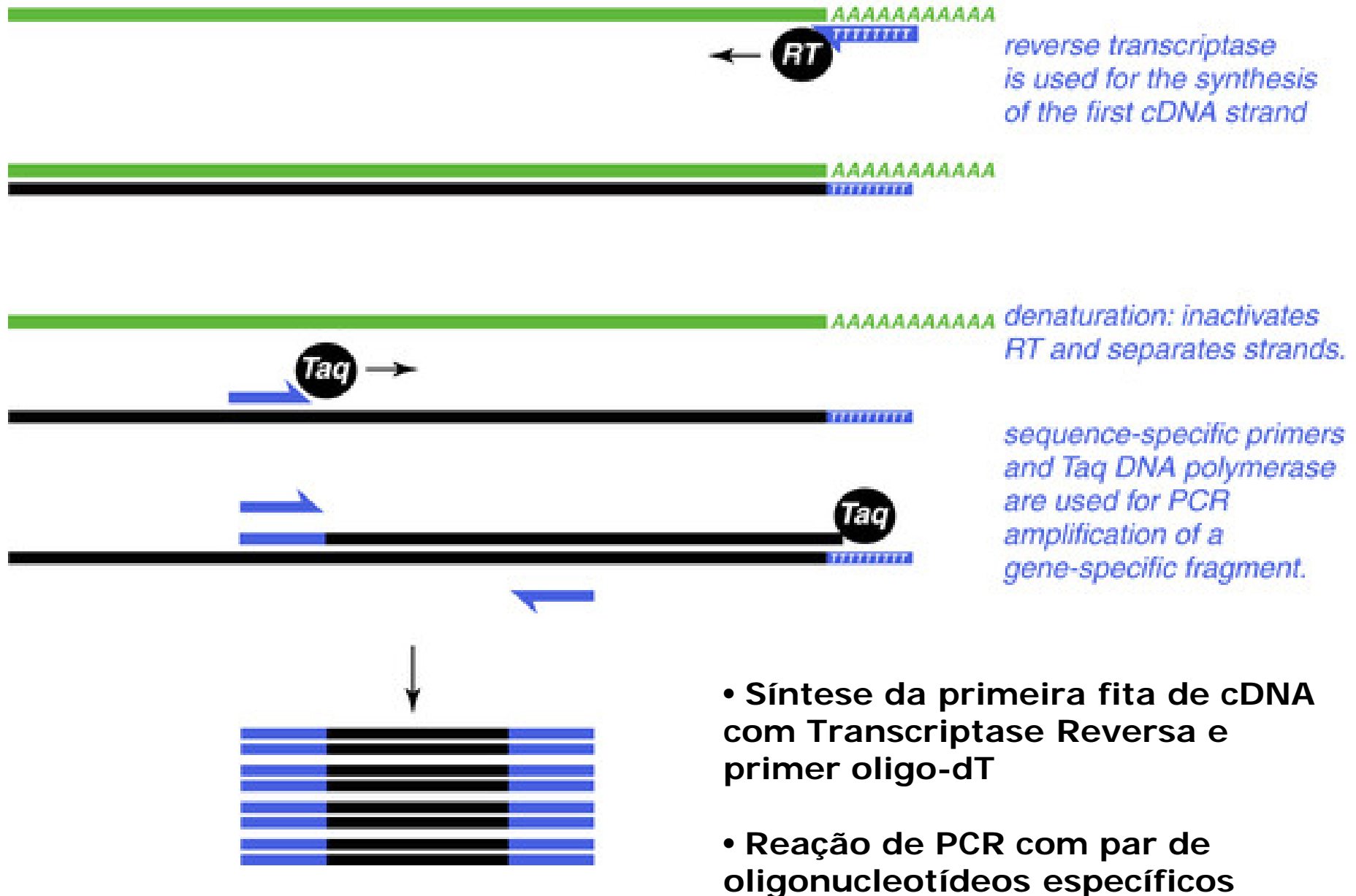


RT-PCR

(PCR precedido de transcrição reversa)

- Utilizada para a detecção de genes ativos
- Permite estimar a abundância relativa e absoluta de RNAs
- A enzima transcriptase reversa é usada para gerar um DNA complementar ao RNA (cDNA), que em seguida é usado como molde pela Taq Polimerase
- Método semi-quantitativo. A intensidade da banda pode atingir a saturação e não refletir exatamente a quantidade inicial de RNA
- pode ser quantitativo se utilizado PCR em Tempo Real (discutido a seguir)

RT-PCR (transcrição reversa seguida de PCR)



- Síntese da primeira fita de cDNA com Transcriptase Reversa e primer oligo-dT

- Reação de PCR com par de oligonucleotídeos específicos

Utilizando a 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)



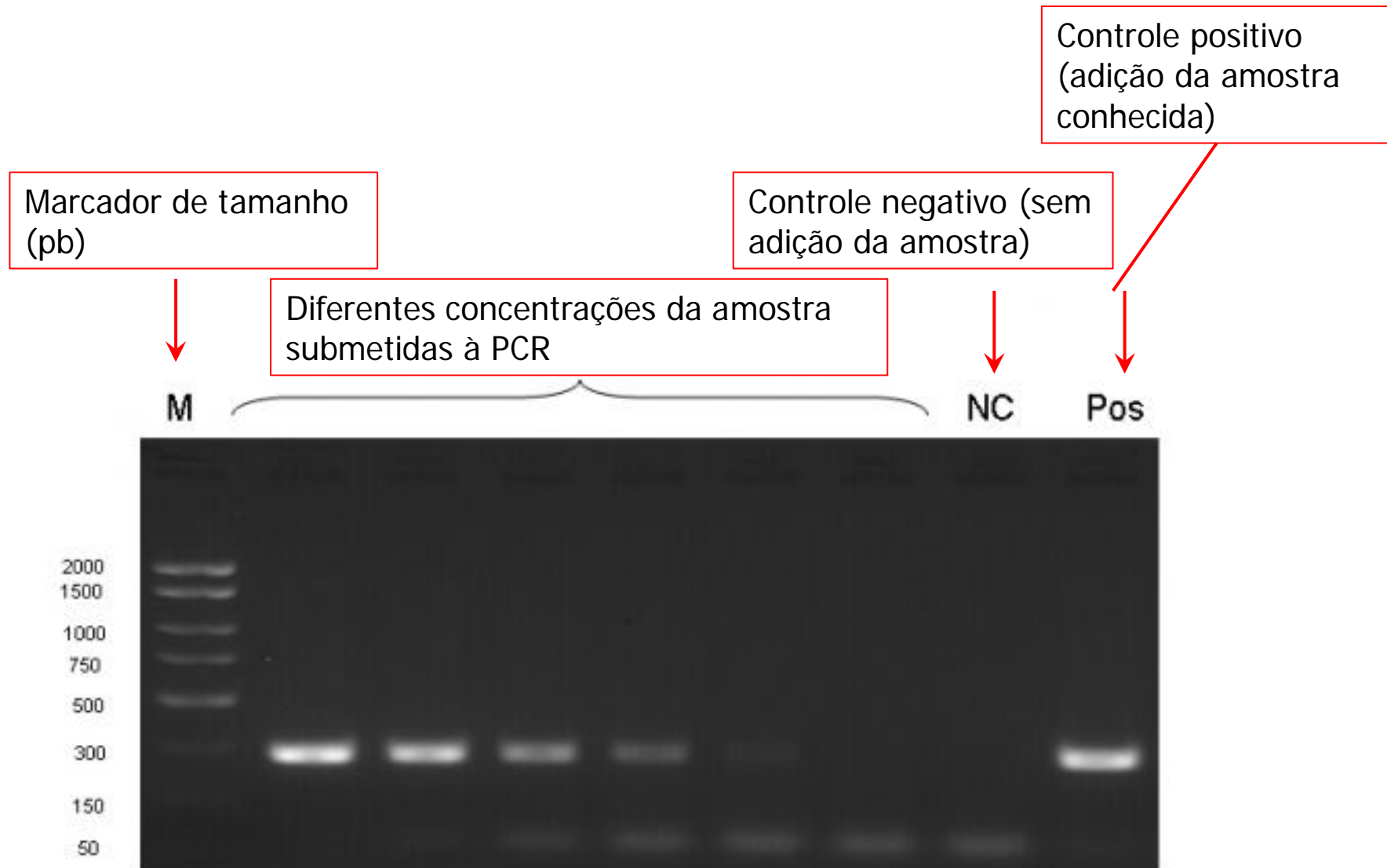
Amostras:

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

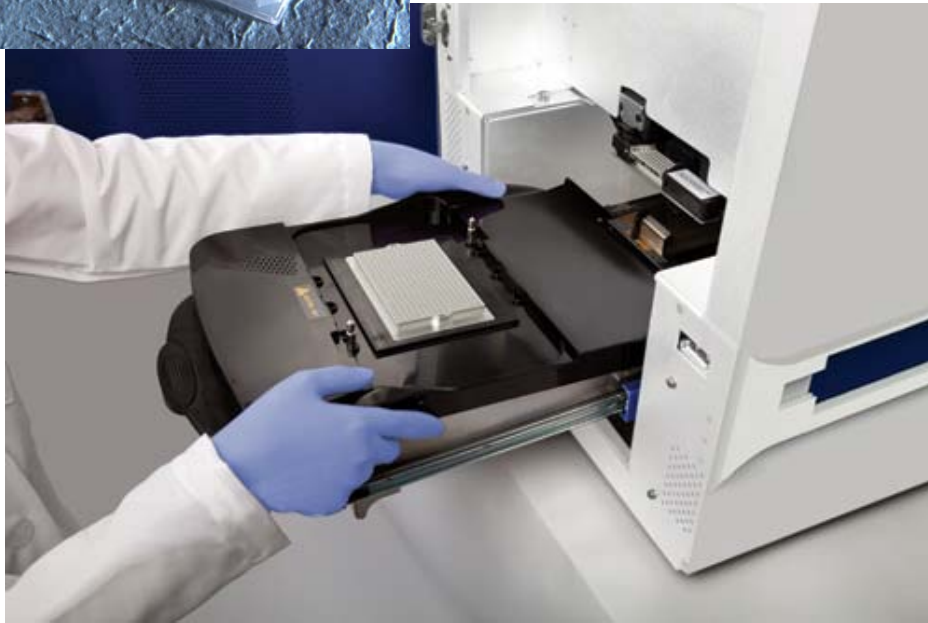
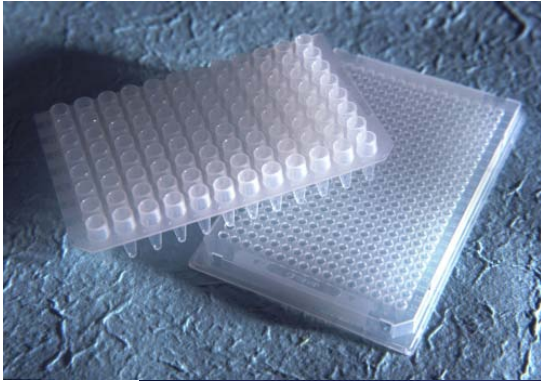
Cuidados necessários em um experimento de PCR

- 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**



PCR em tempo real (qPCR = PCR quantitativo)



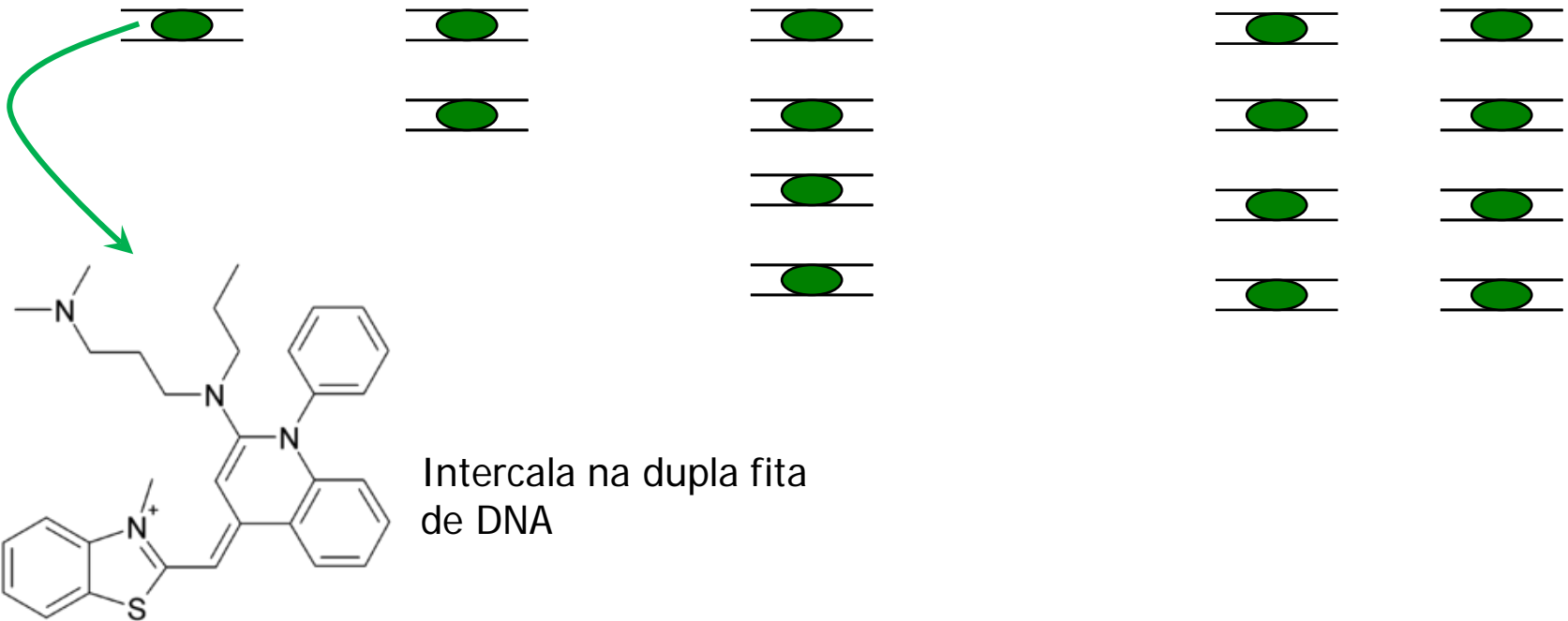
“Real-time PCR”: Detecção dos produtos de PCR formados ao longo dos ciclos utilizando um fluoróforo que intercala nas bases nitrogenadas da dupla-fita (Sybr Green)

Ciclo da PCR:

1

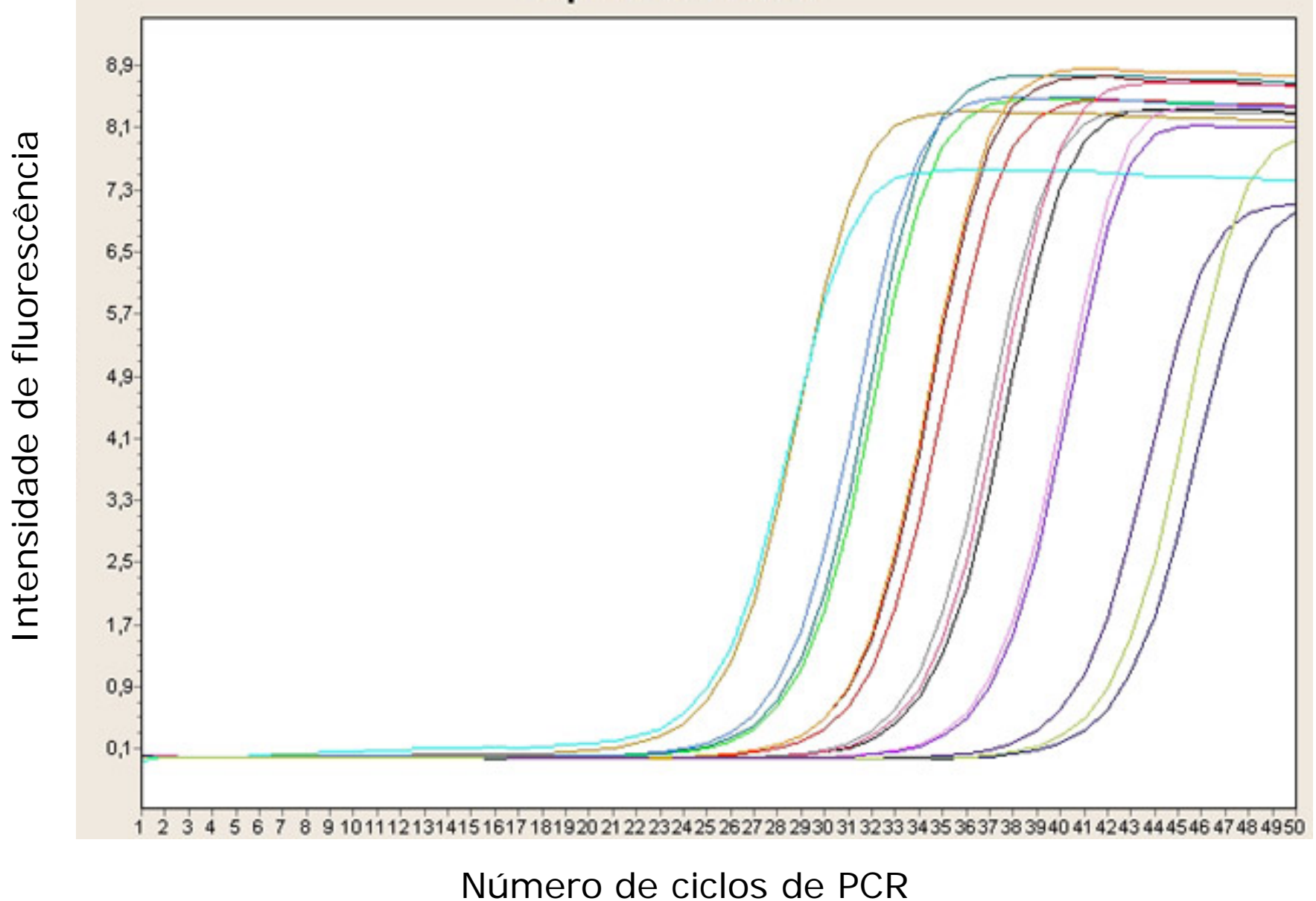
2

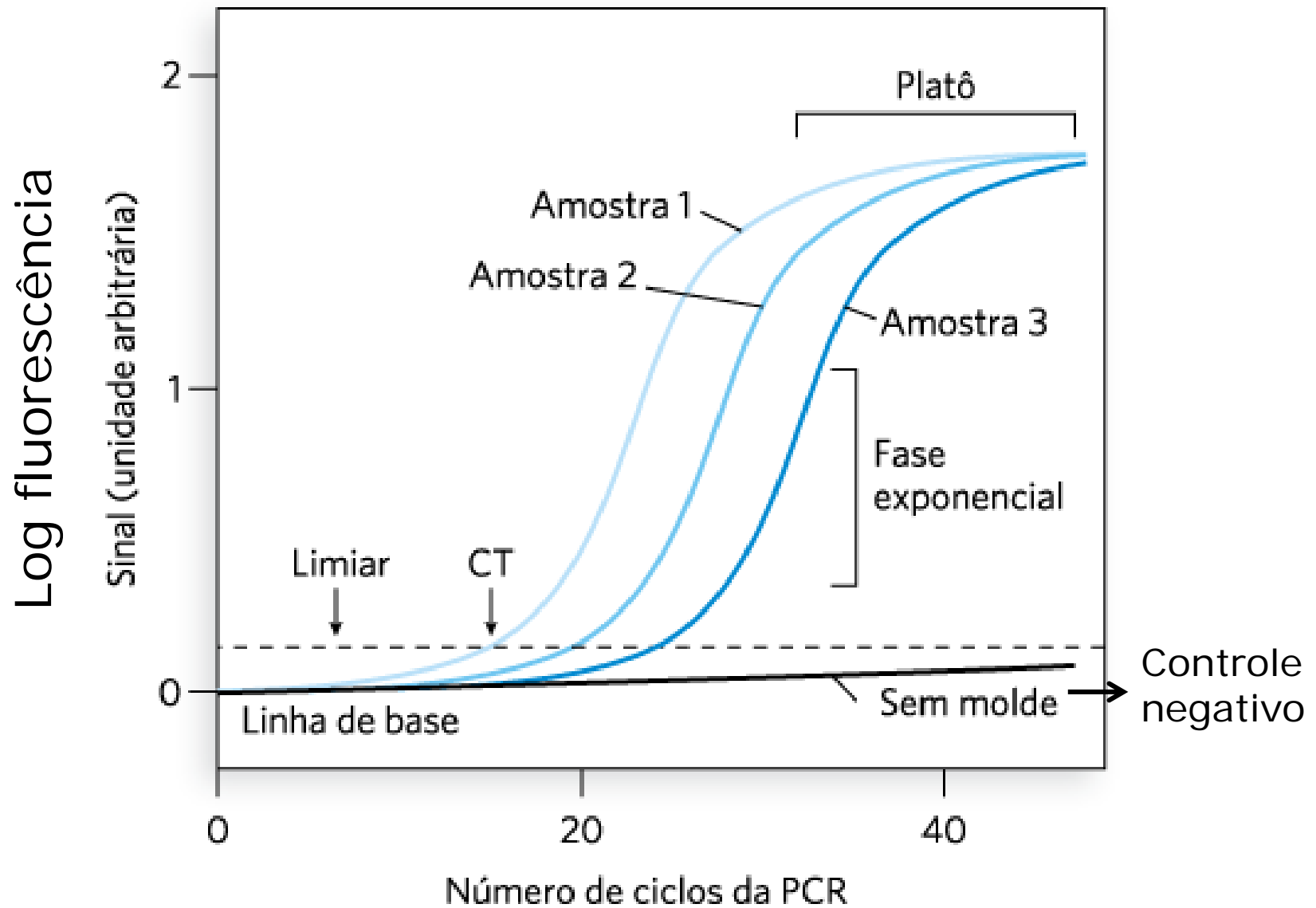
3



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

Curvas de amplificação na PCR Tempo Real indicam diferentes quantidades iniciais do DNA alvo nas amostras avaliadas





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

Aplicações da PCR

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

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

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

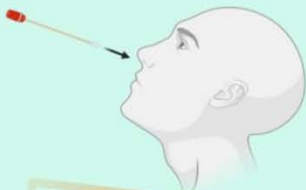
Herpes simplex 1 e 2

SARS-CoV-2

COVID-19 Diagnostic Test through RT-PCR

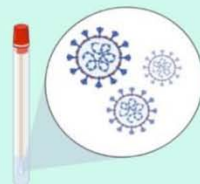
1 Nasopharyngeal swab <15 min

Cotton swab is inserted into nostril to absorb secretions.



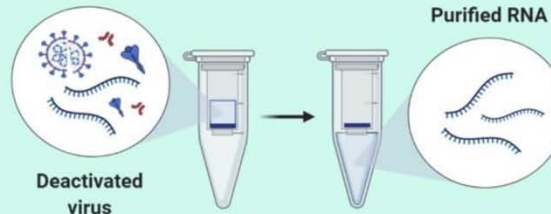
2 Collected specimen 0-72 h

Specimen is stored at 2-8°C for up to 72 hours or proceed to RNA extraction.



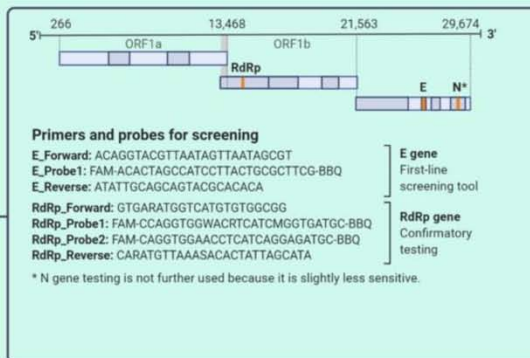
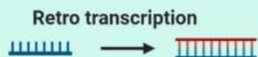
3 RNA extraction ~45 min

Purified RNA is extracted from deactivated virus.



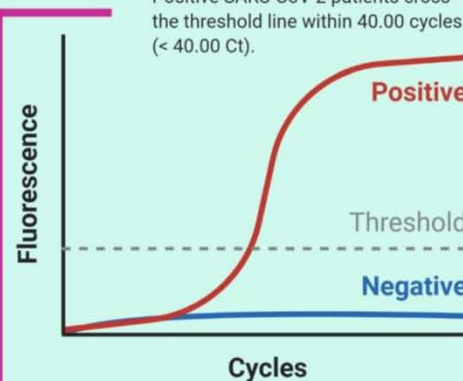
4 RT-qPCR ~1 h per primer set

Purified RNA is reverse transcribed to cDNA and amplified by qPCR.



5 Test results real-time

Positive SARS-CoV-2 patients cross the threshold line within 40.00 cycles (< 40.00 Ct).



The Depiction of Viral load and infectivity basis on the RT PCR Ct (Cycle threshold) values.

Inversely Proportional relationship of Ct values and Viral load.

Lower the Ct values = Higher the viral load

Higher the Ct values = Lower the viral load

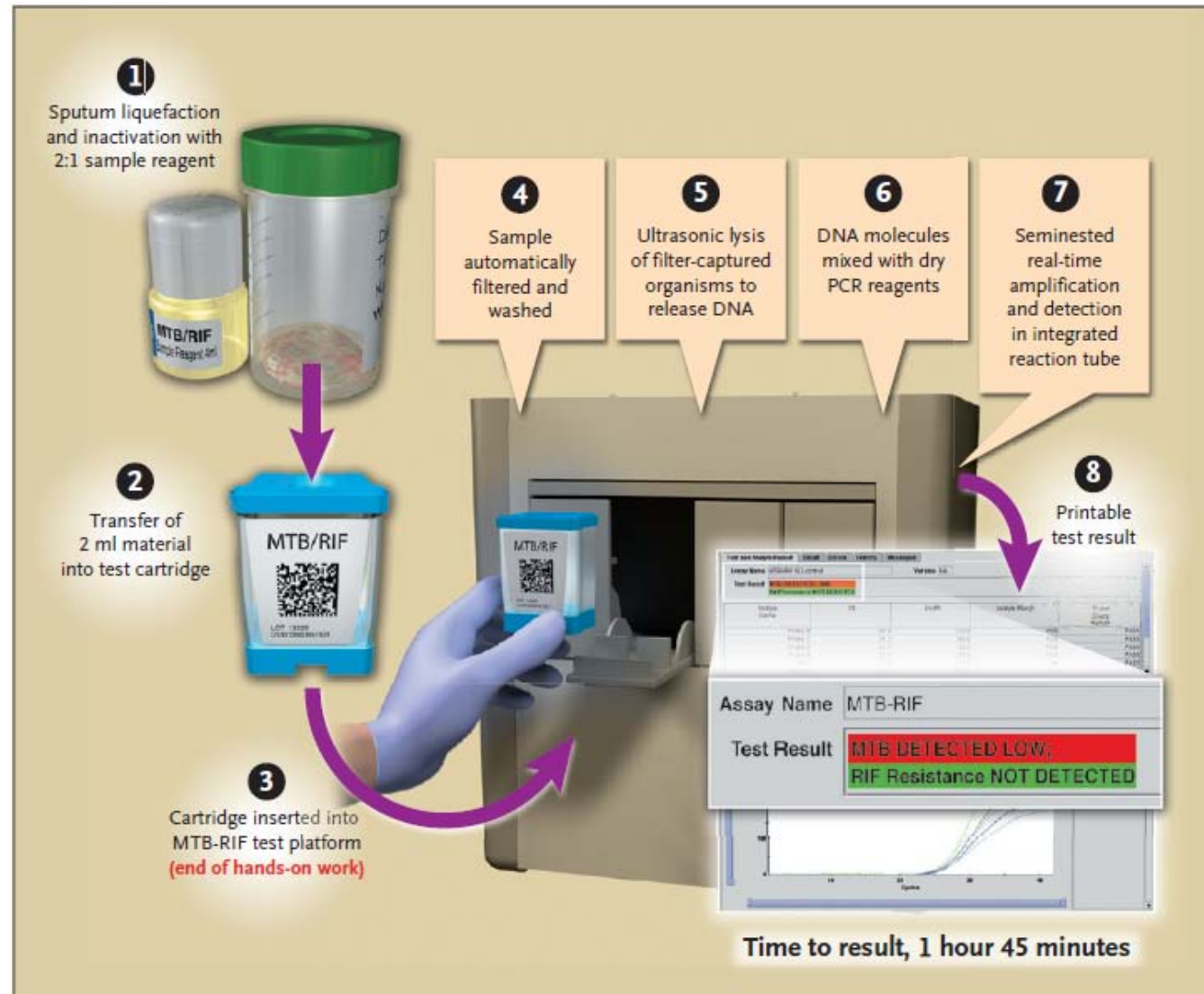
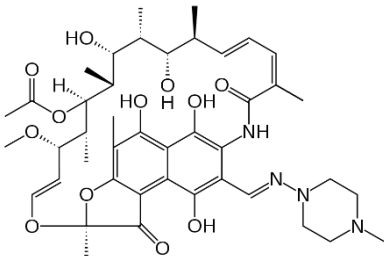
| Score | Viral load |
|-------|-----------------------|
| 17-24 | High Viral load |
| 24-35 | Moderate Viral load |
| ≥ 36 | Non-diagnostic result |

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

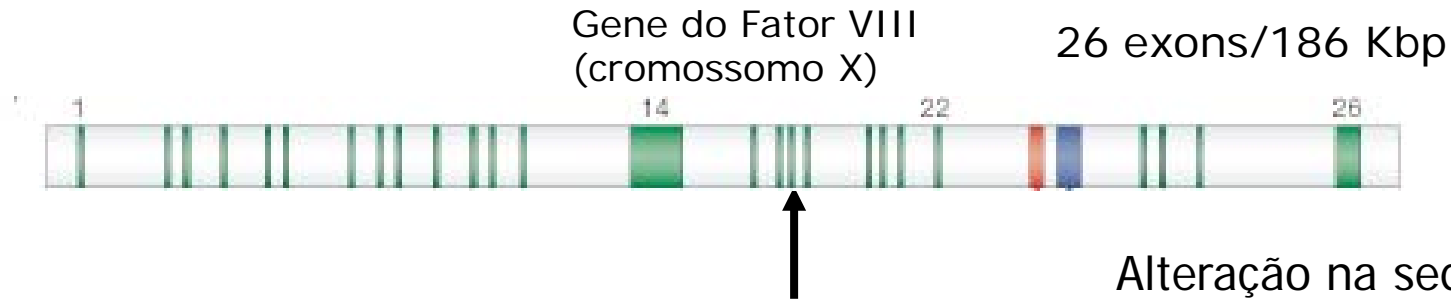
Detecção de micobactéria e de micobactéria resistente à rifampicina* em ~2h

Evita a necessidade de cultivo da bactéria!

Rifampicina inibidor da RNAPolimerase



Diagnóstico Hemofilia A utilizando PCR



Sítio do polimorfismo

Alteração na sequência do intron 18:

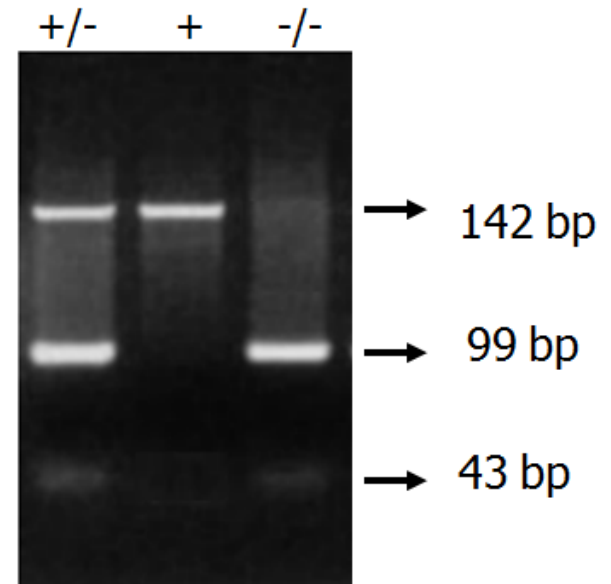
1. Splicing aberrante
2. Proteína não funcional
3. Perda do sítio para endonuclease BclI

Como detectar a presença da mutação?

amplificação do segmento de 142 bp do intron 18 por PCR, seguindo-se digestão com endonuclease BclI.

Possíveis resultados:

- +/- alelo mutante/ alelo normal (portadora XX)
- + alelo mutante (XY)
- /- alelos normais (XX ou XY)



Uso da PCR para detectar variações no genoma

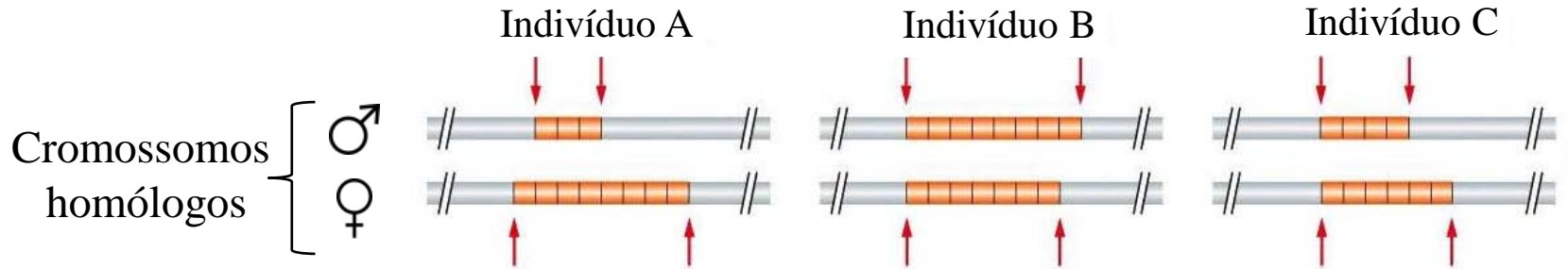
STRs: "Short Tandem Repeats"

- Sequências repetitivas no DNA que apresentam variação no número de repetições entre indivíduos da mesma espécie
- Possuem sequências flangeadoras comuns

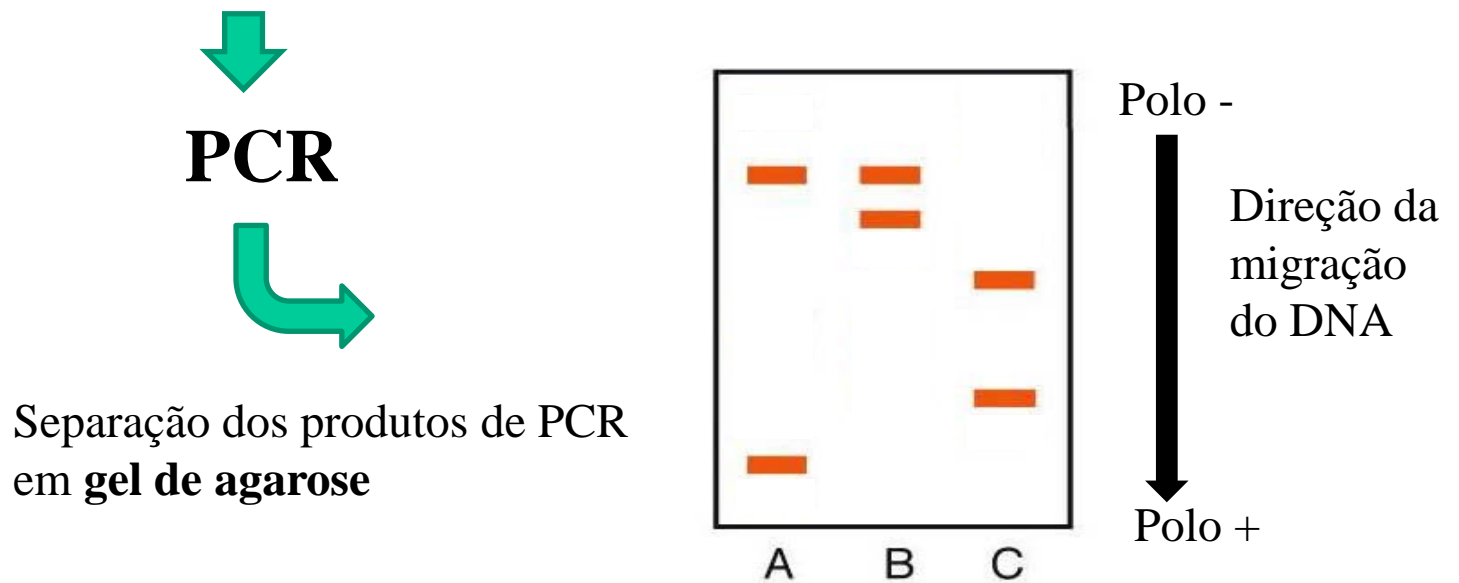
Regiões flangeadoras comuns



STRs podem ser detectadas utilizando PCR



Setas indicam local de anelamento dos “primers” em regiões flanqueadoras de STRs



Alelos STR

STR: short tandem repeats

- 1 polimorfismo a cada 1000 pb (diferenças entre indivíduos)
- 20.000 loci (marcadores) de STR com 4nt/repetição já caracterizados
- são preditos 1.000.000 loci de STR = 3% do genoma

Probabilidade de identidade coincidir ao acaso:

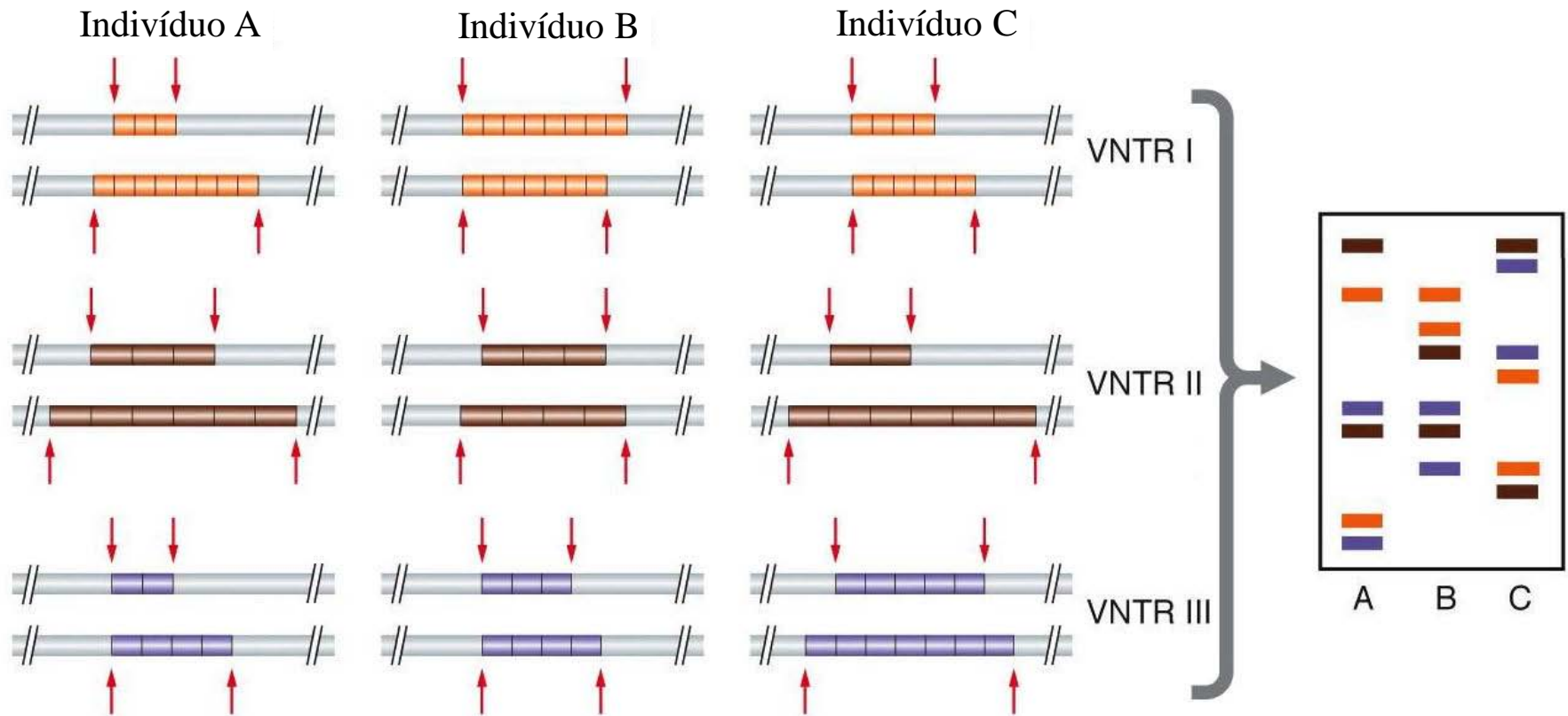
10 marcadores de STR → 1 em 3 trilhões (10^{-12})

15 marcadores de STR → 1 em 10^{17}

kits comerciais tem 16 marcadores → 1 em 10^{18}

STRs podem ser usados para a identificação genética

Detecção de múltiplos STRs define uma assinatura genética única dos indivíduos



Loci de STRs usados pelo CODIS (Sistema de combinado de índices de DNA). Até 2010 o CODIS tinha mais de 7 milhões de genótipos de STR

TABELA Q-1 Propriedades dos *loci* utilizados para o banco de dados CODIS

| <i>Locus</i> | Cromossomo | Motivo de repetição | Comprimento da repetição (média)* | Número de alelos observados [†] |
|-------------------------|------------|---------------------|-----------------------------------|--|
| CSF1PO | 5 | TAGA | 5–16 | 20 |
| FGA | 4 | CTTT | 12,2–51,2 | 80 |
| TH01 | 11 | TCAT | 3–14 | 20 |
| TPOX | 2 | GAAT | 4–16 | 15 |
| VWA | 12 | [TCTG][TCTA] | 10–25 | 28 |
| D3S1358 | 3 | [TCTG][TCTA] | 8–21 | 24 |
| D5S818 | 5 | AGAT | 7–18 | 15 |
| D7S820 | 7 | GATA | 5–16 | 30 |
| D8S1179 | 8 | [TCTA][TCTG] | 7–20 | 17 |
| D13S317 | 13 | TATC | 5–16 | 17 |
| D16S539 | 16 | GATA | 5–16 | 19 |
| D18S51 | 18 | AGAA | 7–39,2 | 51 |
| D21S11 | 21 | [TCTA][TCTG] | 12–41,2 | 82 |
| Amelogenin [‡] | X, Y | Não aplicado | | |

Fonte: Adaptado a partir de Butter, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd edn, Academic Press, San Diego, p. 96.

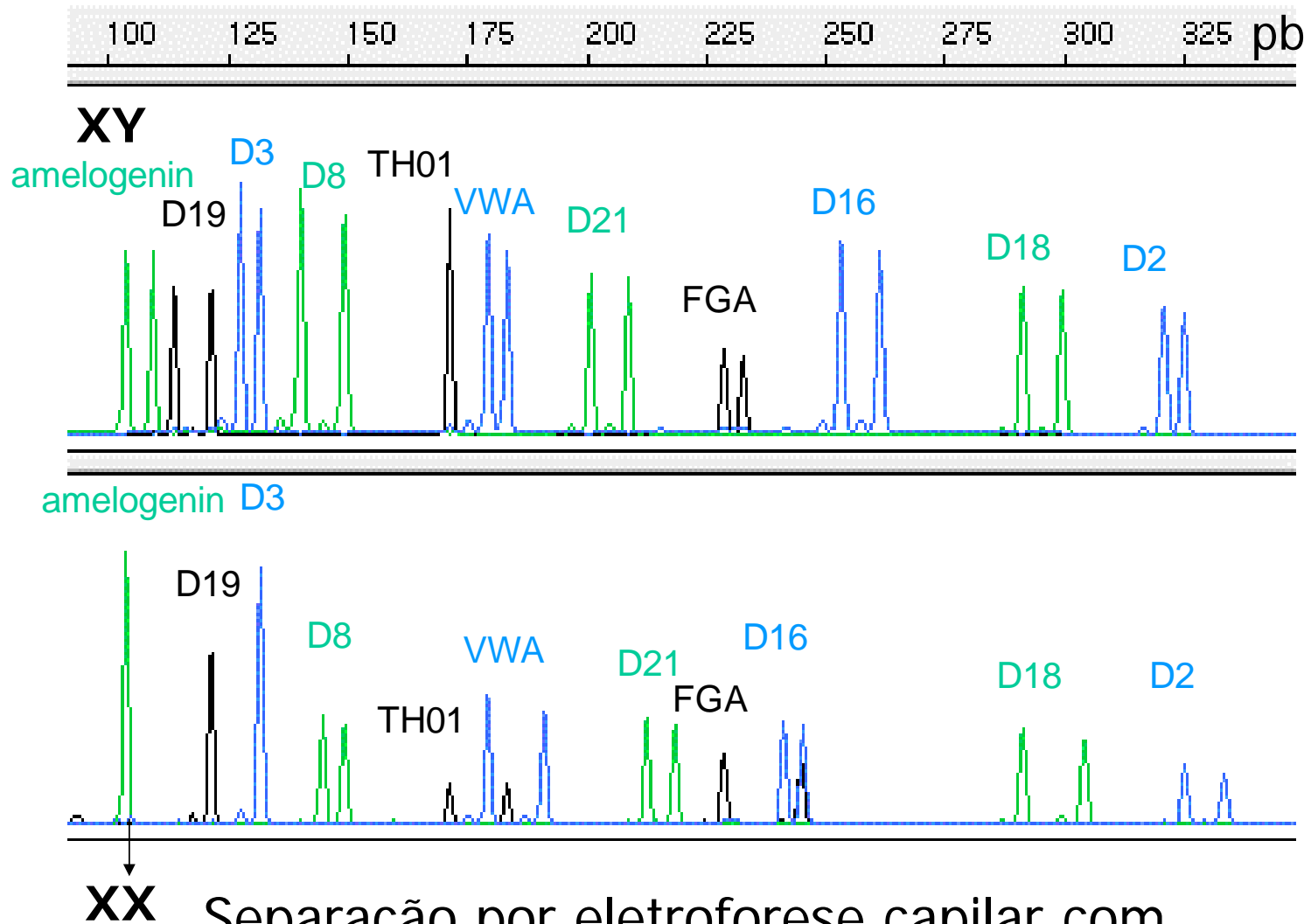
*Comprimentos repetidos observados na população humana. As repetições parciais ou imperfeitas podem ser incluídas em alguns alelos.

[†]Número de diferentes alelos observados desde 2005 na população humana. A análise cuidadosa de um *locus* em vários indivíduos é um pré-requisito para seu uso na tipagem forense do DNA.

[‡]A amelogenina é um gene, de tamanho levemente diferente no cromossomo X e Y, utilizado para estabelecer o gênero.

Identificação de indivíduos e gênero através da análise de 10 STRs utilizando PCR multiplex

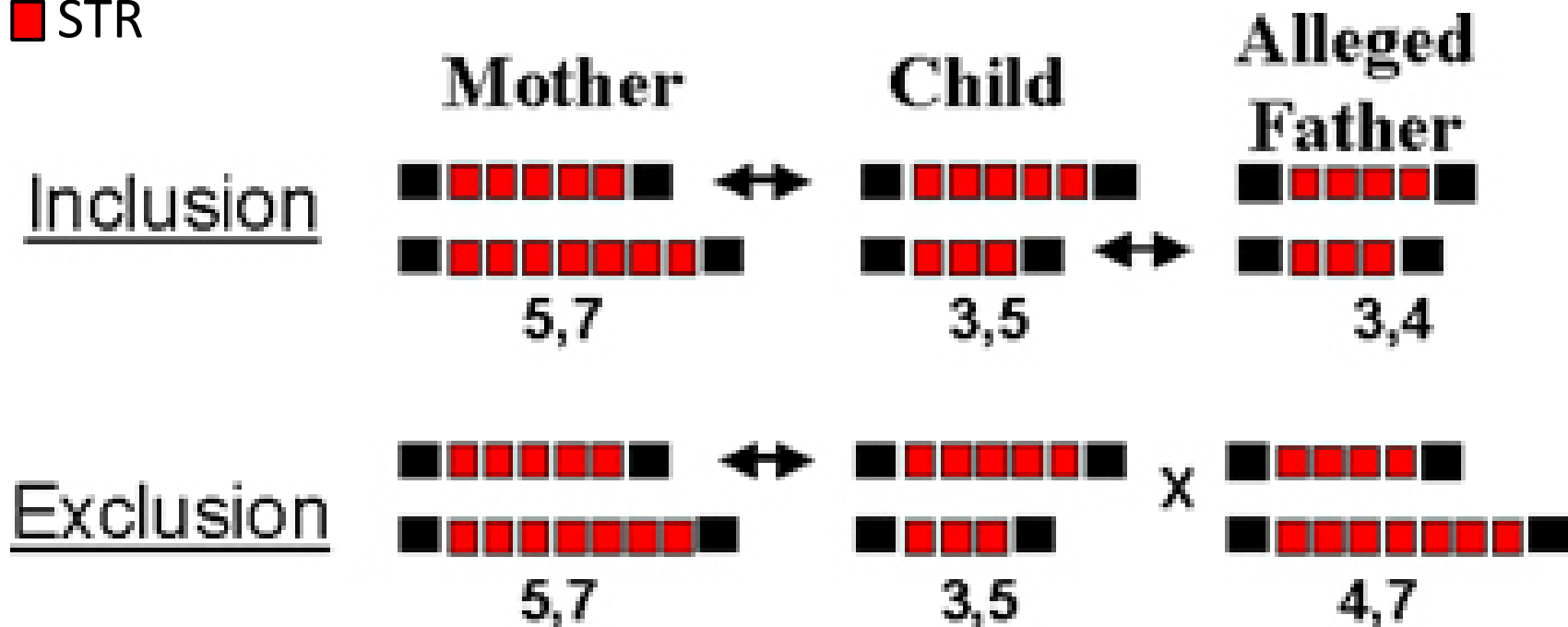
Dois indivíduos diferentes



XX Separação por eletroforese capilar com detecção da fluorescência dos *primers*

Utilização de PCR de STRs em testes de paternidade

■ STR



A exclusão/inclusão é verificada para cada locus (16 loci) aumentando a confiabilidade do resultado

<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!