



# PCR ocorre em ciclos

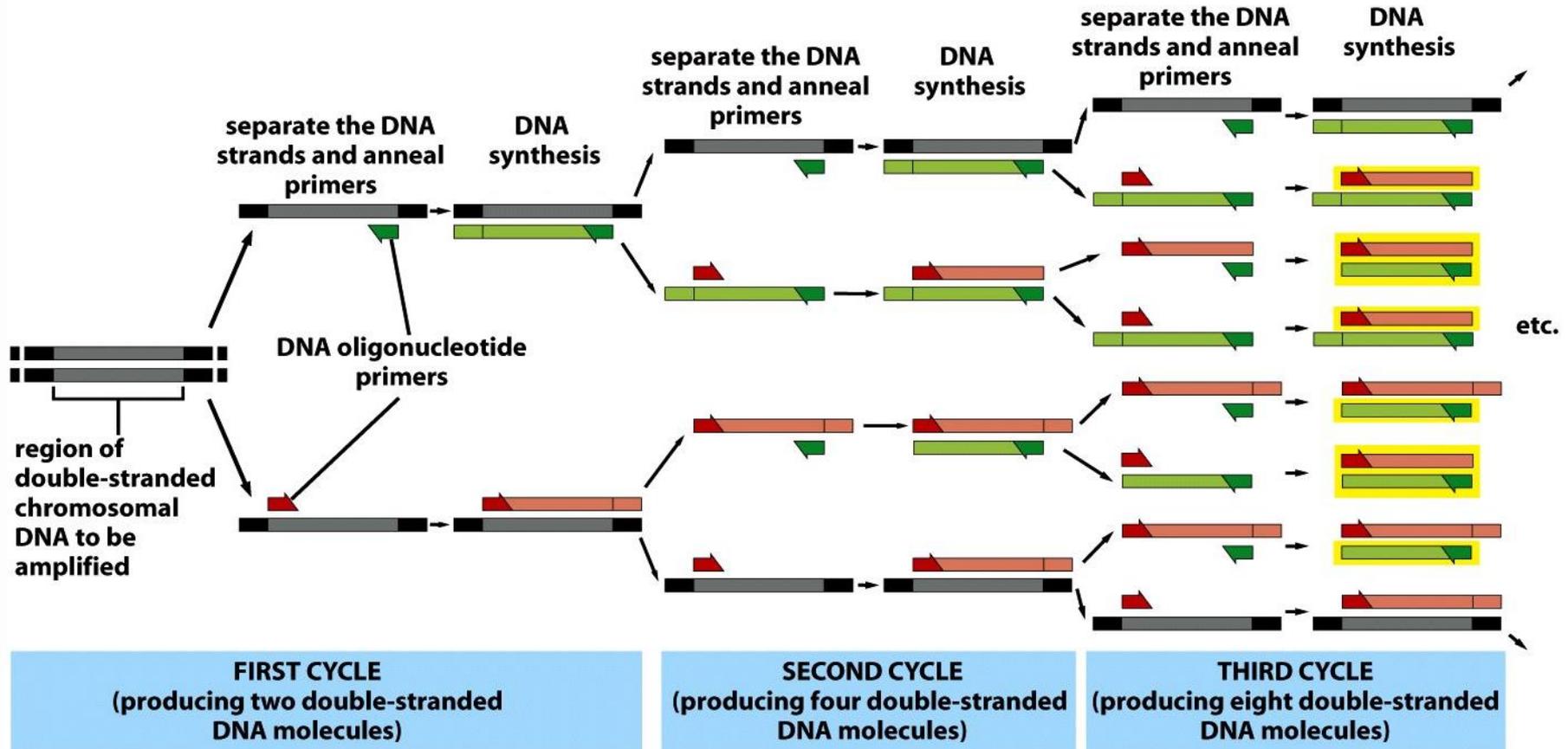


Figure 8-45b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

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'

\*Na verdade em geral primers tem entre 18 e 24 nts de tamanho

# Um ciclo de PCR e suas etapas

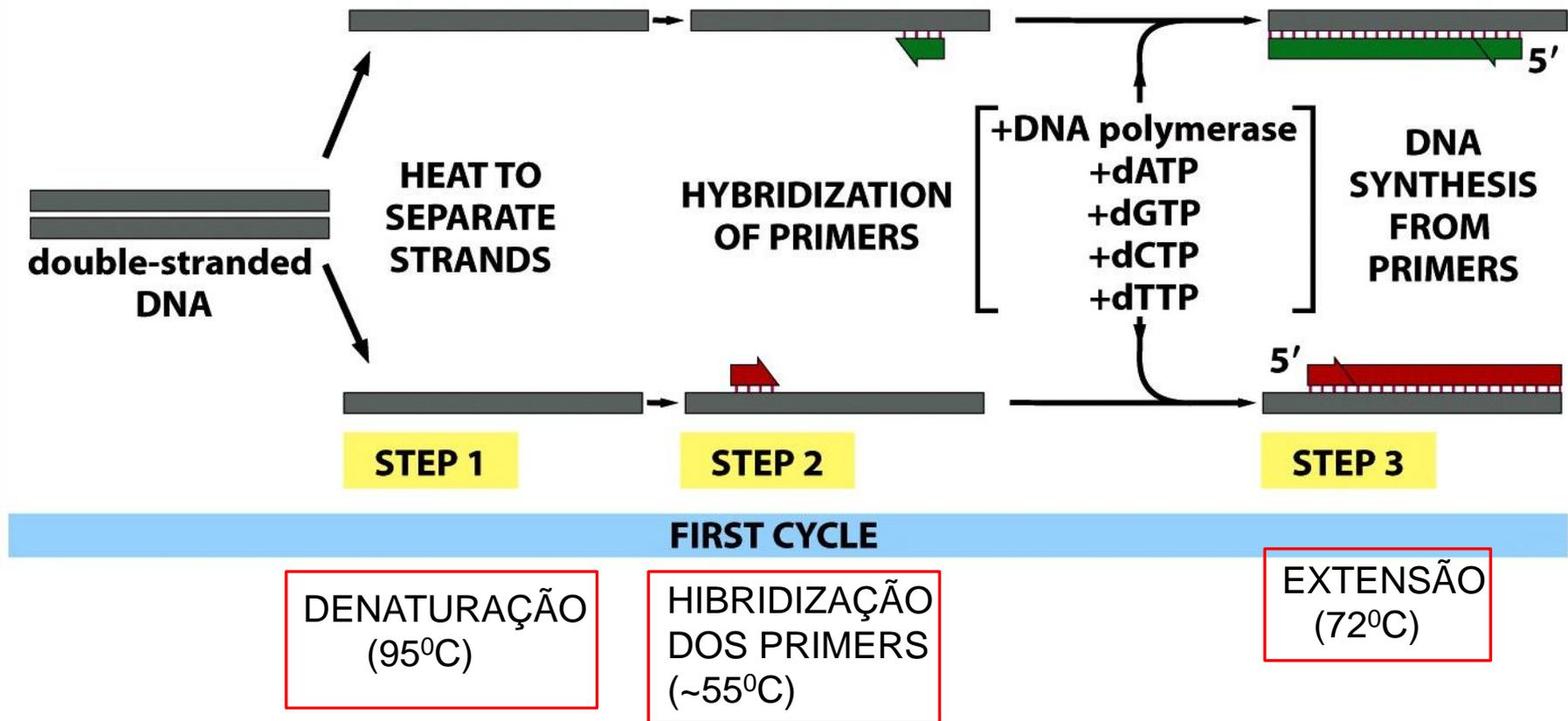
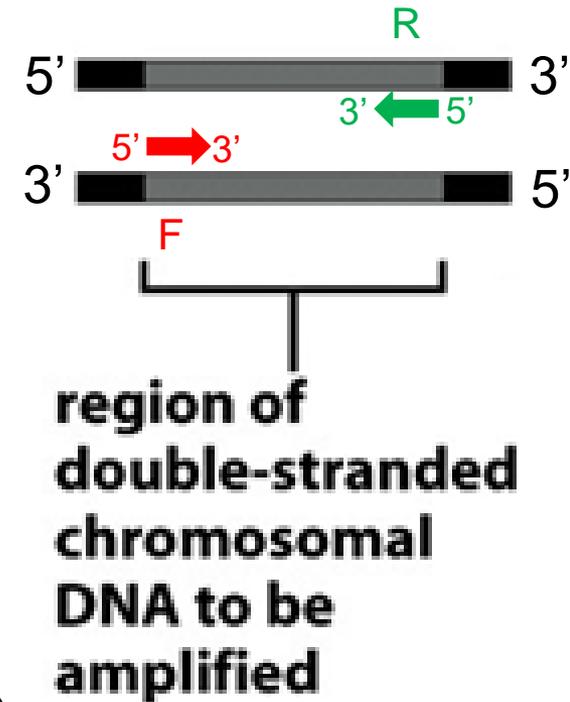


Figure 8-45a. *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

# Primers para PCR:

(primers = oligonucleotídeos = iniciadores)

- 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 F e primer R



Primer F= primer forward  
Primer R= primer reverse

# 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)

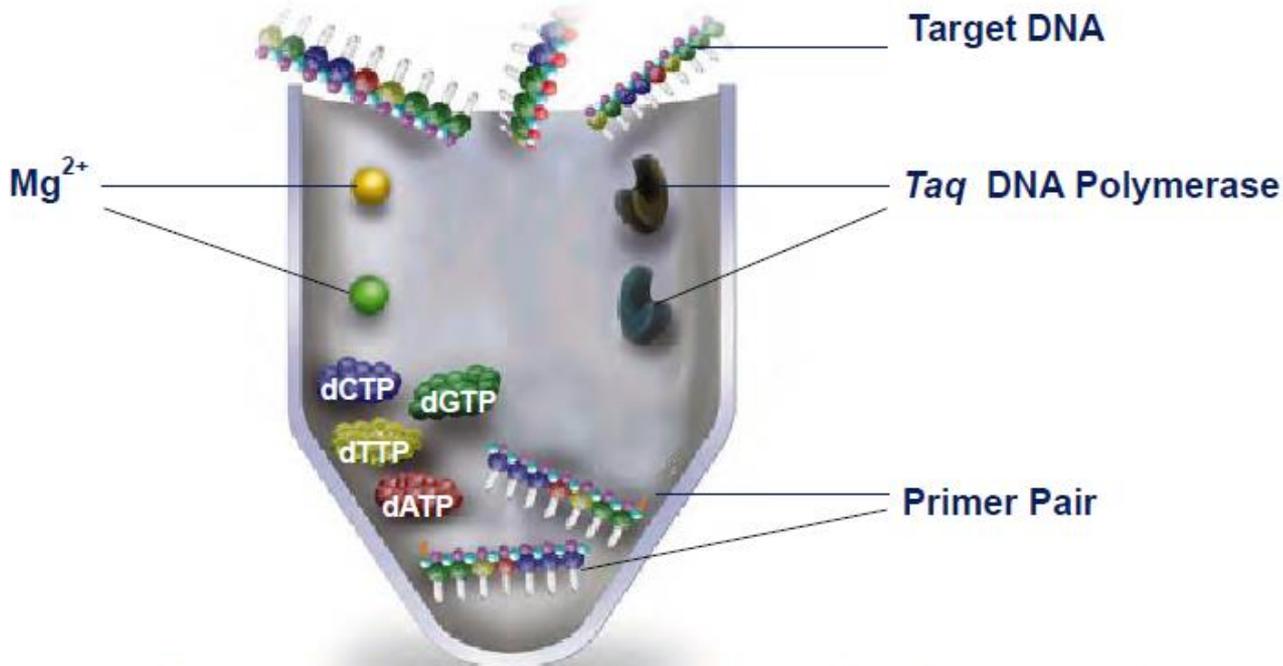
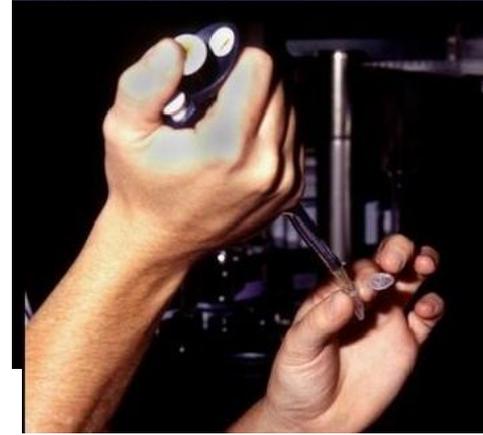
Não tem atividade revisora: 1-2 erros a cada  $10^4$  bases

Atualmente, enzimas mais eficientes e com alta fidelidade estão disponíveis

[https://dnalc.cshl.edu/resources/3d/  
19-polymerase-chain-reaction.html](https://dnalc.cshl.edu/resources/3d/19-polymerase-chain-reaction.html)

[https://dnalc.cshl.edu/resources/ani  
mations/pcr.html](https://dnalc.cshl.edu/resources/animations/pcr.html)

Reagentes para a PCR são pipetados em microtubo

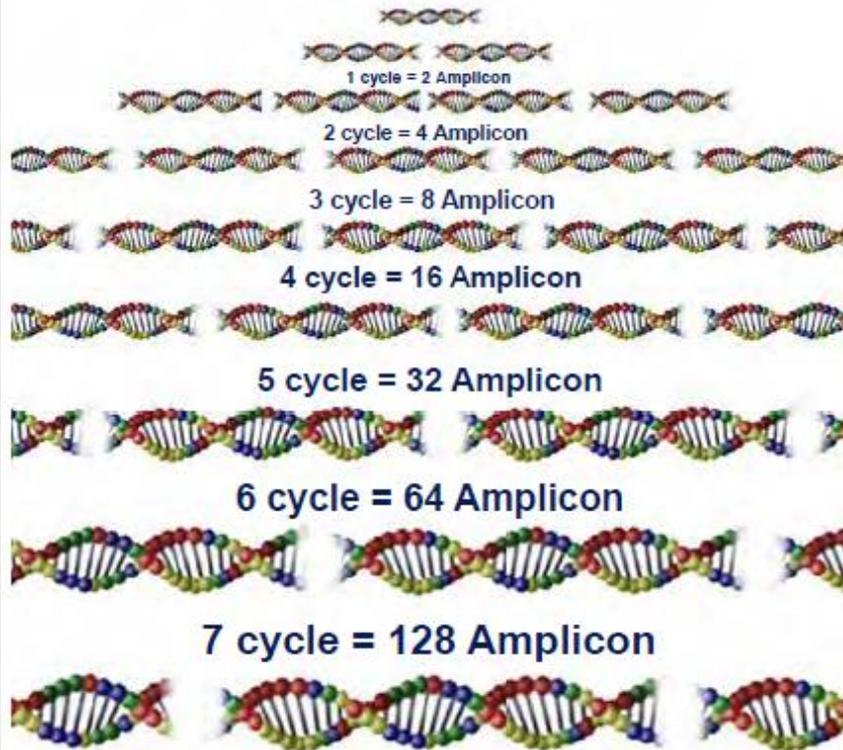


A amplificação se dá em ciclos de síntese da sequência alvo

# Termociclador



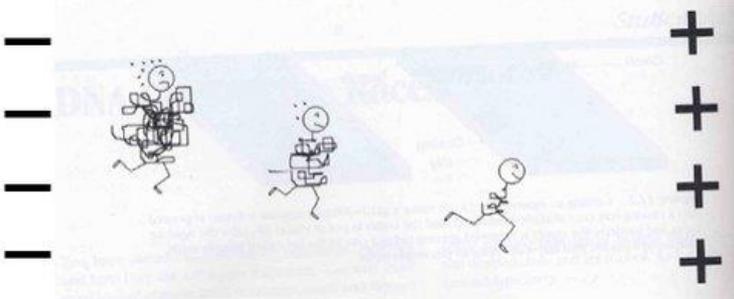
# Amplificação do alvo



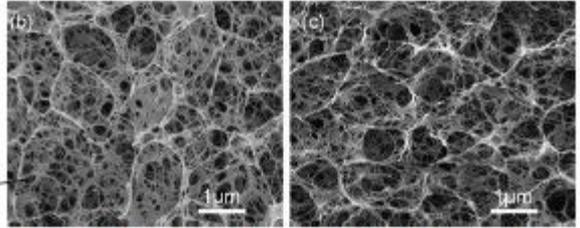
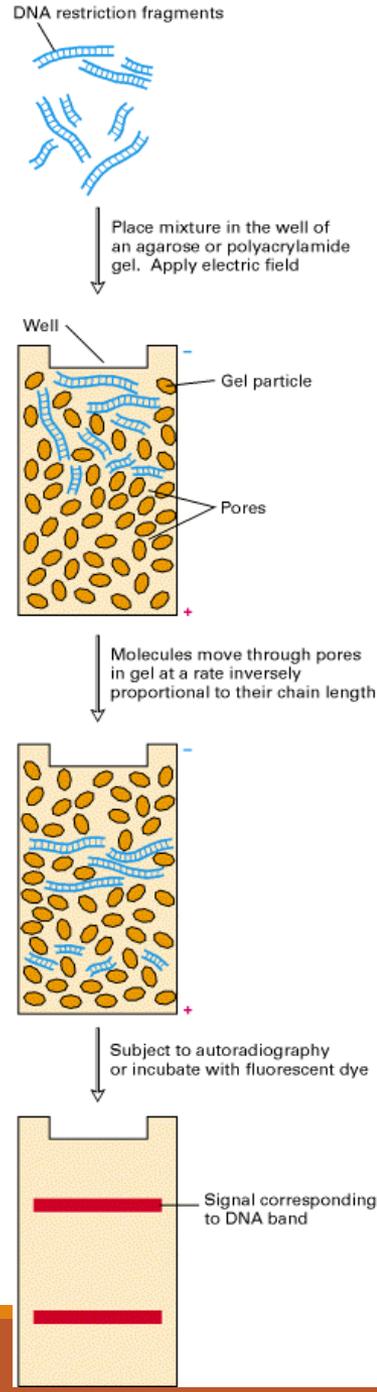
No. of Cycles	No. Amplicon Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

# Eletróforese em gel de agarose

Moléculas maiores migram mais devagar que as menores, pois encontram mais resistência para passar pelos poros do gel.



O DNA (carga negativa) migra para o eletrodo positivo.



Mao et al., 2016. Normal force controlled rheology applied to agar gelation. Journal of Rheology 60(3):473-489.

(Brometo de etídeo)

# Visualização do produto amplificado através de eletroforese em gel de agarose

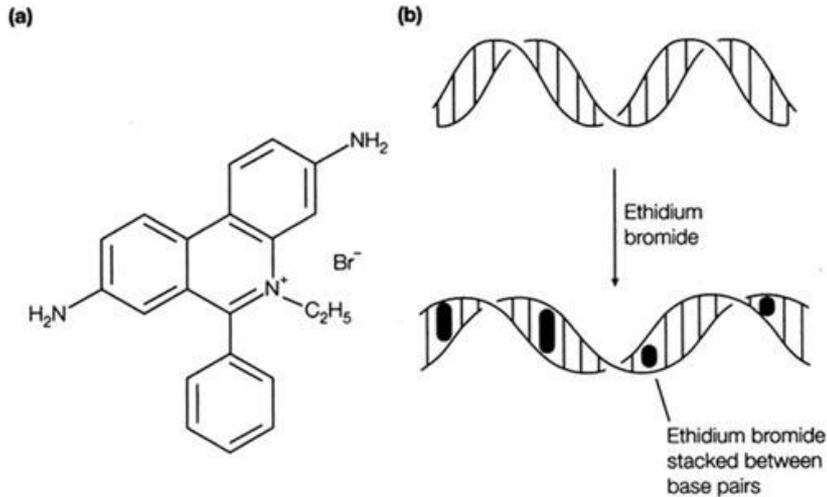
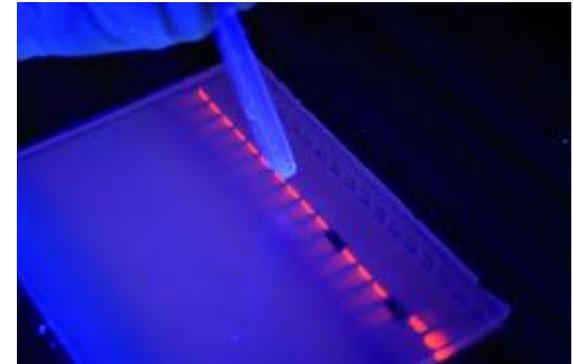
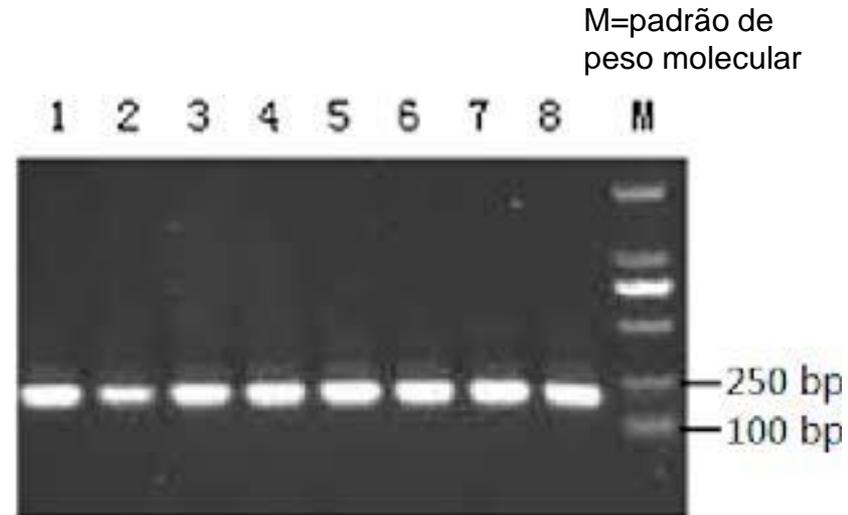


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.

Brometo de etídeo

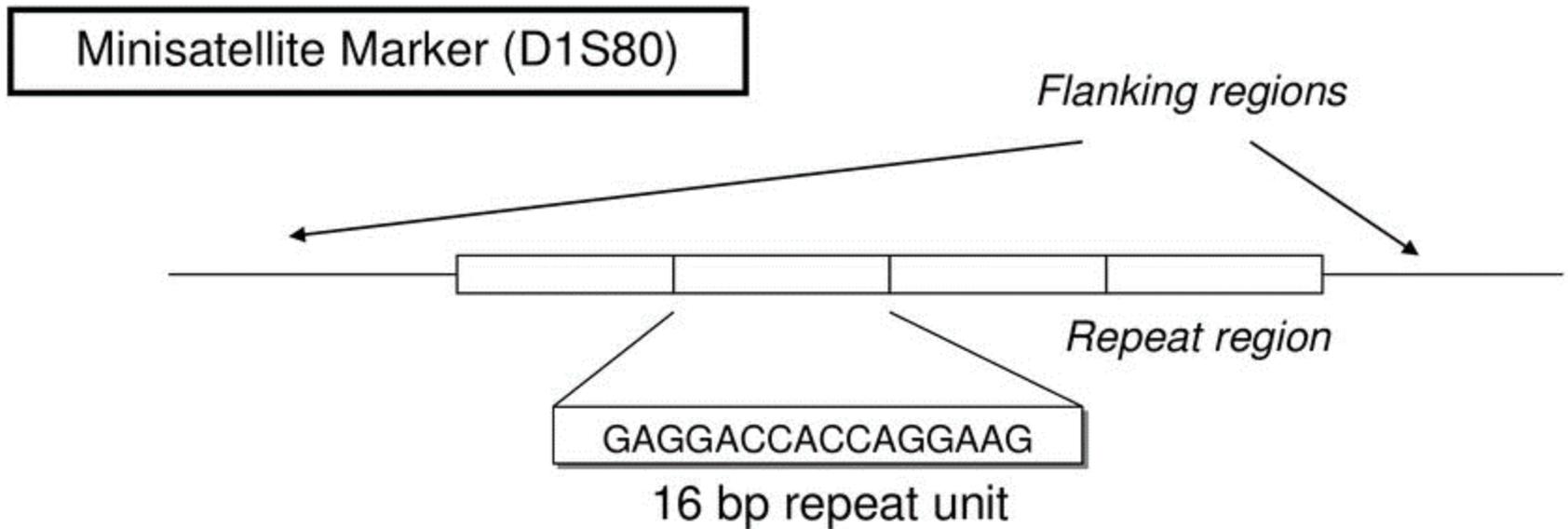


Gel corado com brometo de etídeo e exposto a luz UV

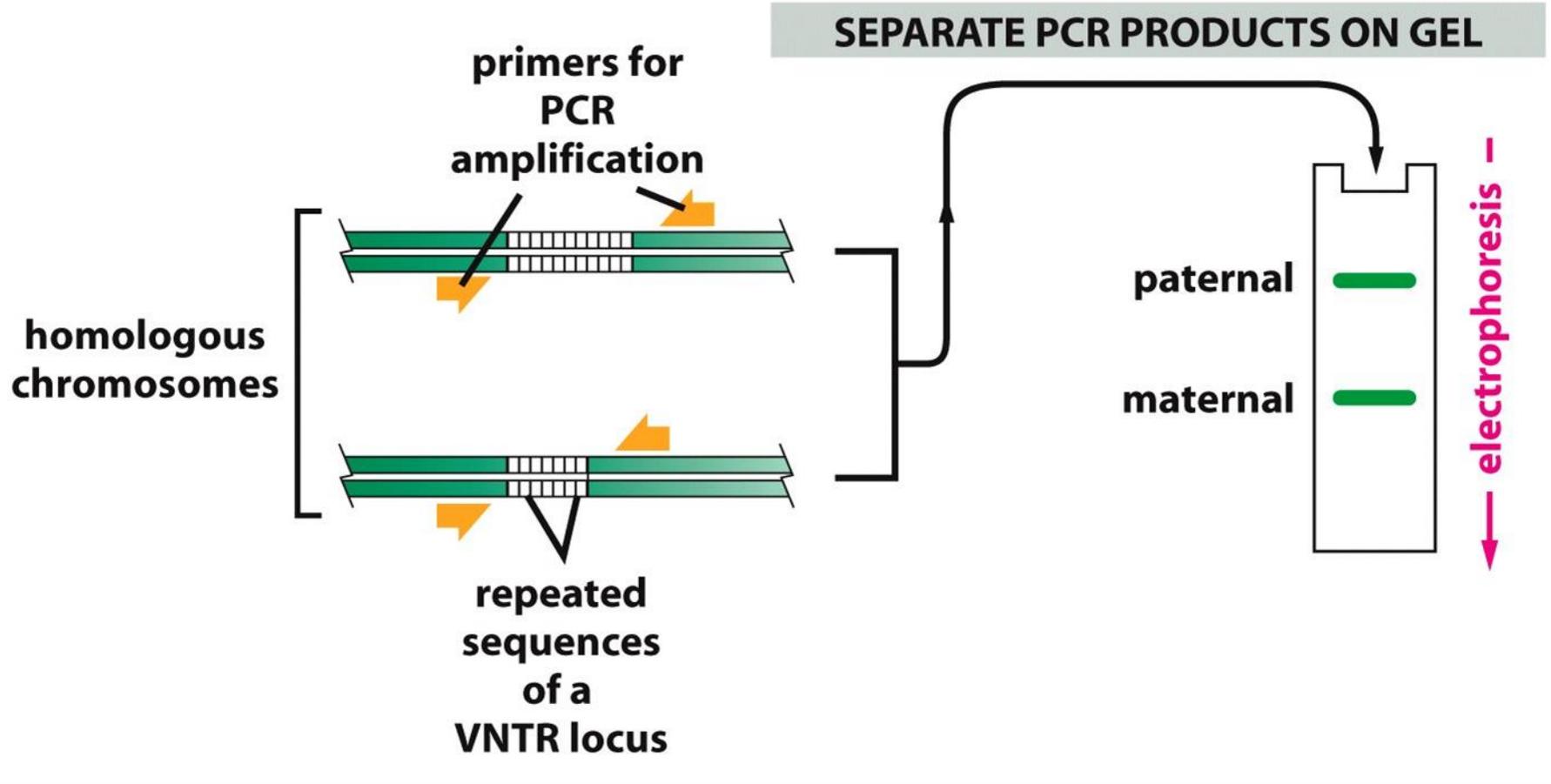


# Impressão digital molecular

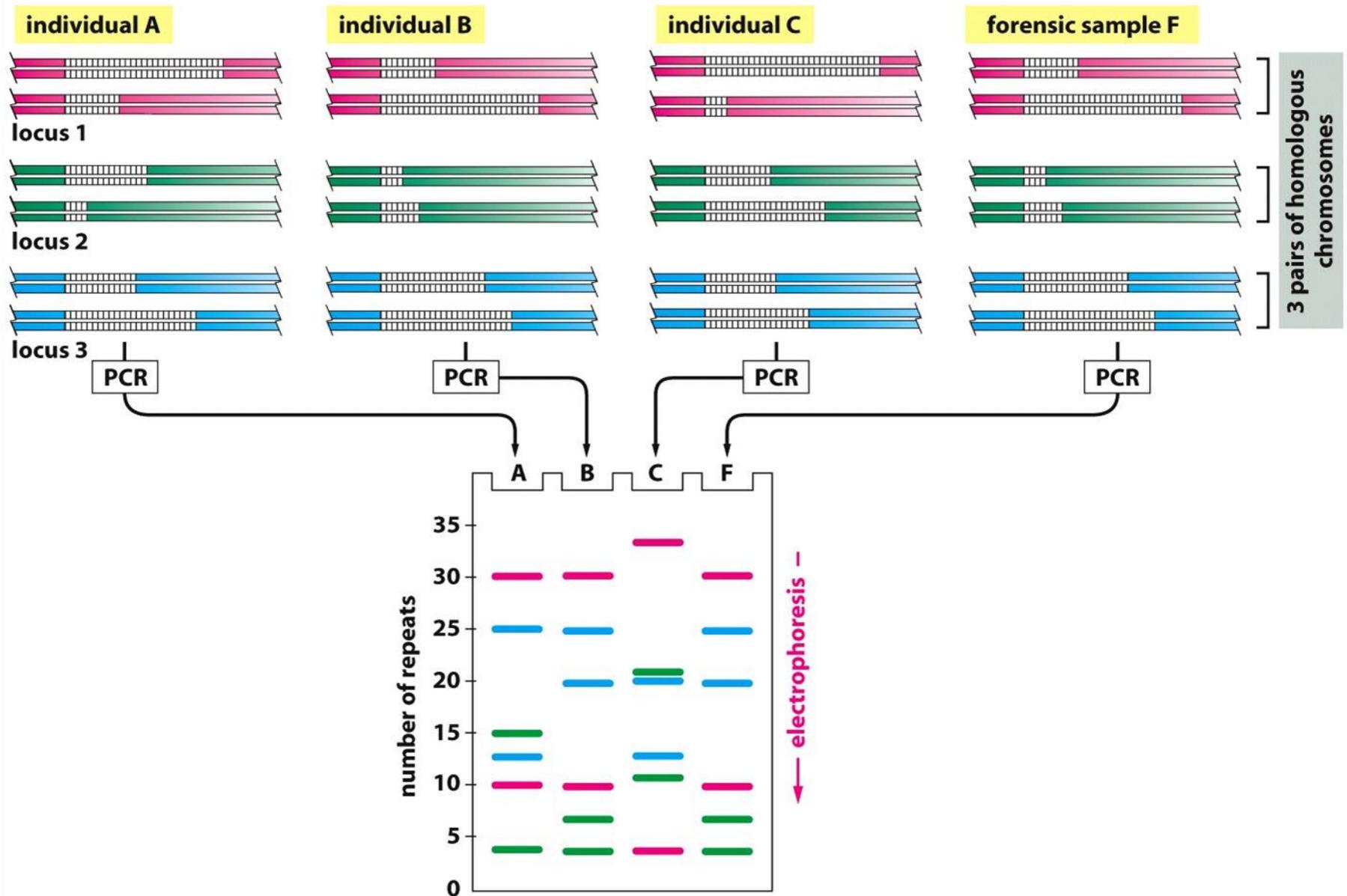
Análise de sequência microsatélite hipervariável ou VNTR (número variável de repetições *in tandem*)



# Aplicação da PCR em teste de identificação genética (DNA fingerprint)

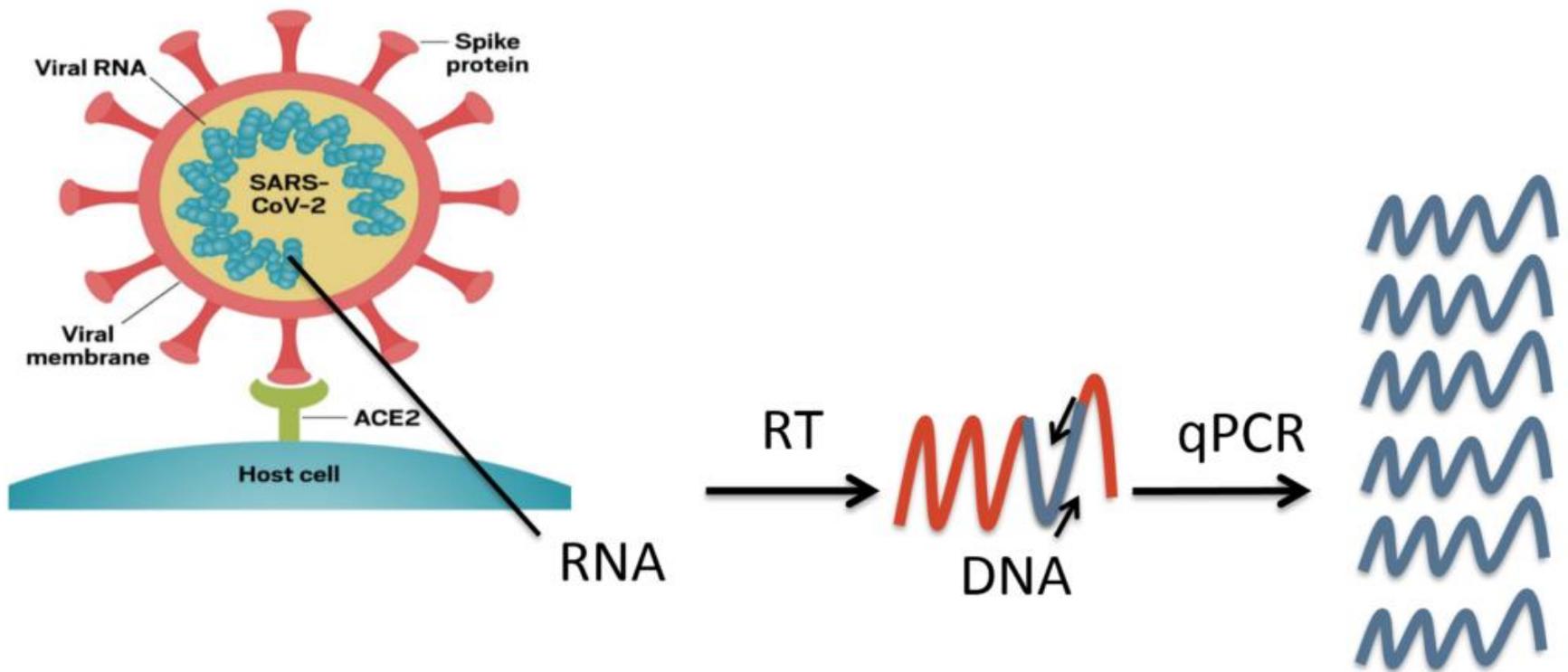


# Aplicação da PCR na investigação forense



# 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)

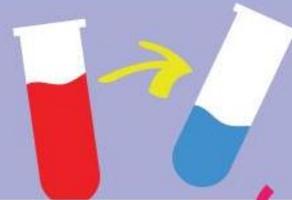
**2**



Extração do RNA viral  
da amostra do paciente

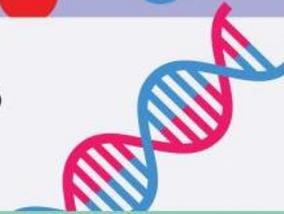
**3**

Conversão em DNA  
complementar (cDNA)  
ao RNA



**4**

Duplicação exponencial do  
cDNA por RT-qPCR



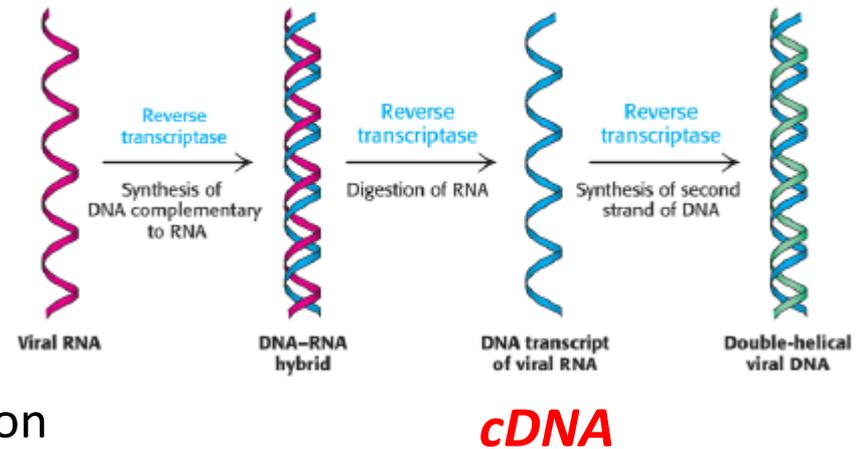
**5**



Análise do resultado por  
especialista para o diagnóstico

PCR de **transcrição reversa** (RT-PCR)

PCR **quantitativa** (qPCR)



RT-PCR

**Reverse Transcription** Polimerase Chain Reaction

qPCR

**Quantitative** Polimerase Chain Reaction

RT-qPCR

**Quantitative Reverse Transcription** Polimerase Chain Reaction

*\*Um parênteses!!*

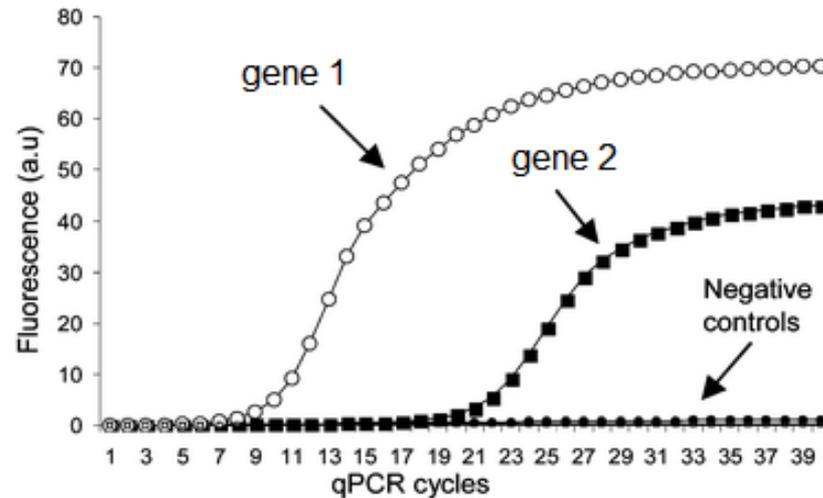
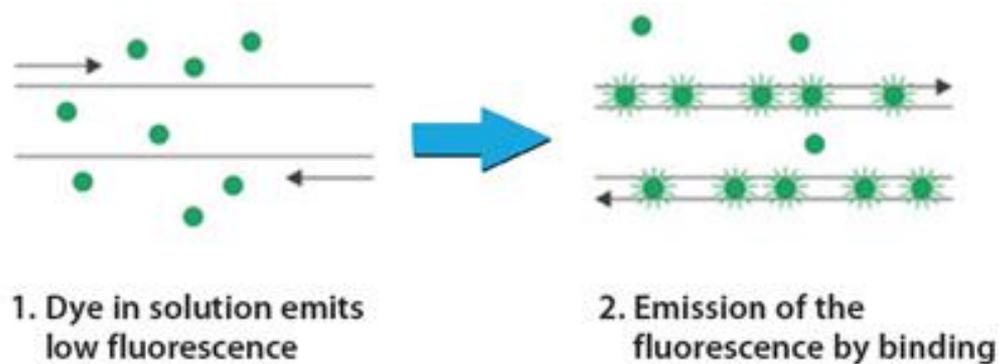
qPCR, **Quantitative** Polimerase Chain Reaction (também possui como sinônimo **Real-Time** PCR (RT-PCR, qPCR, rRT-PCR) um infeliz acrônimo de **Reverse Transcription**-PCR).

A forma **recomendada mais correta** quando se usa **transcriptase reversa** E **quantificação** é a já citada anteriormente (RT-qPCR).

# 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*.



## qPCR

<https://www.youtube.com/watch?v=1kvy17ugl4w>