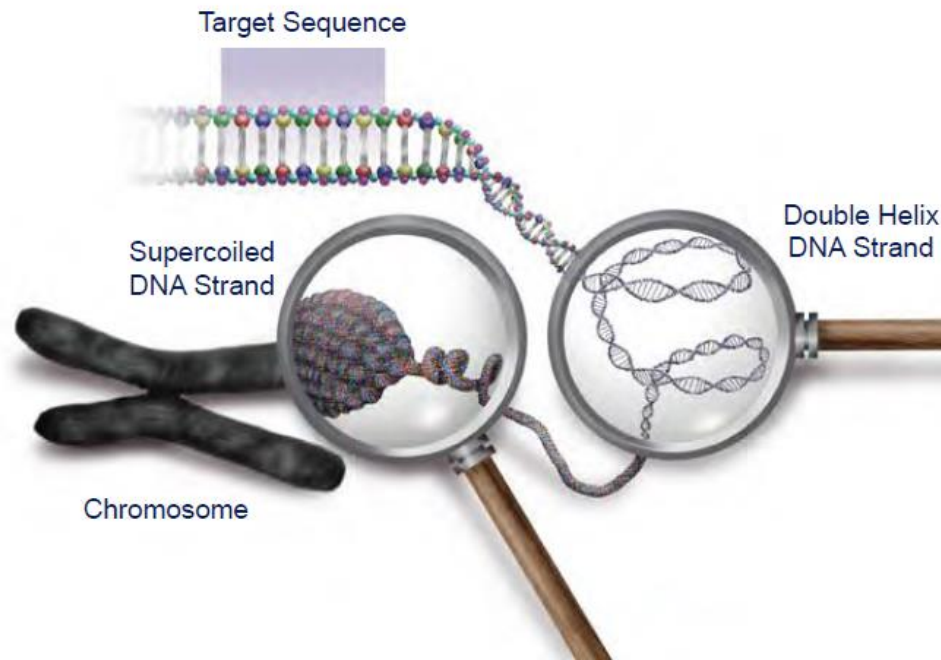


# QBQ 136 Biologia Molecular

## PCR

(Polymerase Chain Reaction)  
(Reação em Cadeia da Polimerase)



# HISTÓRICO

Técnica revolucionou  
a Biologia Molecular!!

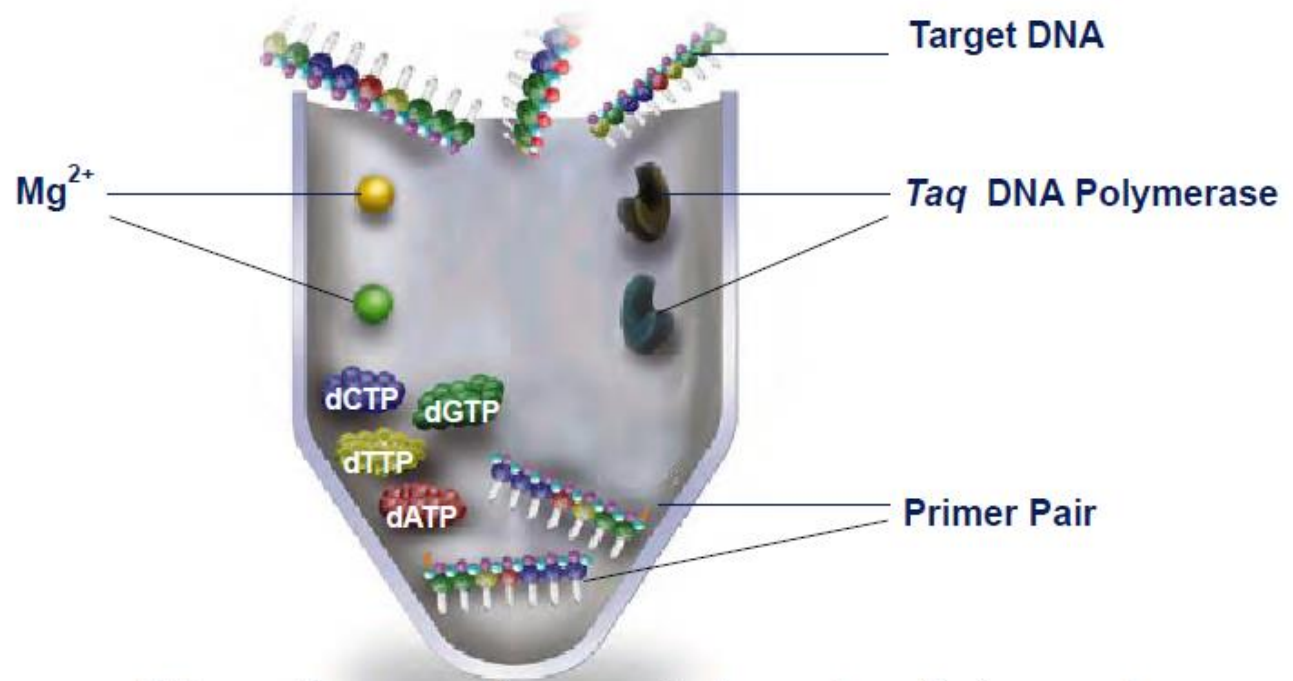
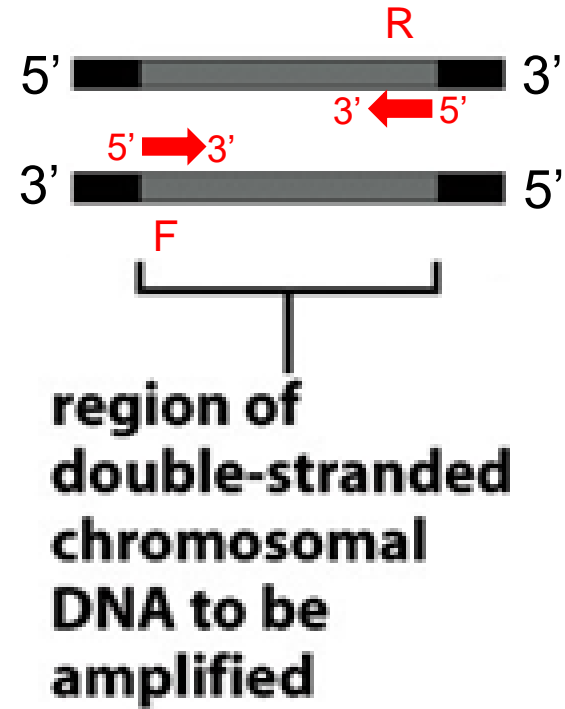
‘The PCR method – a  
copying machine for  
DNA molecules ‘



- Técnica foi criada por Kary Mullis (1988).
- Prêmio Nobel em Química em 1993.
- Método para amplificação seletiva de sequências de DNA a partir de amostras puras ou complexas contendo ácidos nucleicos (DNA ou RNA)
- A técnica explora as características da replicação do DNA.

1 molécula DNA       $\longrightarrow$        $10^9$  moléculas  
30 ciclos  
de PCR

Reagentes para a PCR são pipetados em microtubo



A amplificação se dá em ciclos de síntese da sequência alvo

Primer F= primer forward  
Primer R= primer reverse

## Primers para PCR:

- Um para cada fita do DNA
- Sequências específicas e conhecidas
- 18-24 bases complementares ao alvo
- Não devem formar estruturas secundárias
- Tm semelhante entre o primer 1 e primer 2

primers = oligonucleotídeos = iniciadores

Qual a sequência dos primers (oligonucleotídeos) para amplificar o trecho indicado em azul da sequência de DNA abaixo?



5' GATTGTCTCTAGCACGTATTCGATGCCAGTGTGCAGTTTACGCGCTACGGA 3'  
3' CTAACAGAGATCGTGCATAAGCTACGGTCACACGTCAAATGCGCGATGCCT 5'

5' GATTGTCTCTAGCACGTATTCGATGCCAGTGTGCAGTTTACGCGCTACGGA 3'

ATGCGCGAT 5'



primer 2 (reverso)

primer 1 (forward)



5' TCTAGCACG

3' CTAACAGAGATCGTGCATAAGCTACGGTCACACGTCAAATGCGCGATGCCT 5'

# Um ciclo de PCR e suas etapas

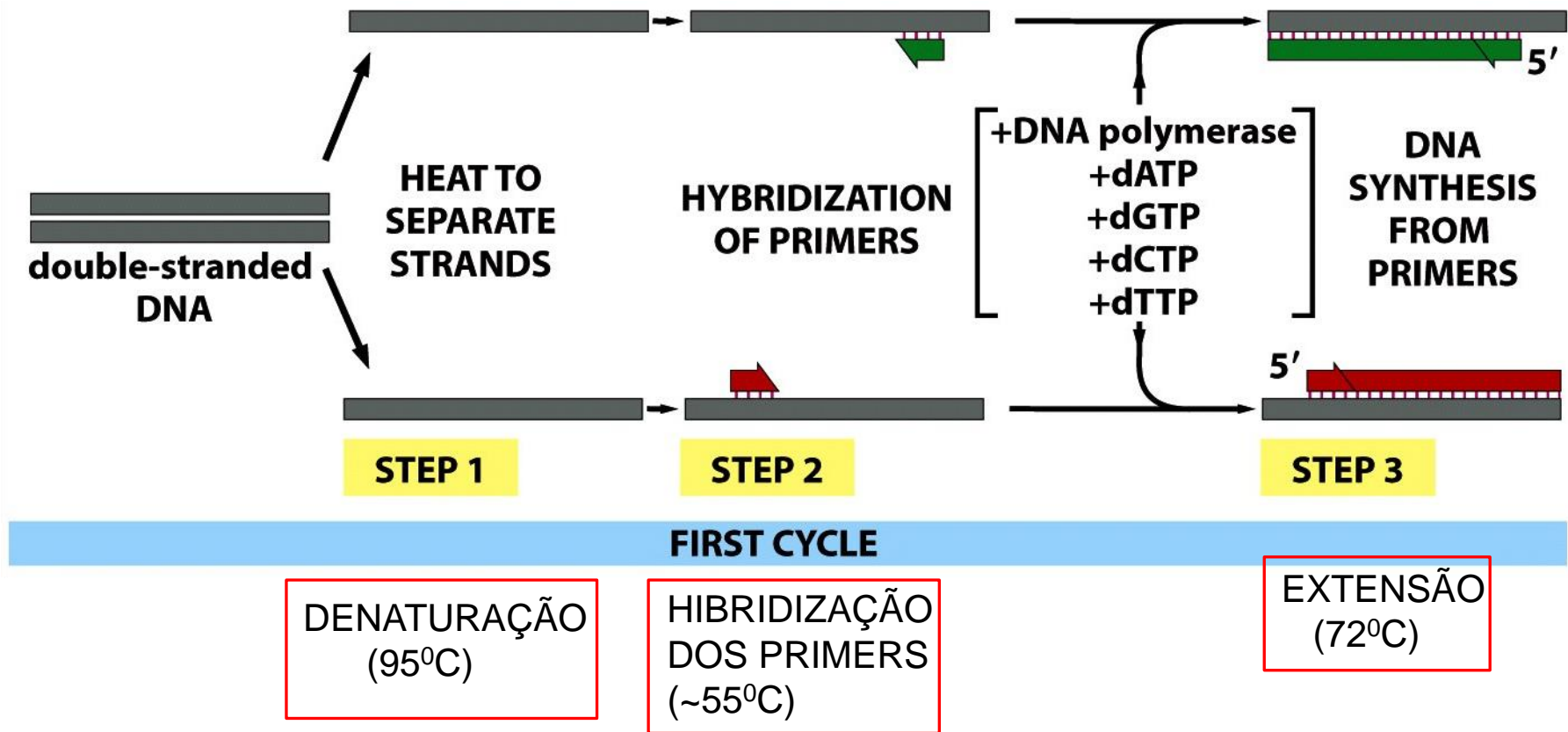


Figure 8-45a. *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

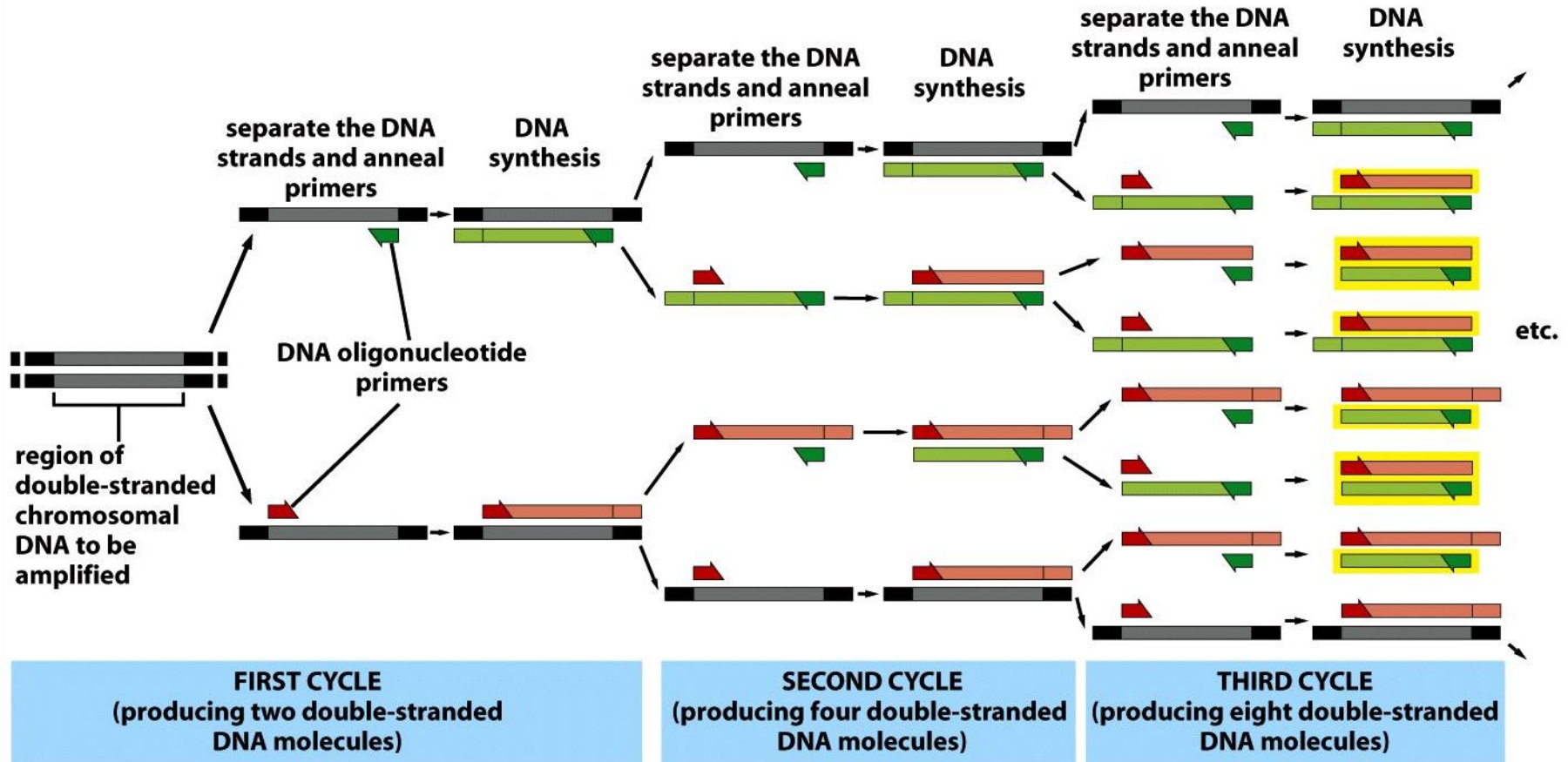


Figure 8-45b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

# Taq DNA polimerase

DNA polimerase termicamente estável da bactéria *Thermus aquaticus* isolada de fontes termais do Parque Yellowstone (EUA) pelo microbiologista Thomas Brock em 1966.



A DNA-polimerase utilizada na PCR deve resistir a variação de temperatura durante os ciclos para evitar que tenhamos que adicionar mais enzima a cada ciclo.

Temperatura ótima da *Taq* DNA polimerase: 72°C.

*Taq* DNA polimerase é estável na temperatura em que ocorre a denaturação (~95°C)

Não tem atividade revisora: 1-2 erros a cada  $10^4$  bases

Atualmente, enzimas mais eficientes e com alta fidelidade estão disponíveis

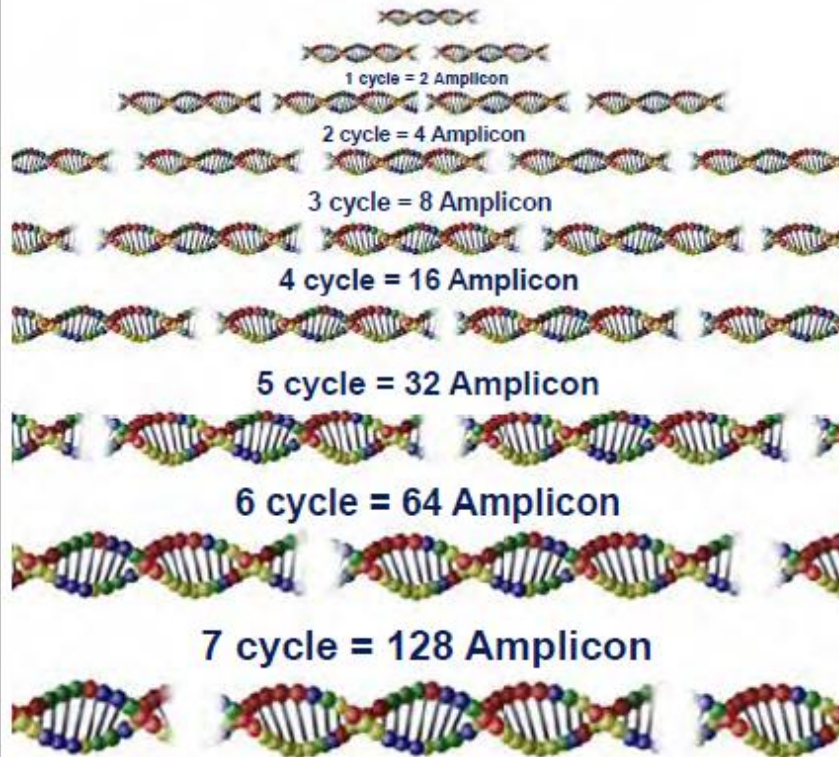


# Termociclador

## Automatização do PCR

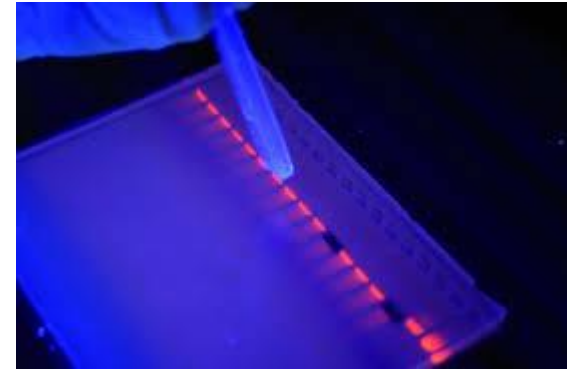
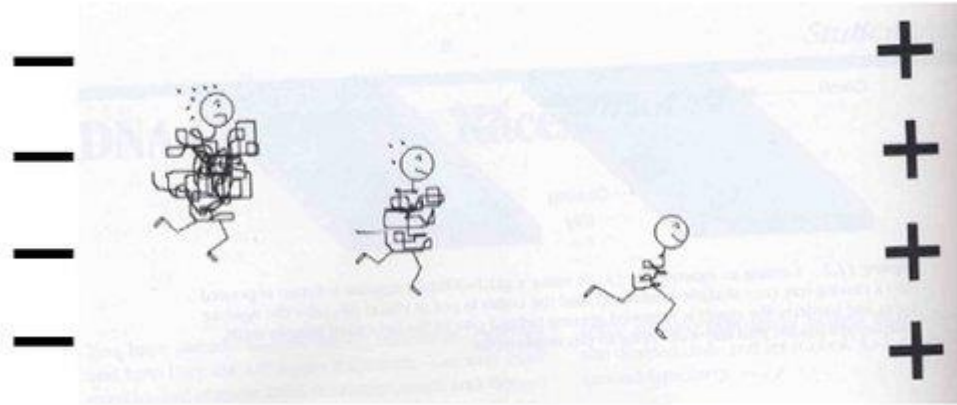


# Amplificação do alvo

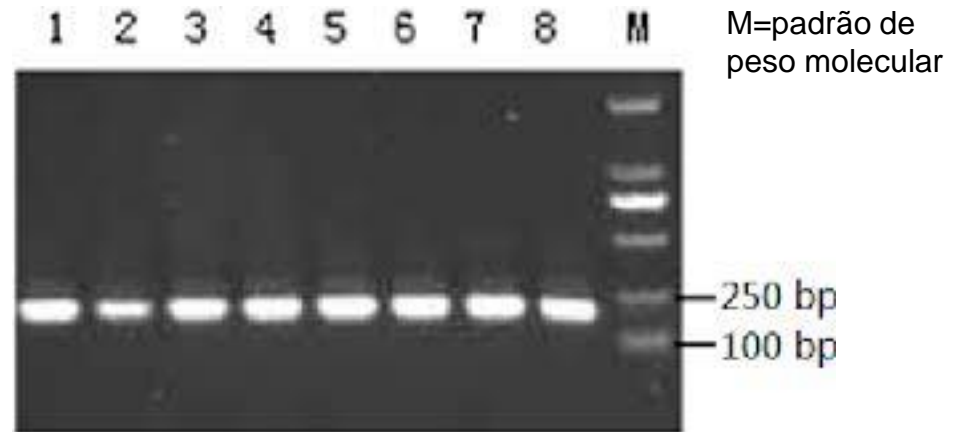


No. of Cycles	No. Amplicon Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

# Visualização do produto amplificado



Eletroforese em gel de agarose



# PCR quantitativa (qPCR)

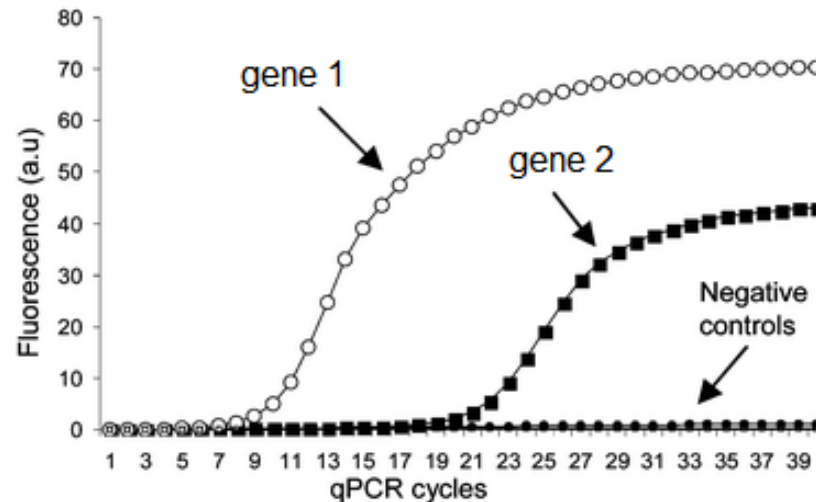
Detecção dos produtos de PCR (amplicons) em tempo real com um corante fluorescente (ex: Sybr Green)

SYBR Green I é um *intercalante de DNA*, e só *fluoresce em dupla fita*.



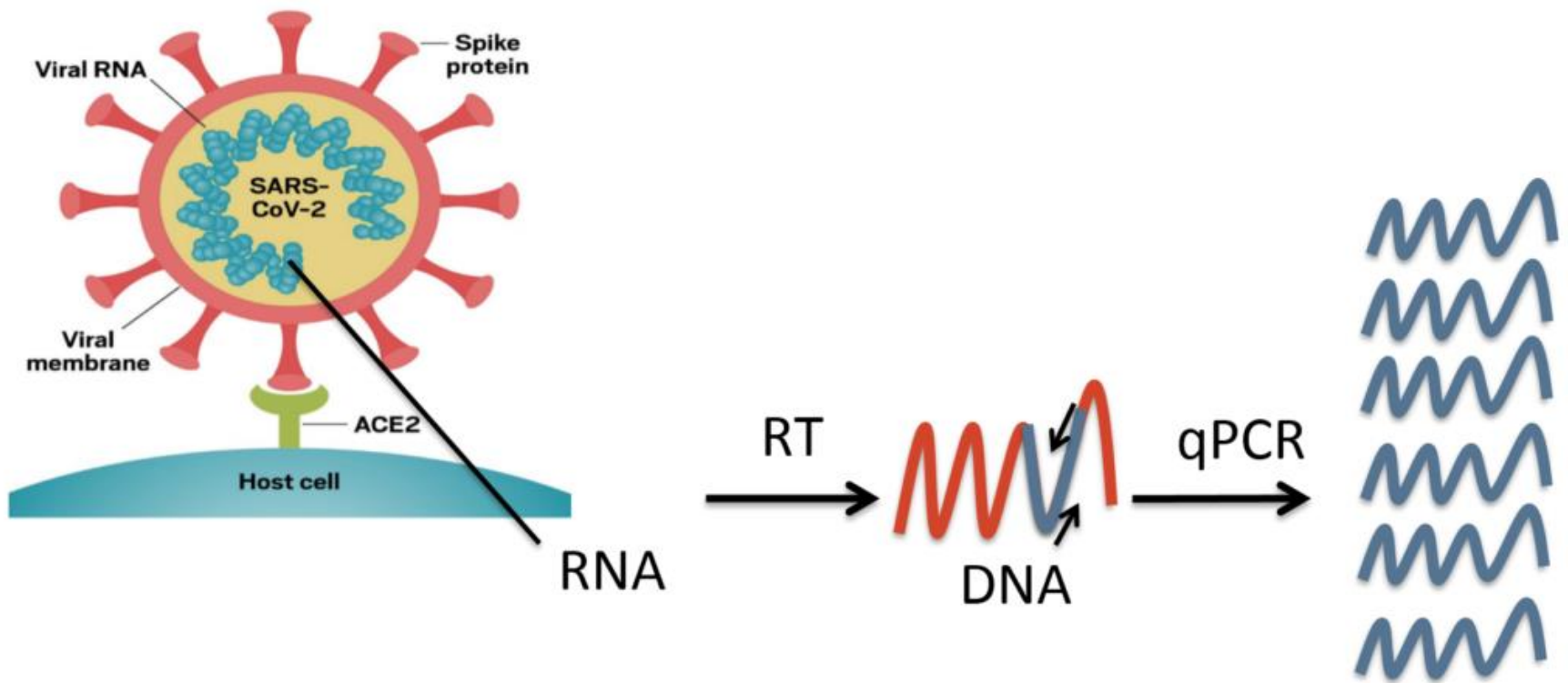
1. Dye in solution emits low fluorescence

2. Emission of the fluorescence by binding



# Se o ácido nucleico da amostra for RNA?

## RT-qPCR: qPCR precedido de transcrição reversa



# QUAIS AS ETAPAS PARA REALIZAR O DIAGNÓSTICO DA COVID-19?

A Força Tarefa da Unicamp realizará testes diagnósticos que incluem **5 etapas**:

**1**



Coleta do material dos pacientes  
(células da mucosa da boca e do nariz)

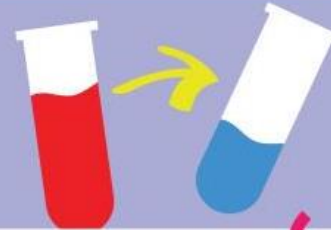
**2**



Extração do RNA viral  
da amostra do paciente

**3**

Conversão em DNA  
complementar (cDNA)  
ao RNA



**4**

Duplicação exponencial do  
cDNA por RT-qPCR



**5**



Análise do resultado por  
especialista para o diagnóstico

# Aplicações da PCR

**Identificação de doenças (testes genéticos)**

**Identificação de patógenos**

**Teste pré-natal**

**Investigação forense**

**Teste de paternidade**

**Genotipagem de linhagens de animais**

**Pesquisa básica e aplicada**



# Aplicação da PCR na investigação forense

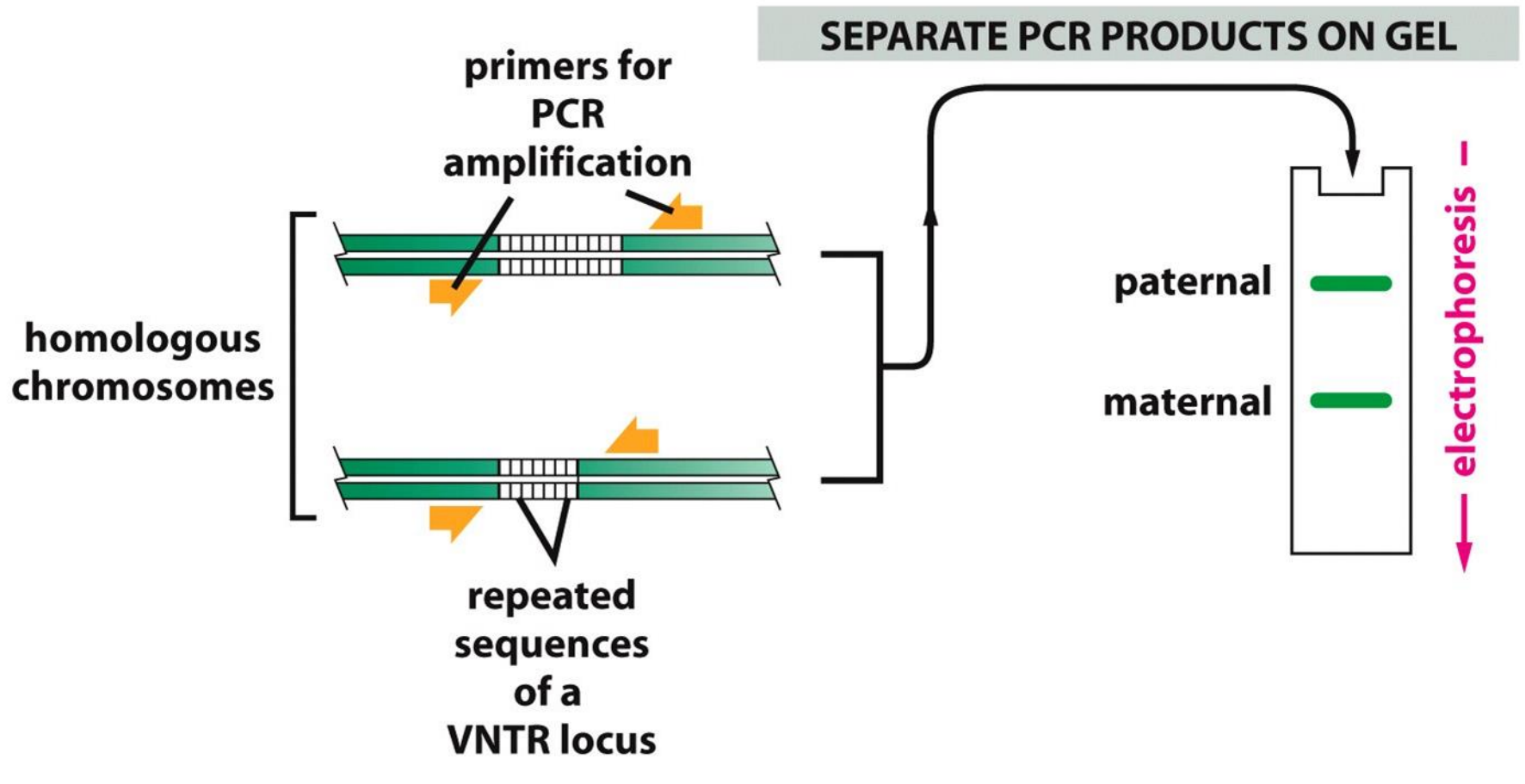
Análise de sequência microsatélite hipervariável ou VNTR (número variável de repetições *in tandem*)

O que é um alelo de microsatélite ?

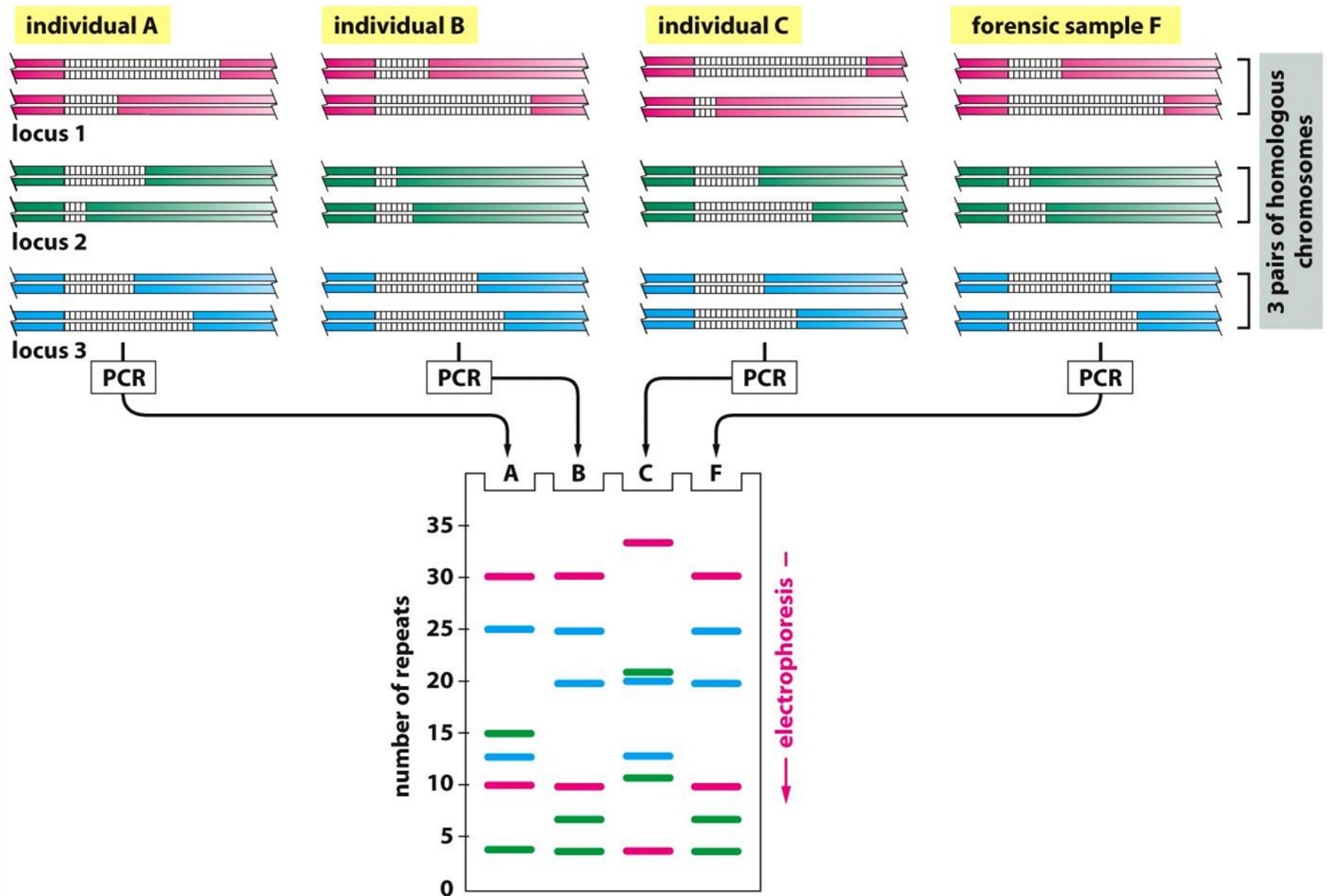
CCATG <b>ATATAT</b> GGATTATGGTTTT	alelo 1
CCATG <b>ATATATAT</b> GGATTATGGTTTT	alelo 2
CCATG <b>ATATATATAT</b> GGATTATGGTTTT	alelo 3
CCATG <b>ATATATATATAT</b> GGATTATGGTTTT	alelo 4
CCATG <b>ATATATATATATAT</b> GGATTATGGTTTT	alelo 5



# Aplicação da PCR em teste de paternidade



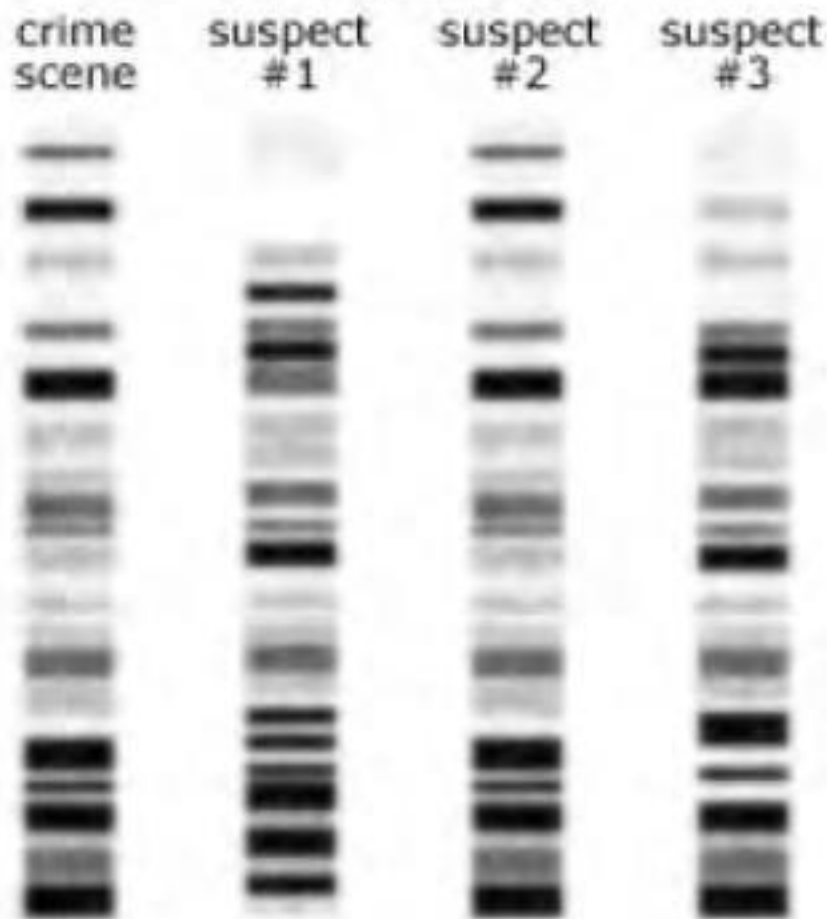
# Aplicação da PCR na investigação forense



# Cena do Crime !

Determine qual  
o suspeito que  
não pode ser  
excluído....

## DNA samples from:



# Sequenciamento de DNA

## Métodos de sequenciamento de DNA

- Método de Maxam e Gilbert: degradação química seletiva e sequencial de nucleotídeos
- Método de Sanger: terminação controlada da síntese de DNA com dideoxirribonucleotídeos (ddNTP)
- Metodologias de sequenciamento de alto desempenho (Next Generation Sequencing, NGS ou High-Throughput Sequencing, HTS )



AGGACCATAAACTCCAG  
AAACAAGTTAATAAACTA  
TGGTTCCTGGCATCGATGA  
GTAATGTGAATTGCAGAA  
GAACGCACATTGCGCCCC  
TGTTTCGAGCGTCATTTCA  
TGGGCTCCGTCCTCCACG  
GGTGGCGTCTTGCCTCAA  
TTGGAGCGCACGGCGTCG  
TATTTCTCAAGGTTGACC  
AAGGTAAGAAAGTTTTTC  
CTGGGTGCTGGGTGCTGG  
TTGCCTTATCGCTTCGGT  
TTGGCCCGCGCTAAGCCT  
CGCATCTGGTTTTTTTTGC

# Método de Sanger

## The Nobel Prize in Chemistry 1980



Paul Berg  
Prize share: 1/2



Walter Gilbert  
Prize share: 1/4



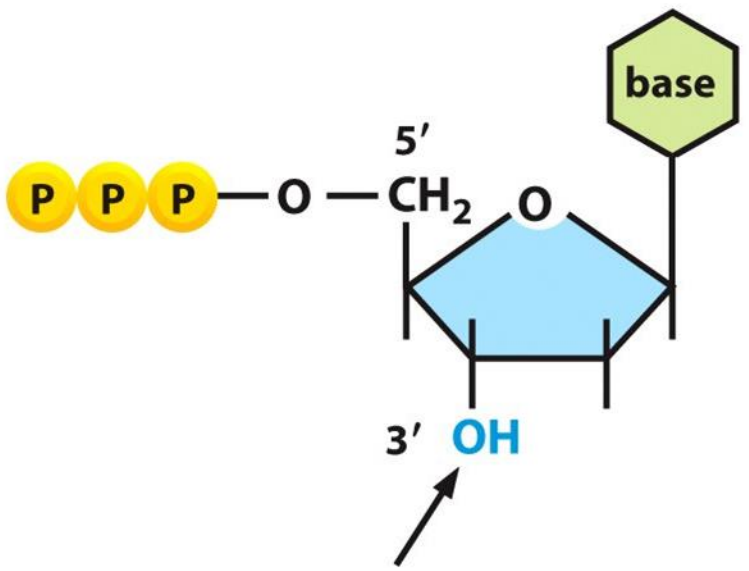
Frederick Sanger  
Prize share: 1/4

- Método foi desenvolvido em 1977.
- O método utiliza DNA polimerase, primer, ddNTPs e dNTPs.

# Método de Sanger

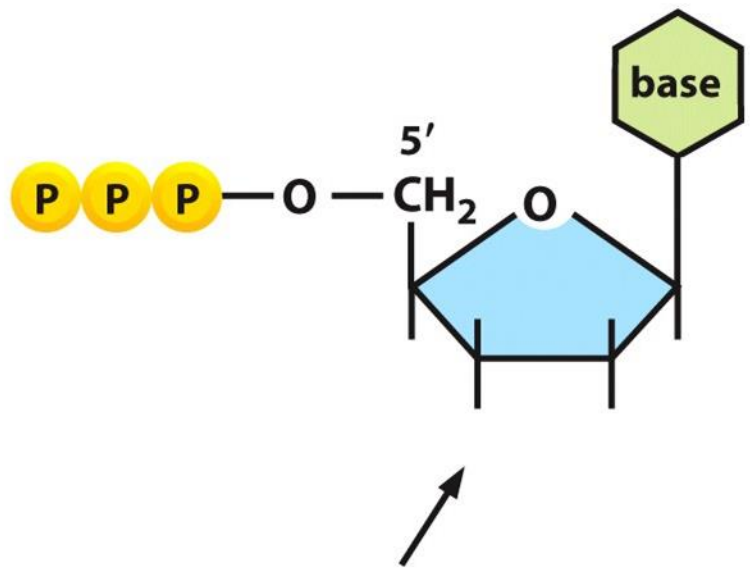
(ou de terminação de cadeia com dideoxirribonucleosídeos trifosfato)

**deoxyribonucleoside triphosphate**

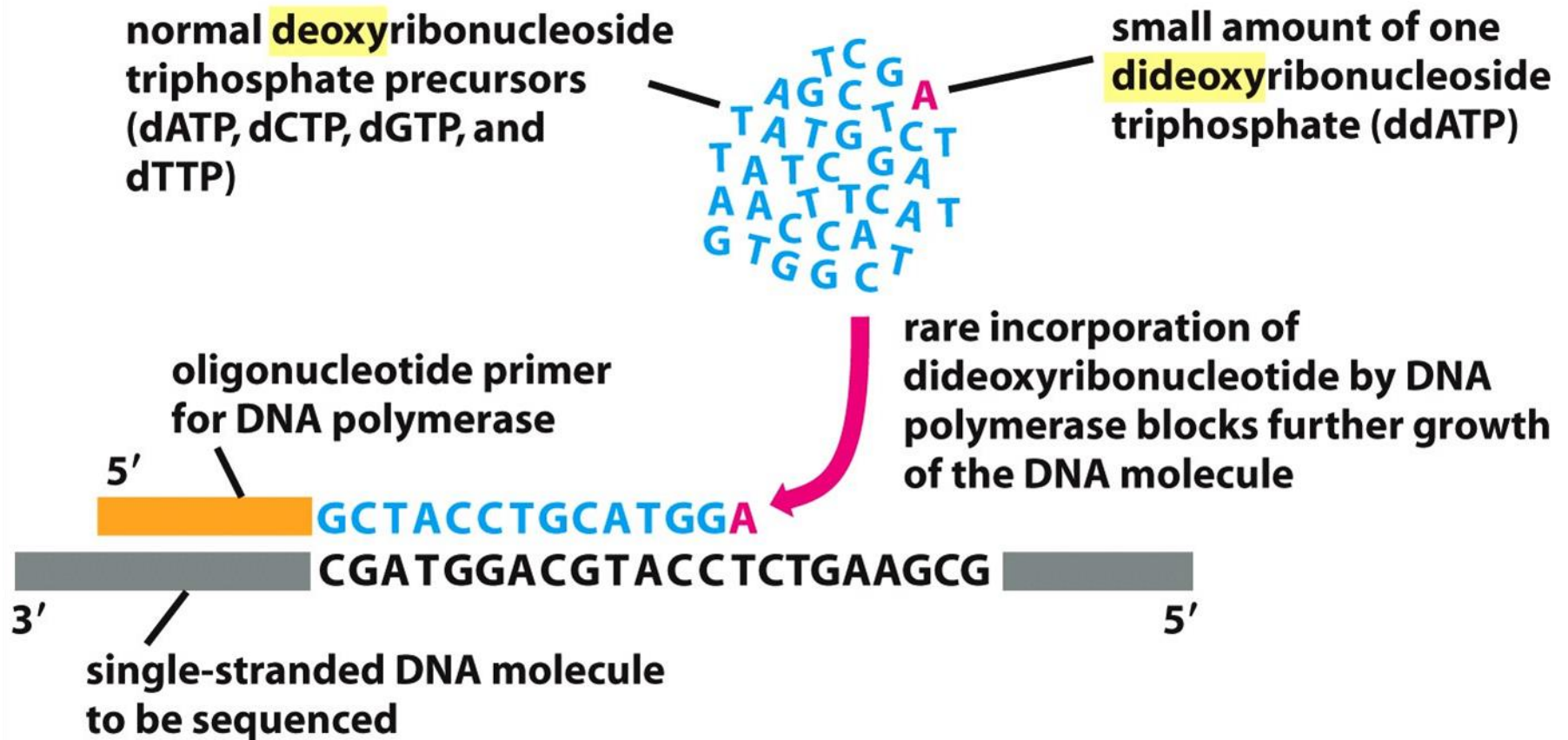


allows strand extension at 3' end

**dideoxyribonucleoside triphosphate**



(ddNTPs)



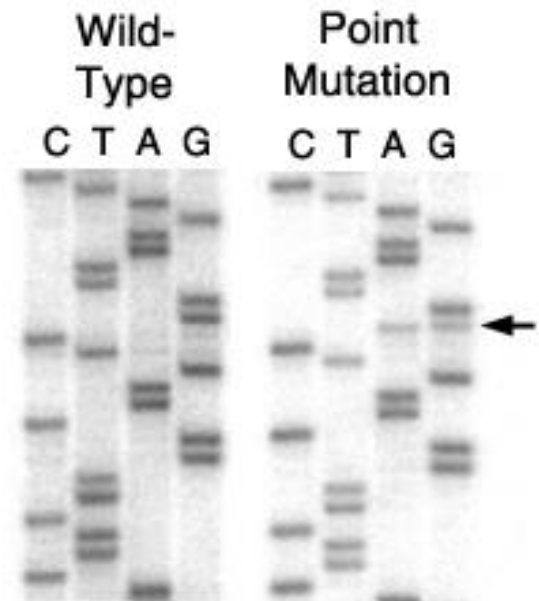
Após a incorporação do ddNTP ocorre a inibição da síntese da cadeia.







Frederick Sanger

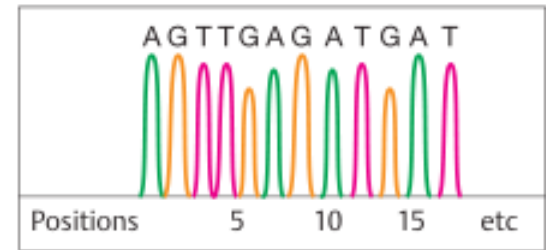
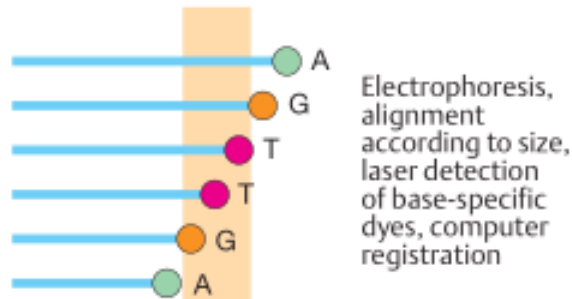


# Sequenciamento automático de Sanger

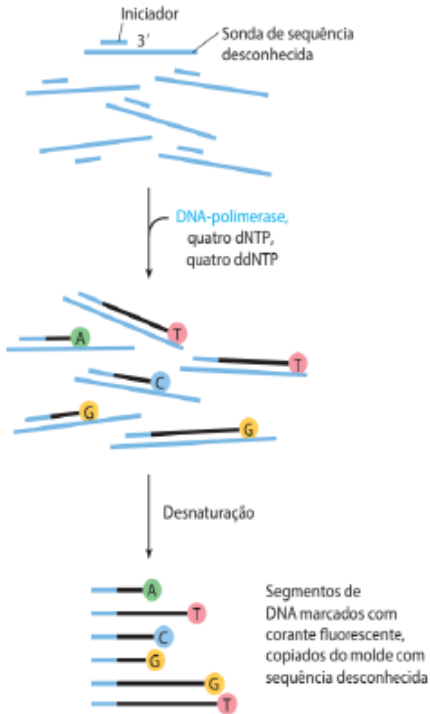
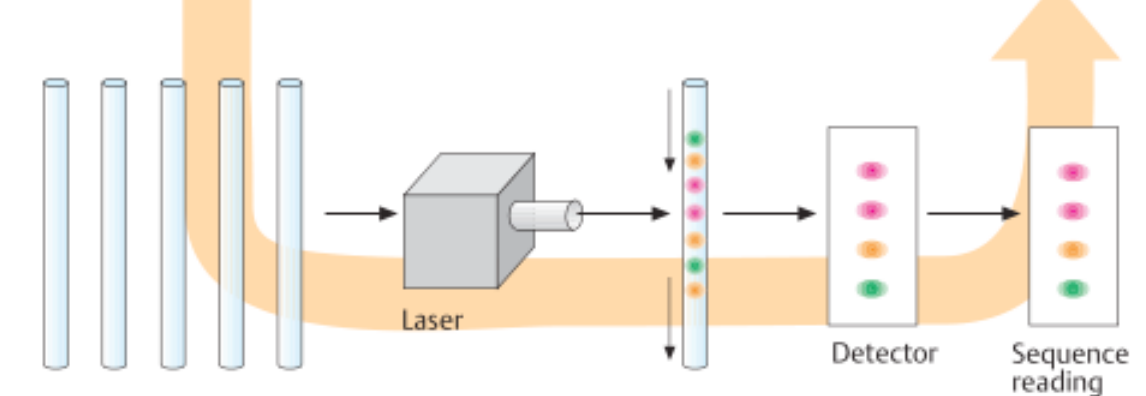
Cada ddNTP possui um fluoróforo de cor diferente.

● ddATP      ● ddCTP      ● ddGTP      ● ddTTP

1. ddNTPs each with different fluorescent label



2. Sequencing reactions

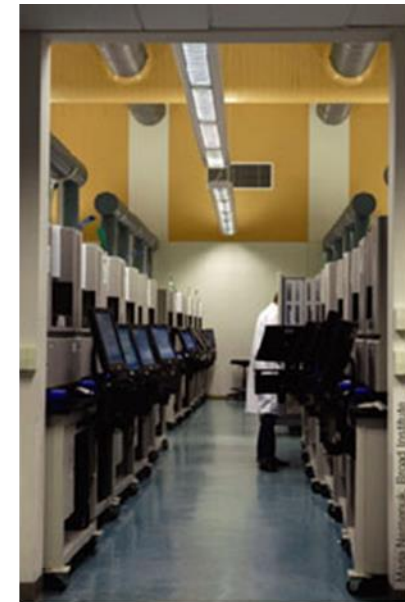
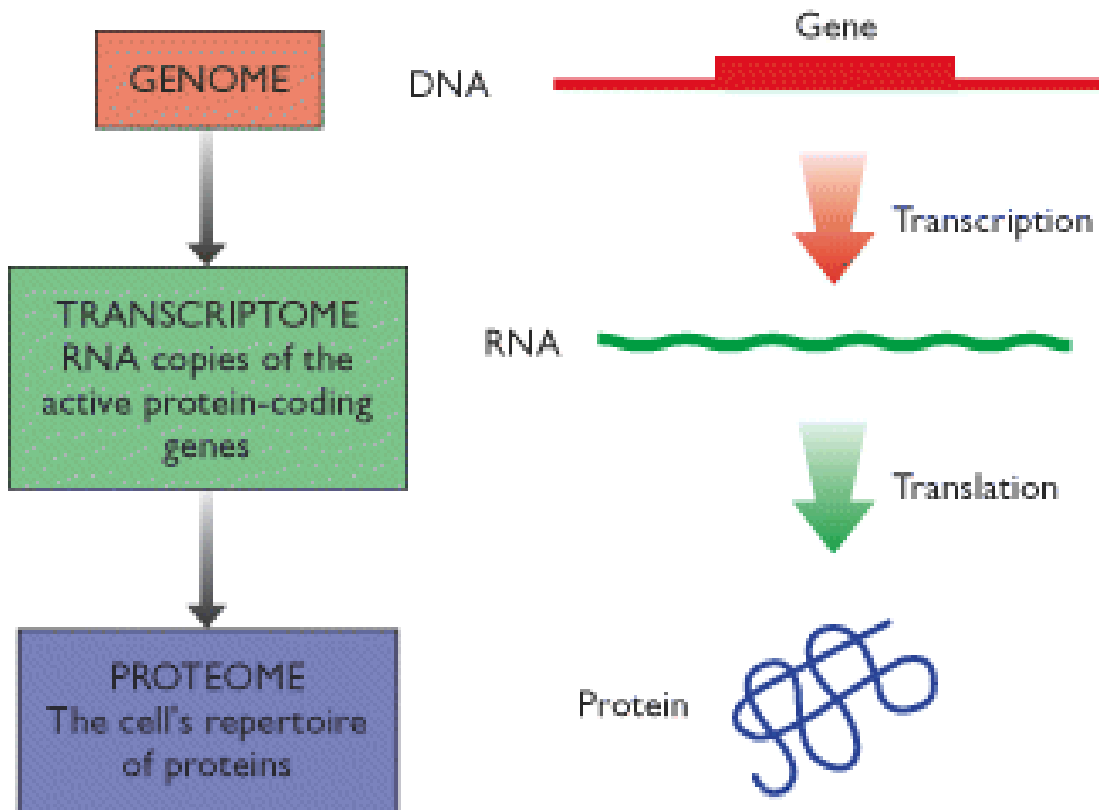


# SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO



# Sequenciamento de Genomas

- a automatização do sequenciamento de DNA tornou possível projetos de sequenciamento em larga escala



Sequenciamento automático de DNA

Sequencing centers producing the Sanger sequence data for mammalian genome projects are factory-like outfits with a large number of personnel.

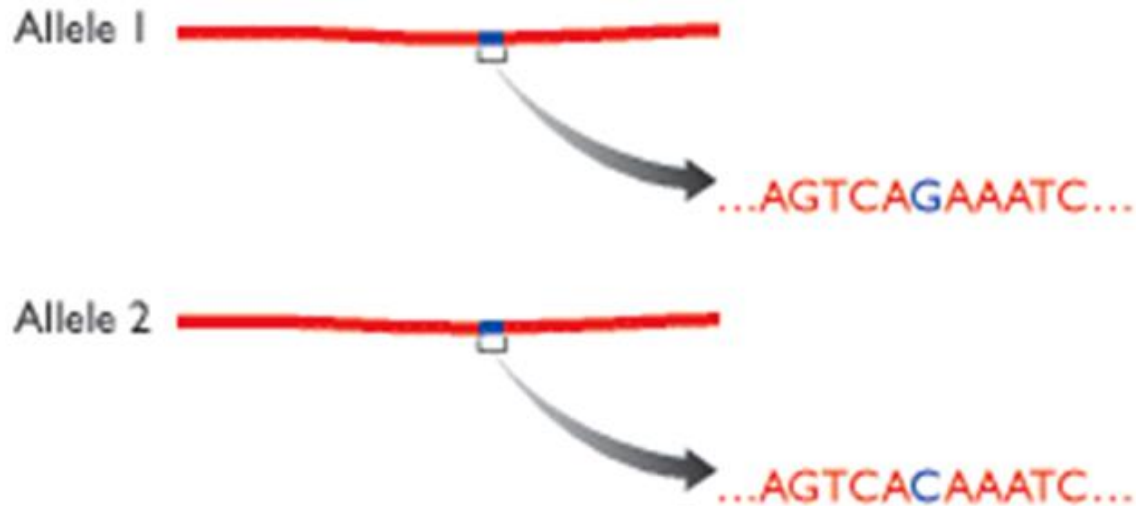
*Maria Nemenuk, Broad Institute*

# Variações na sequência genômica entre indivíduos

## SNPs

(*Single Nucleotide Polymorphisms*)

(Polimorfismos de um Único Nucleotídeo)



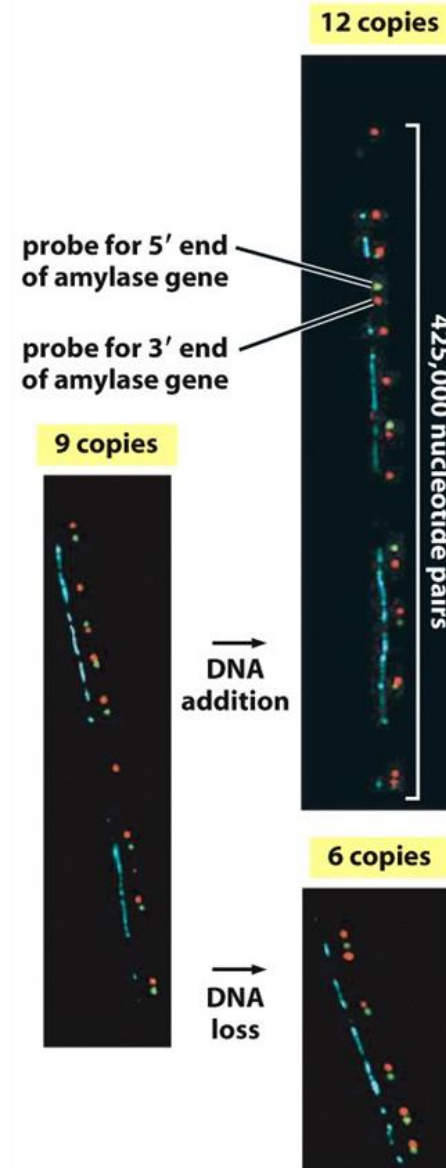
- Variação na sequência de DNA onde apenas um nucleotídeo difere;
- Para ser considerado SNP deve estar presente em pelo menos 1% da população

# Variações na sequência genômica entre indivíduos

CNVs:

(*Copy Number Variation*)

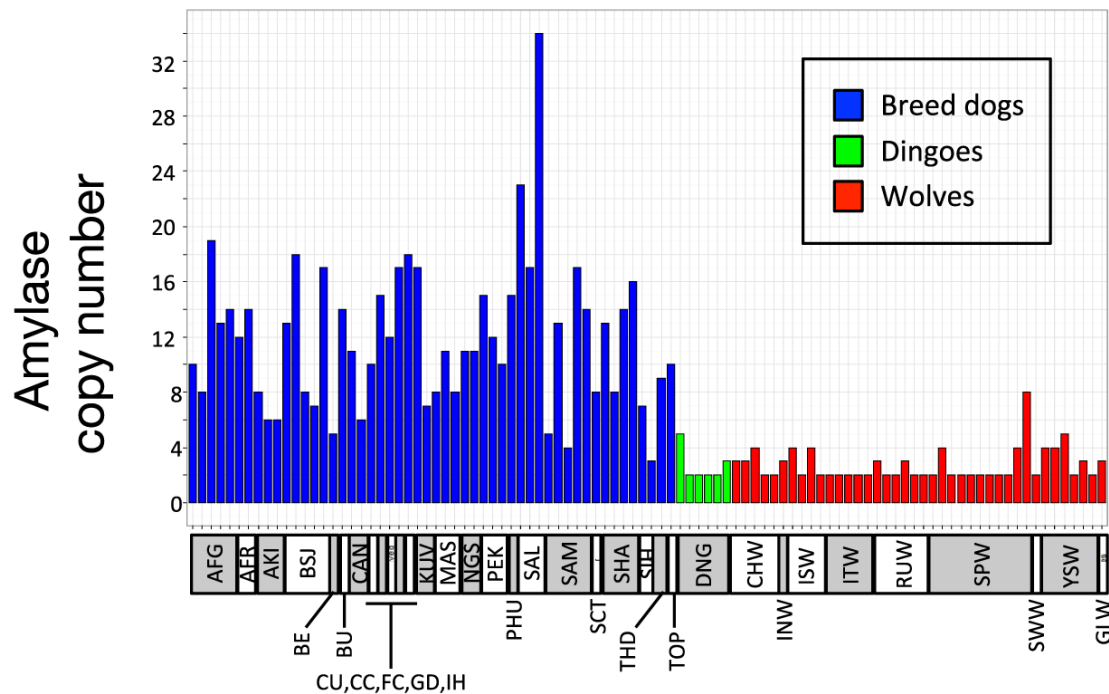
Quando o número de cópias de um determinado gene varia de um indivíduo para outro.



Visualização de um CNV frequente em humanos

# Expansão no número de cópias do gene da amilase em cães

Enquanto lobos apresentam em média 2 cópias do gene para amilase, cães apresentam números maiores



<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004016>

# Next generation sequencing (sequenciamento de nova geração)

- Sequenciamento automático de Sanger (1ª geração).
- Tecnologias desenvolvidas após esta são conhecidas como sequenciamento de nova geração.



Bioinformática!!