



UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE SANTA CATARINA

# PCR

## Reação em Cadeia de Polimerase

**IV CURSO DE VERÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÔMICA**

MsC. Ingrid Thaís Beltrame Botelho – doutoranda

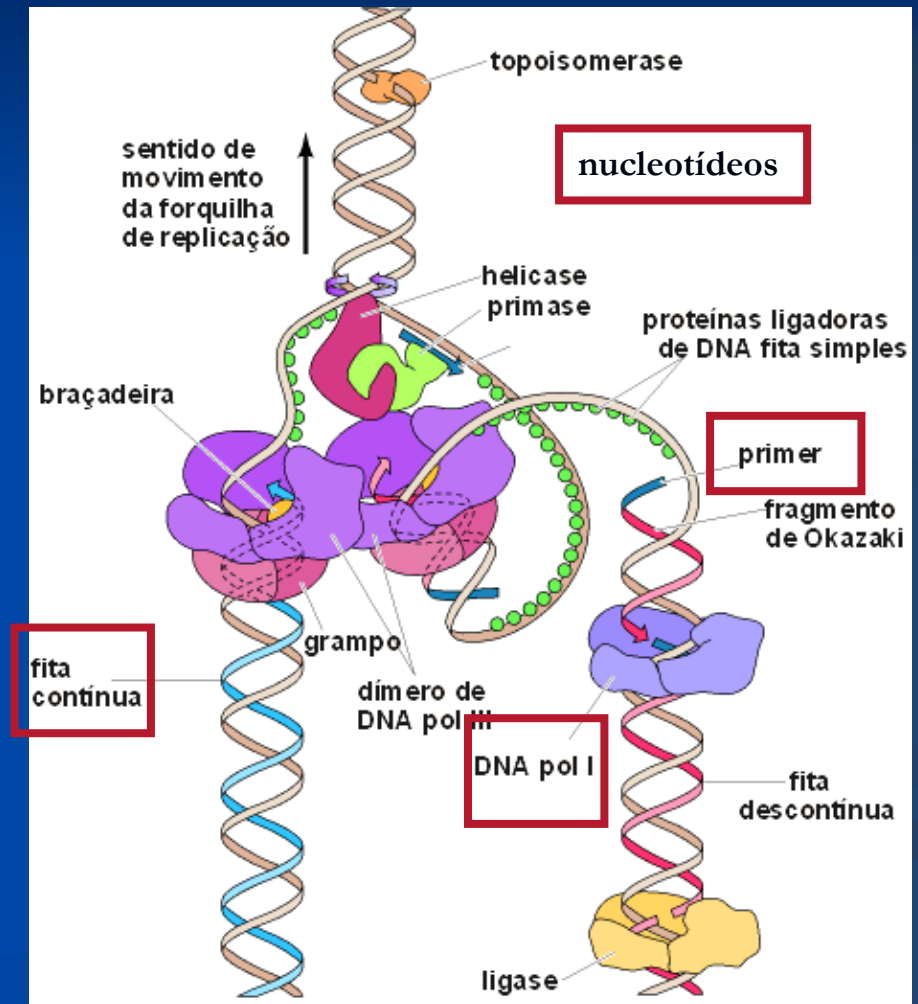
[ingridthaisbb@hotmail.com](mailto:ingridthaisbb@hotmail.com)

# O que é PCR?

- Amplificação de um segmento específico de DNA dentro de um genoma (gene ou parte dele, regiões supervariáveis, *Junk DNA*, etc.)
- “Fotocopiadora” molecular



# Cópias “*in vitro*” usando elementos básicos do processo de replicação natural do DNA.



- Inventada\* por Kary Mullis em 1983.
- Primeira publicação em 1985 (*Methods in Enzymology*)
- Recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1993.



Em 2004...

Atualmente...

PCR

**Results by year**

Last >>

1964: 4

1964 - 4 items

3. [of all three germ layers.](#) quantitative pcr

Species  
Humans  
Other Animals

[Clear all](#)  
[Show additional filters](#)

**Results by year**

2012: 26,774

2012 - 26

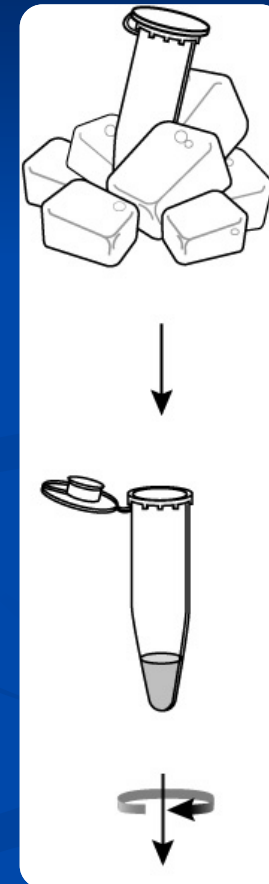
2013: 3667

Heavy metal influence on BDE-47 uptake in the human KERT<sub>r</sub> keratinocyte cell line.  
Y L L S, Zeng L Y, Luo J W, Wong M H

www.ncbi.nlm.nih.gov

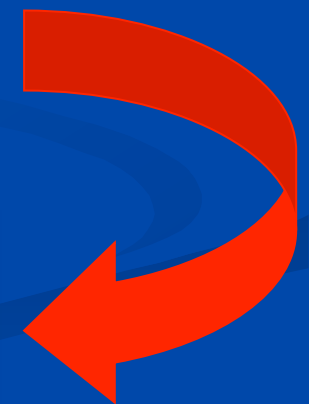
Curso Univille | 7-Zip - Gerenciado... | UNIVILLE | Curso de verão 2013 | PCR - PubMed - N... | Microsoft Word | PT

# Ambiente adecuado



# Reagentes Necessários para a Reação

- Água
- Tampão
- DNA molde
- Iniciadores\*
- Nucleotídeos
- Mg<sup>++</sup>
- DNA Polimerase (Taq)\*



PCR

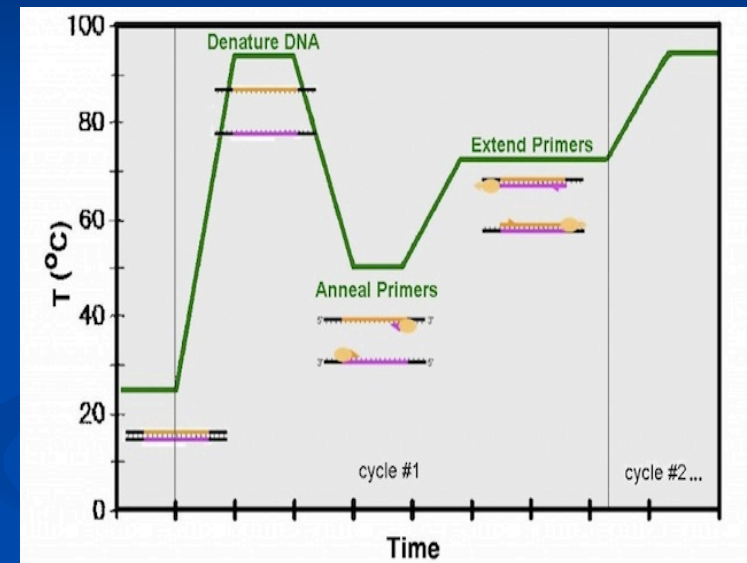


1989 - *DNA Thermal Cycler*, primeiro termociclador automático



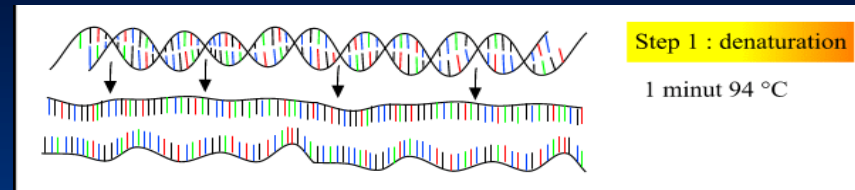
# Ciclos de Temperatura

1. Temperatura de desnaturação do DNA
2. Temperatura de ligação dos iniciadores
3. Temperatura de extensão da fita de DNA

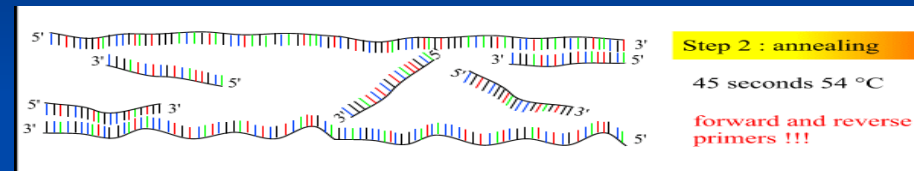


**Desnaturação inicial:** 4 minutos a 94°C é suficiente para a grande maioria dos casos.

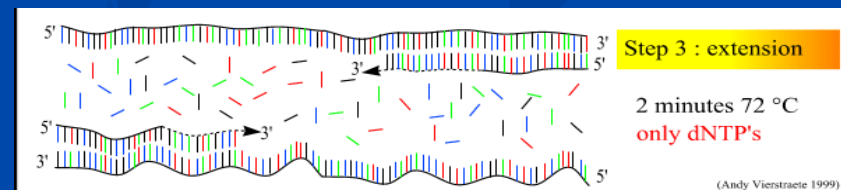
**Desnaturação:** 1 minuto a 94°C



**Ligação:** 1 minuto operando na temperatura de ligação específica do *primer*, podendo ser aumentada até 90 segundos.

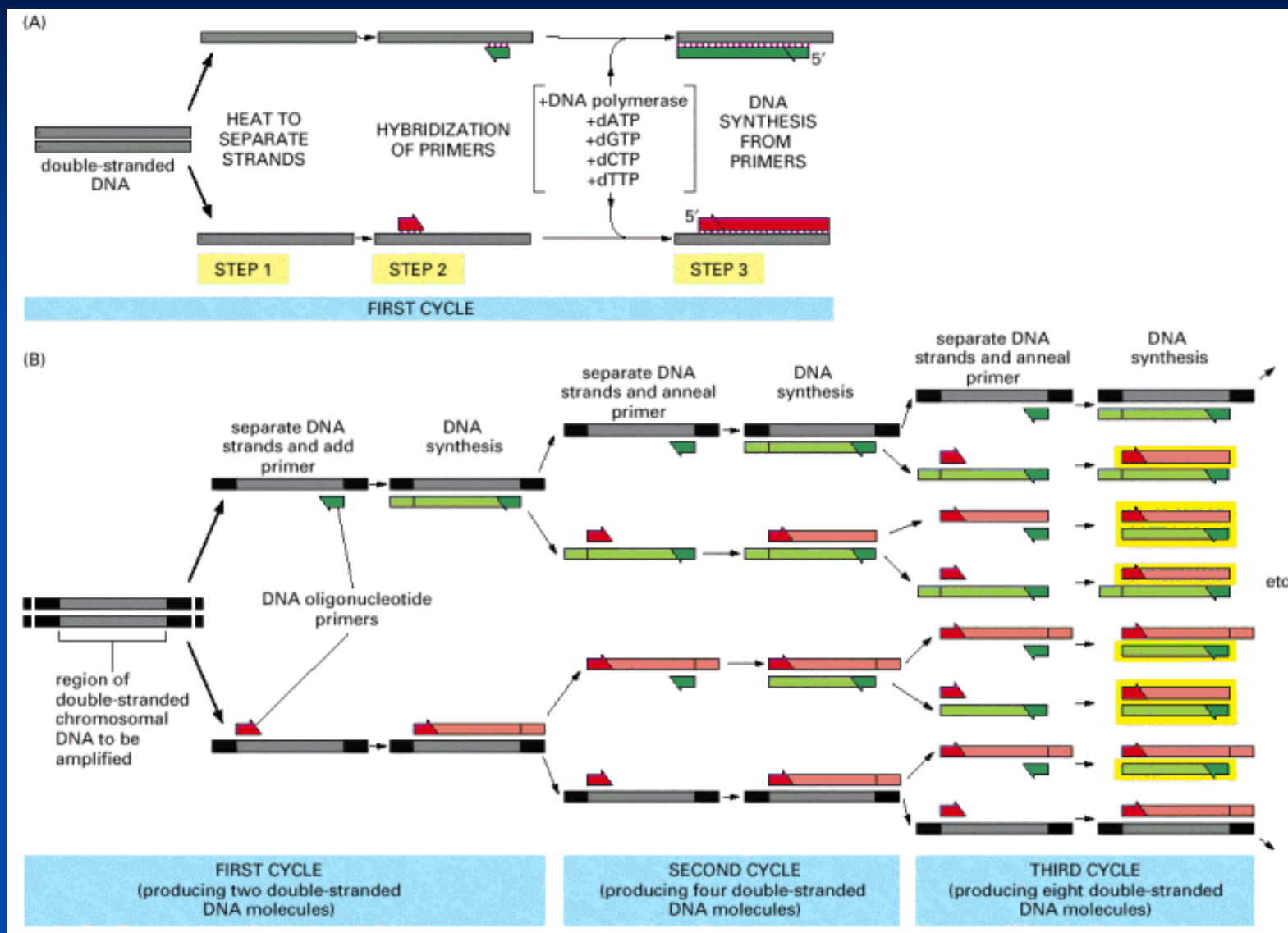


**Extensão:** Temperatura ótima da enzima. Para a *Taq*, utiliza-se 1 minuto a 72°C, podendo ser aumentada até 2 minutos de acordo com a quantidade utilizada, o número de ciclos e o tamanho do produto desejado



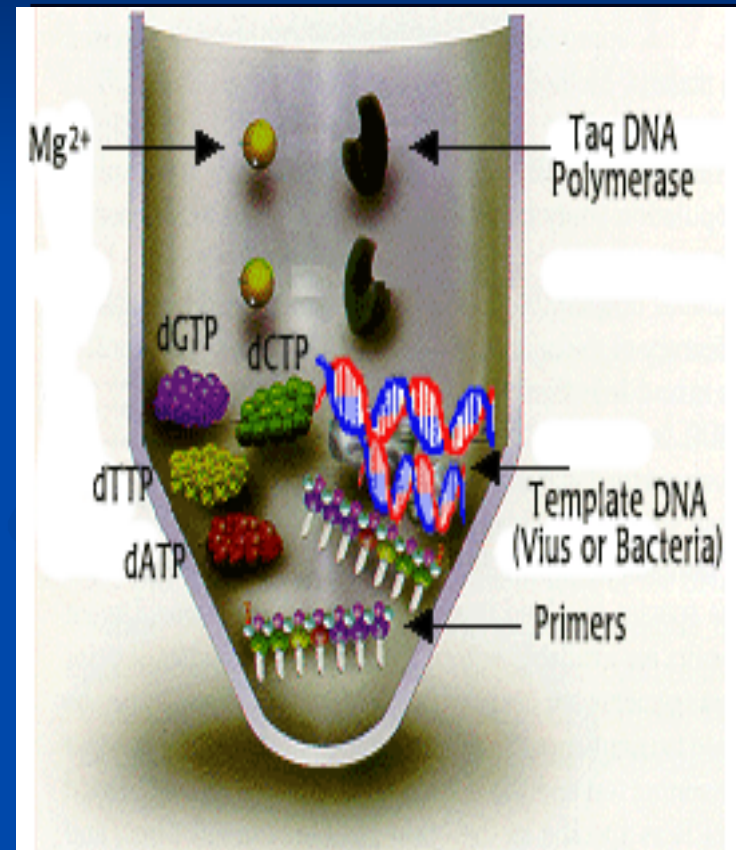
**Extensão Final:** Após o término dos ciclos, costuma-se acrescentar um passo de 4 minutos a 72°C, como oportunidade adicional para a polimerase agir

**Final:** Programa-se o termociclador para um *hold*, de 0 a 4°C, para manter as amostras conservadas até o momento de estocagem



# Reagentes Necessários para a Reação

- Água
- DNA molde
- Nucleotídeos
- Iniciadores\*
- DNA Polimerase (Taq)\*
- Tampão
- Mg++



# Reagentes Necessários para a Reação

- DNA molde



- Quantidade mínima de DNA
- Complexidade do DNA
  - De plasmídeos a genomas completos
- Pureza
  - Proteínas, lipídeos, outro DNA, reagentes extração
- Degradação
- Inibidores
  - EDTA, heparina
- Contaminação
  - Produtos amplificados

Dissolvido em água (deionizada estéril)

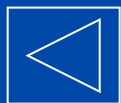
tampão (*TE* = Tris-EDTA; HEPES;  
NaOH 0,8M em água, etc.)



estocá-lo por longos períodos de tempo



-20°C - por até 2 anos em tampão apropriado.

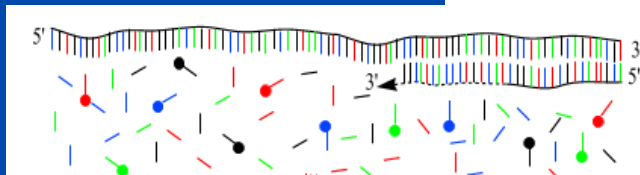
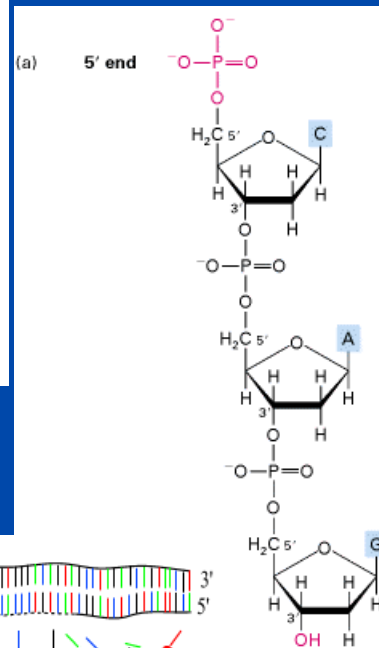
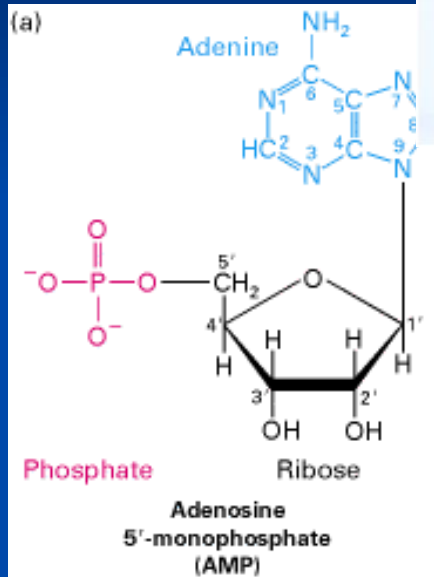


# Desoxinucleotídeos – dNTP's

PCR



(dATP, dTTP, dCTP, dGTP)



✓ Solução estoque de 10mM em água e pH 8,1\* sem pirofosfato

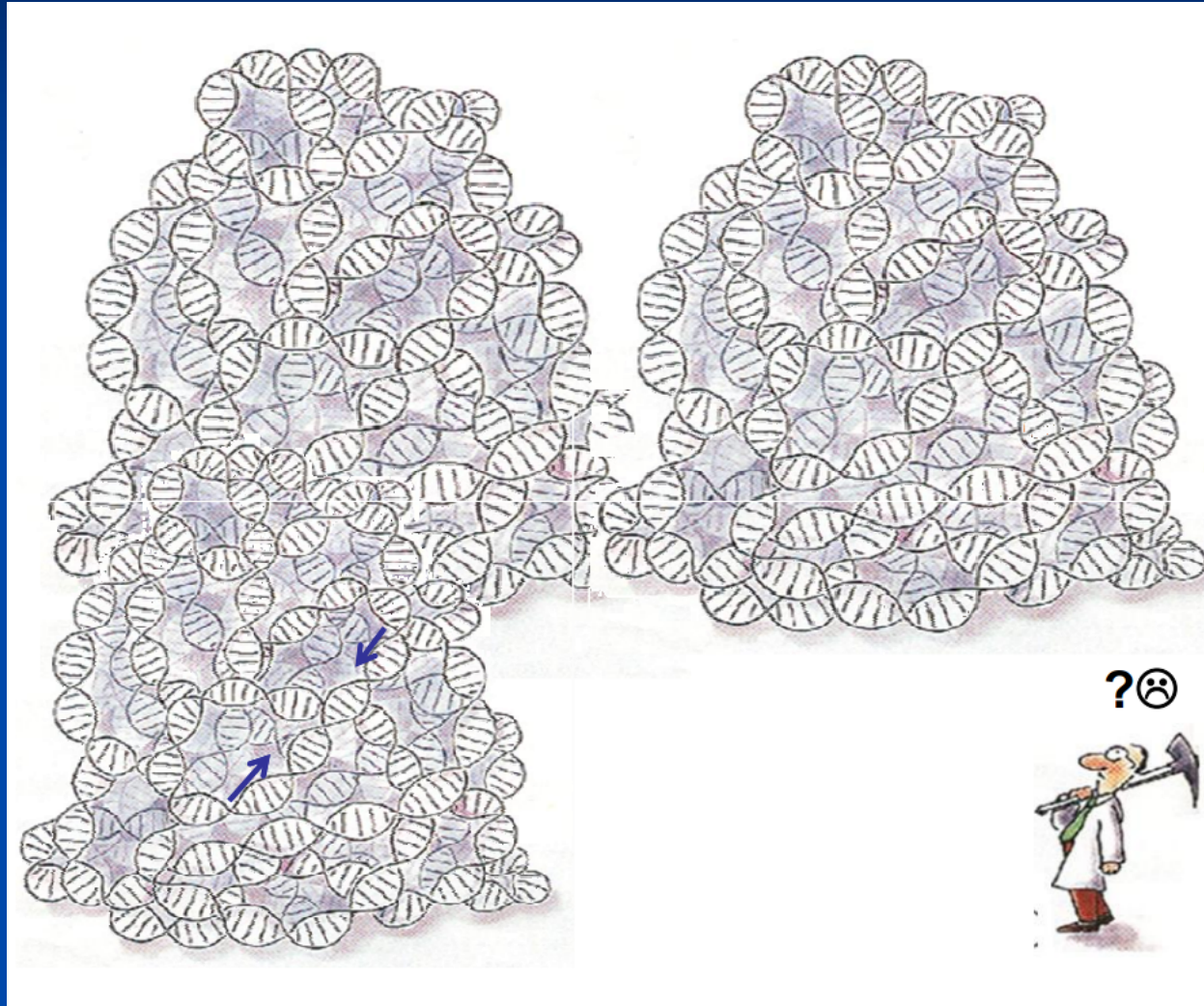
✓ Em concentrações iguais\*

✓ Concentração final entre 20 e 200 $\mu$ M, dependendo do tamanho do segmento e duração da reação

✓ Altas concentrações afetam especificidade dos iniciadores



# Inciadores / oligonucleotídeos / primers





# Reagentes Necessários para a Reação

Complementar a seqüência do DNA molde

15 a 30 pares de base\*

Conteúdo de C/G – 45 a 55%\*

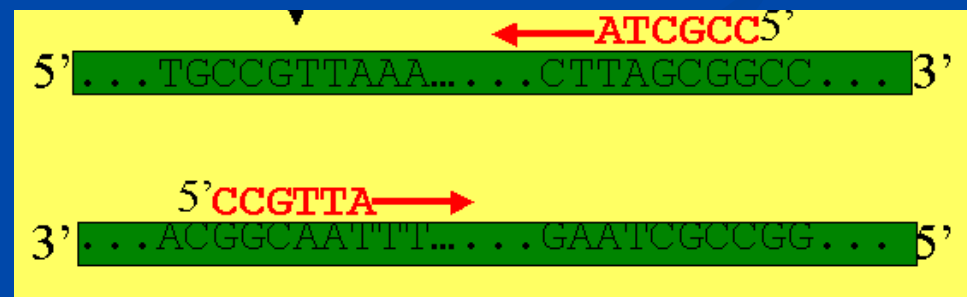
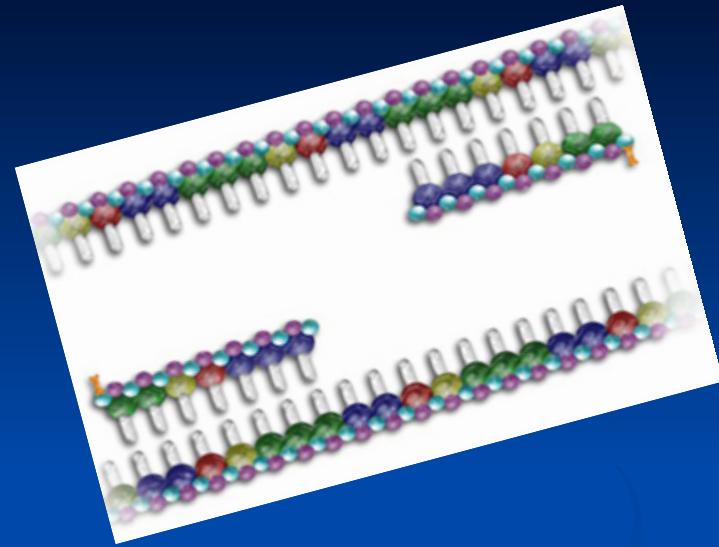
Normalmente sense e antisense/  
Forward e reverse

Concentração ótima 0,1 a 0,5µM

<i>NAME</i>	<i>SEQUENCE</i>	<i>BASE #</i>	<i>MW</i>	<i>TM</i>
<u>T7/T3/SP6/BGH</u>				
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AG	17	5122	40
T3es	A ATT AAC CCT CAC TAA AGG G	20	6092	48
T7	AAT ACG ACT CAC TAT AG	17	5161	40
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA	20	6161	44
BGH reverse	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	18	5592	50
<u>Bluescript primers</u>				
KS	CTC GAG GTC GAC GGT ATC GA	20	6152	56
SK	CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC	20	6113	52
BL-REV	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	19	5842	49
<u>pUC/M13 primers</u>				
M13-48R	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	24	7375	54
M13-21	T GTA AAA CGA CGG CCA GT	18	5529	48
M13-20	GTA AAA CGA CGG CCA GT	17	5224	47
M13-47	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	24	7285	63
<u>pGEX primers</u>				
pGEX 5'	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	23	7128	62
pGEX 3'	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	23	7137	62
<u>pET primers</u>				
T7 promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20	6122	48
T7 terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	19	5830	51
<u>pGL/pCAT primers</u>				
GL primer 1	TGT ATC TTA TGG TAC TGT AAC TG	23	7056	50
GL primer 2	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA	23	6975	52
RV primer 3	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC	20	6083	52
RV primer 4	GAC GAT AGT CAT GCC CCG CG	20	6098	58

# Considerar:

- Validade
- Número de congelamentos e descongelamentos
- Contaminação
- Quantidade
  - Pouco: pouca amplificação
  - Muito: pouca amplificação



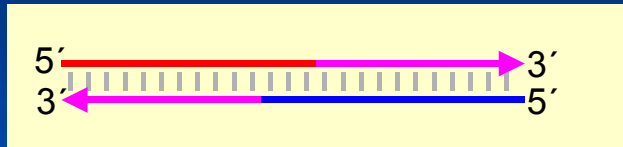
## Parâmetros para iniciadores



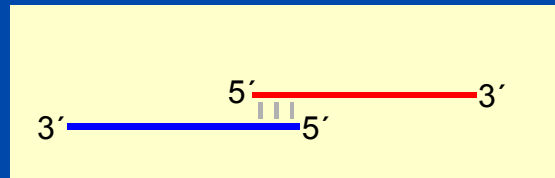
- **Outros parâmetros importantes:**
  - Conteúdo G+C entre 40 e 60%;
  - 3 ou mais bases G ou C devem ser evitadas na extremidade 3' para evitar estabilidade em anelamentos inespecíficos;
  - Evitar timina ou adenina na última posição 3', uma vez que estas se ligam mais fracamente e causam instabilidade;
  - Evitar mal-pareamentos, especialmente na extremidade 3';
  - A extremidade 5' pode sofrer modificações de modo que a ausência de complementariedade não comprometa o anelamento (inserção de adaptadores, sítios de restrição, etc);
  - Repetições de nucleotídeos (4 ou mais) e de dinucleotídeos devem ser evitadas devido a mal-pareamentos;
  - Formação de estruturas secundárias (*hairpins*);
  - Formação de homodímeros;
  - Formação de heterodímeros.

# “Desenhando” Iniciadores

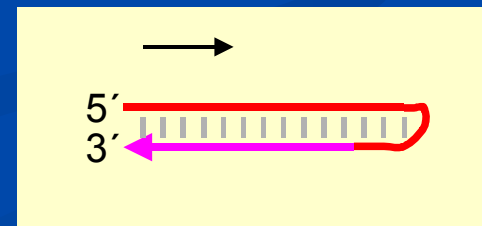
*Primer-Dimers* (anelamentos Sense/Antisense),



*Self-Dimers* (anelamentos Sense/Sense ou Antisense/Antisense)



*Hairpins* (dobramentos da cadeia de um *primer*, fazendo com que ela se pareie consigo mesma).





- **Principais ferramentas disponíveis para desenho de iniciadores:**

- Primer3Plus (*free, interface web*)
- Primer-Blast (*free, interface web*)
- PrimerSelect (*shareware*)
- Primer Express (*shareware*)
- Primer Premier (*shareware*)
- OLIGO Primer Analysis Software (versão 7)
- FastPCR (*shareware*)

- **Ferramentas complementares para avaliação dos iniciadores:**

- IDT OligoAnalyzer 3.1 (*Integrated DNA Technologies, em Scitools*)
- PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>, para bactérias)

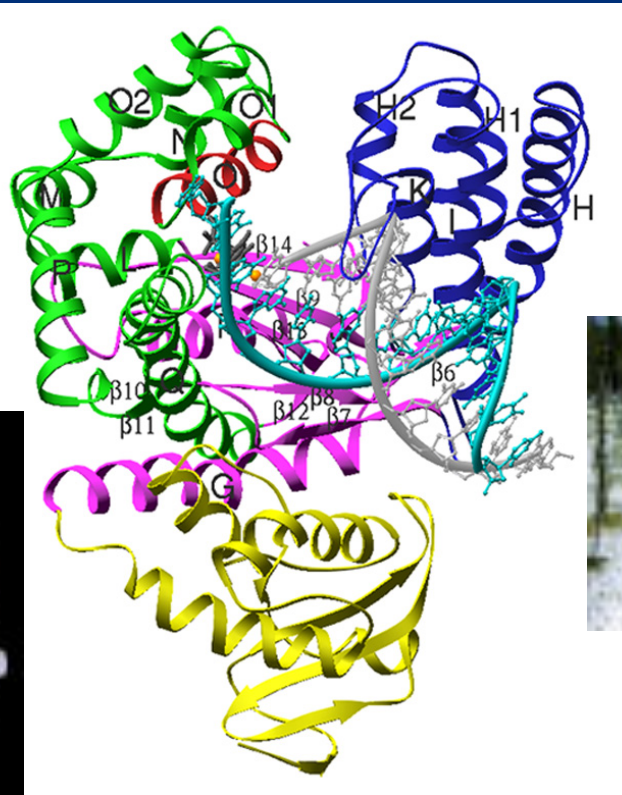
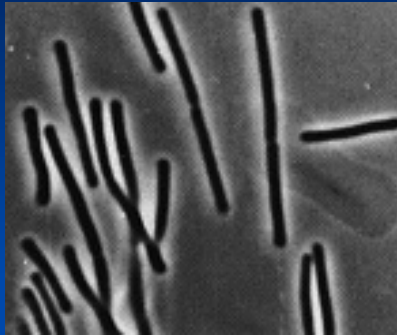
Fonte: [http://www.lgcm.icb.ufmg.br/software/cursoBionumerics/Confeccao\\_oligonucleotideos\\_iniciadores.pdf](http://www.lgcm.icb.ufmg.br/software/cursoBionumerics/Confeccao_oligonucleotideos_iniciadores.pdf)



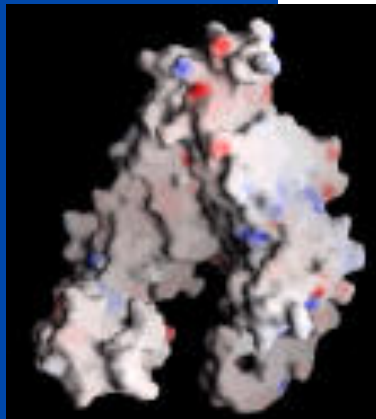
# Taq DNA polymerase

PCR

5' → 3' / sem atividade corretiva!



*Thermus aquaticus*



Thomas Brock - 1976

Estável até 117°C



# Taq DNA Polimerase

- 0,4 a 1U da enzima para reações de 25  $\mu$ l finais.
- Para reações longas usar mais enzima ou escolher mais estável
- Em geral são fornecidas conjuntamente com solução-tampão específica, cuja composição varia com o fabricante.

# *Non-Proofreading*

- ✓ alguns erros na seqüência do fragmento final.
- ✓ adiciona uma adenina (A) extra às extremidades 3' do DNA \*\*

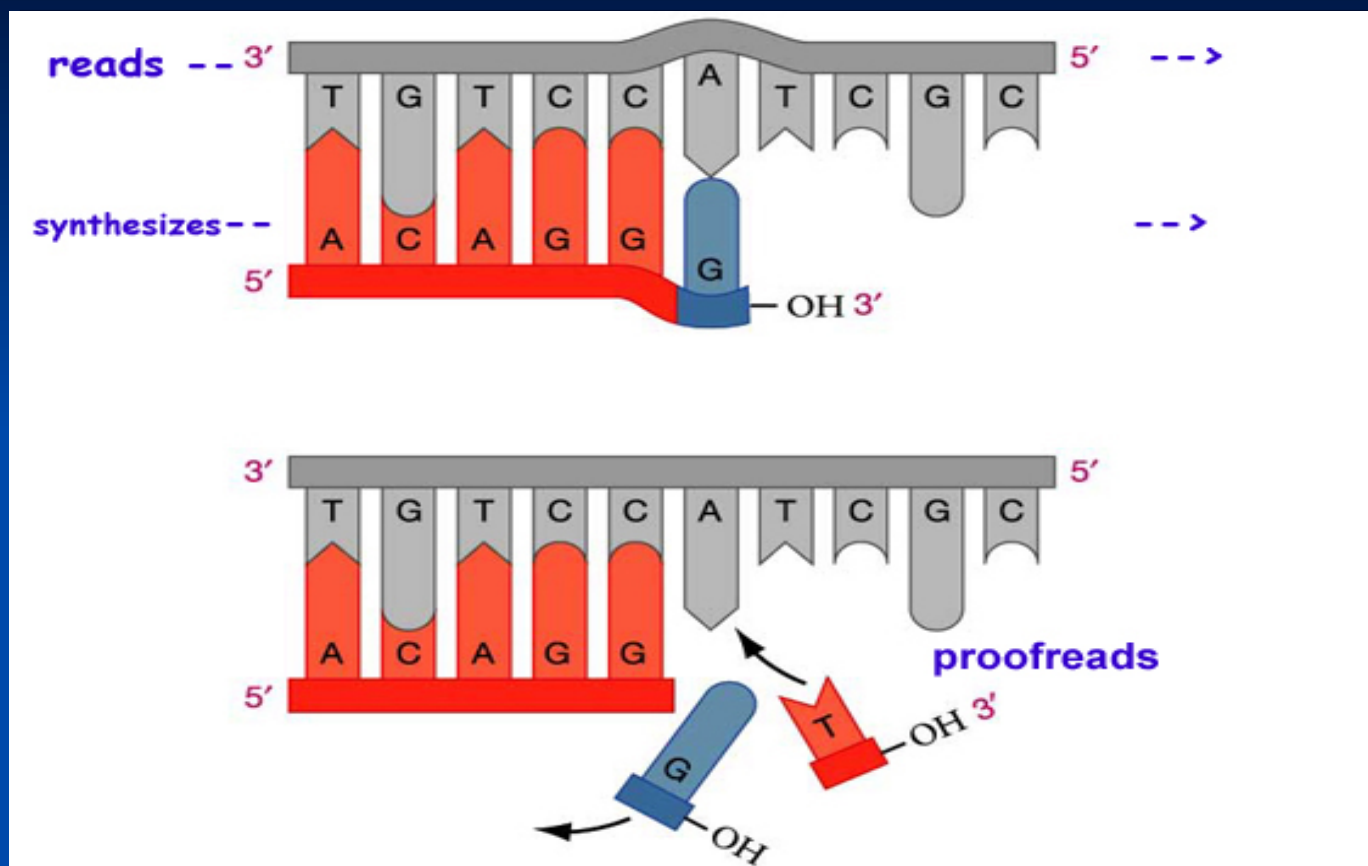
# *Proofreading*



- ✓ não adicionam nucleotídeos extras nas bordas das cadeias-filhas
- ✓ Com atividade corretiva 3' → 5'

*Pfu* (de *Pyrococcus furiosus*) e a *Tli* (de *Thermococcus litoralis*) Promega, *Gold* da Perkin-Elmer, *Platinum* da Life-Technologies, *Vent* da New England Biolabs, *Pwo* polimerase da Boehring.





- Ao usar proofreads – usar maior concentração de dNTP' s (mínimo  $200 \mu\text{M}$  de cada) para evitar destruição dos iniciadores.



- A incorporação de bases erradas (*mismatch*) em enzimas sem atividade corretiva reduz a estabilidade da interação enzima com o DNA molde, o que pode favorecer a interrupção da polimerização

**Cuidar com  $Mg^{2+}$  e dNTP' s!**

# Inibidores da enzima Taq DNA polimerase

- Fenol
- Proteinase K
- Agentes quelantes em excesso (EDTA)
- Hemoglobina
- SDS
- Elevadas concentrações de sal

# Solução-tampão

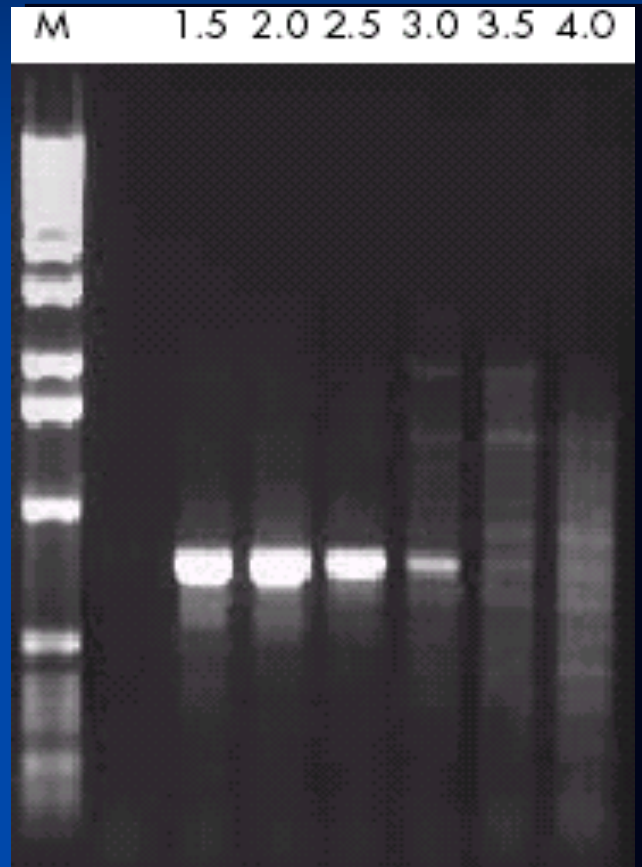
- \* Íons diversos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , entre outros)
- \* Detergentes (Tween 20, Triton X-100, Nonidet P-40)
- \* Proteínas estabilizantes (*BSA*)
- \* Substâncias que agem na denaturação da cadeia molde de DNA (*DTT* = *Dithiothreitol*,  $\beta$ -mercaptanoethanol), quebrando as pontes de hidrogênio entre as bases.

## Matriz dos 12 Tampões utilizados na otimização das reações de PCR

Tampão	Tris-HCl pH 8,3	Tris- HCl pH 8,8	Tris-HCl pH 9,2	MgCl <sub>2</sub>	KCl
1	5mL (100mM)			750µL (15mM)	12,5mL (250mM)
<h1 style="color: red;">Atenção!</h1> <p style="color: red;">Concentrações de KCl maiores que 50mM inibem a atividade das polimerases)</p>					
9	-	-	5mL (100mM)	750µL (15mM)	12,5mL (250mM)
10	-	-	5mL (100mM)	750µL (15mM)	37,5mL (750mM)
11	-	-	5mL (100mM)	1750µL (35mM)	12,5mL (250mM)
12	-	-	5mL (100mM)	1750µL (35mM)	37,5mL (750mM)



# Mg<sup>2+</sup>



- Co-fator essencial para a atividade da Taq DNA polimerase
- EDTA altera concentração do magnésio livre na reação
- Quantidade pode variar:
  - 0.5 a 3.0  $\mu\text{M}$  sugerido
  - Muito pouco: Taq não trabalha
  - Muito: “mispriming”, primers-dimers

# Reagentes Necessários para a Reação

## • Extras



- Glicerol, DMSO (Dimetilsulfóxido)
- 0,1 a 10% na reação
  - Estabiliza Taq,
  - Ajuda na denaturação das fitas DNA
  - Algumas Taq já vem adicionadas com ele
- BSA

# Parâmetros a serem avaliados se algo der errado



## Quantos ciclos?

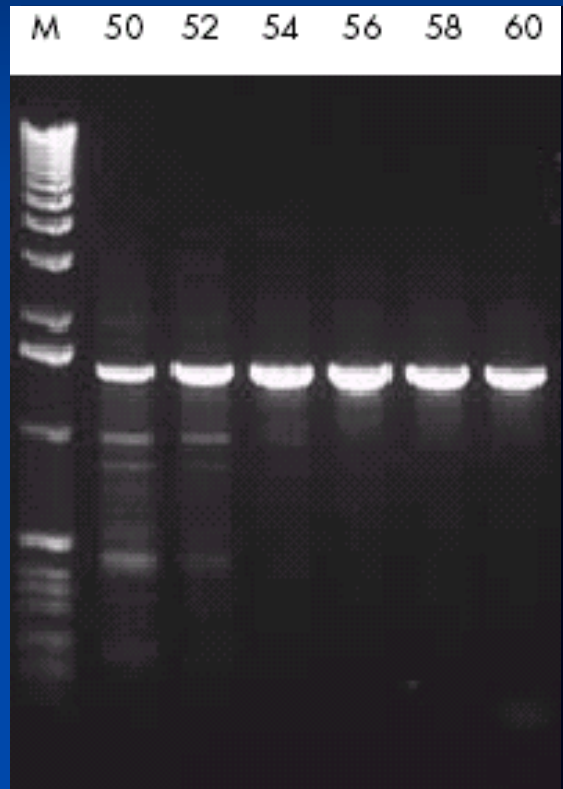
Desnaturação a que temperatura?  
Quanto tempo?



- Taq perde atividade em altas T °C:
  - Meia-vida a 95°C: 40 min
  - Meia-vida a 97.5°C: 5 min

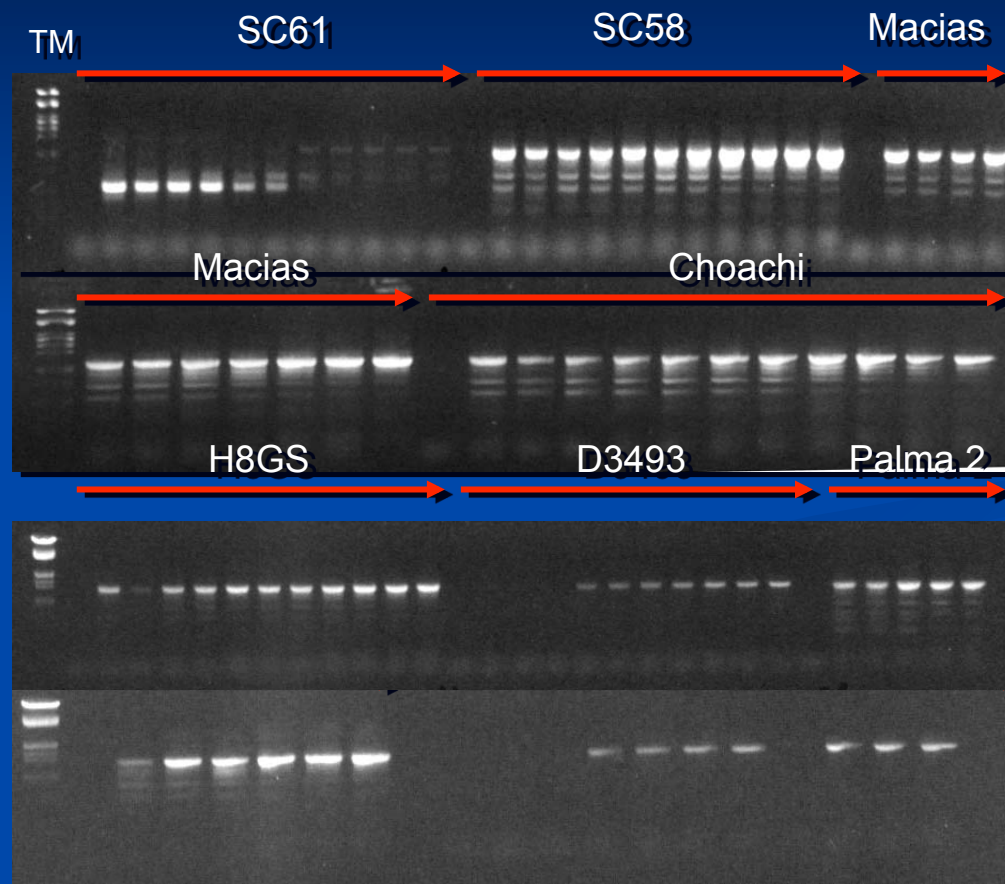


- Temperatura de Ligação dos Iniciadores



- Baseia-se na  $T_m$  – padrão
- Tentativa e erro
  - Muito alta: nenhum produto
  - Muito baixa: produtos inespecíficos
- Gradiente de temperatura
- Necessário principalmente nos primeiros ciclos

# Gradiente de Temperatura



Caneleta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T°C	45,9	46,7	48	49,9	52,1	54,4	56,9	59,3	61,4	63	64,2	65

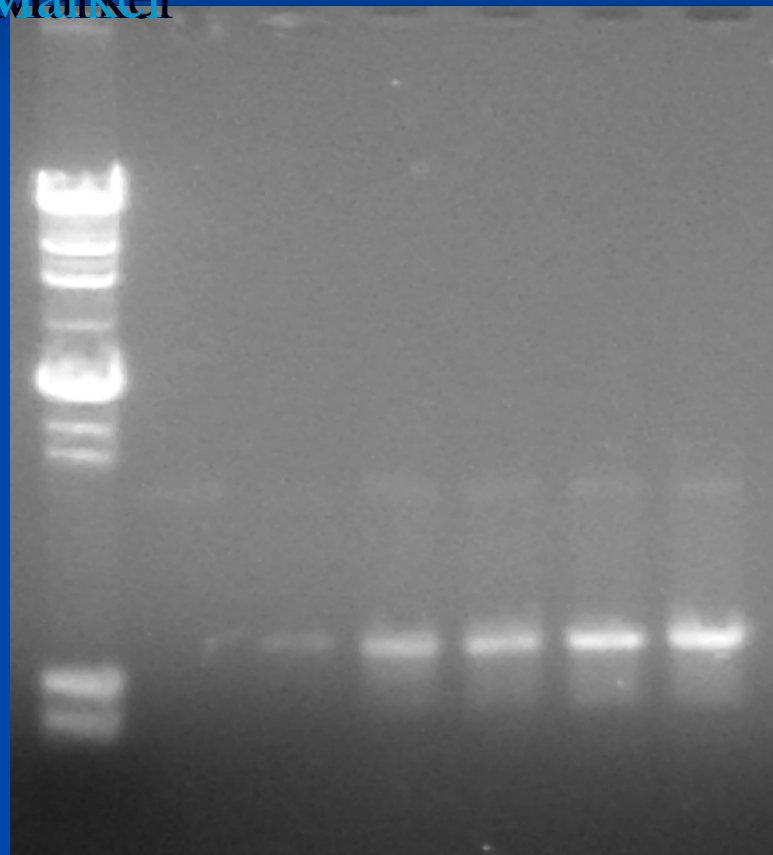
# O que fazer?

- Hot-Start PCR
  - Taq é adicionada somente após passo de desnaturação inicial
- Touchdown PCR
  - Temperatura de ligação dos iniciadores é reduzida progressivamente

# Mais Ciclos = Mais DNA

Size  
Marker

Number of cycles  
0 10 15 20 25 30



# Tipos de reação de PCR

# PCR Multiplex

- Mais de um segmento genômico é amplificado numa única reação, cada um com seu par de *primers* específico.

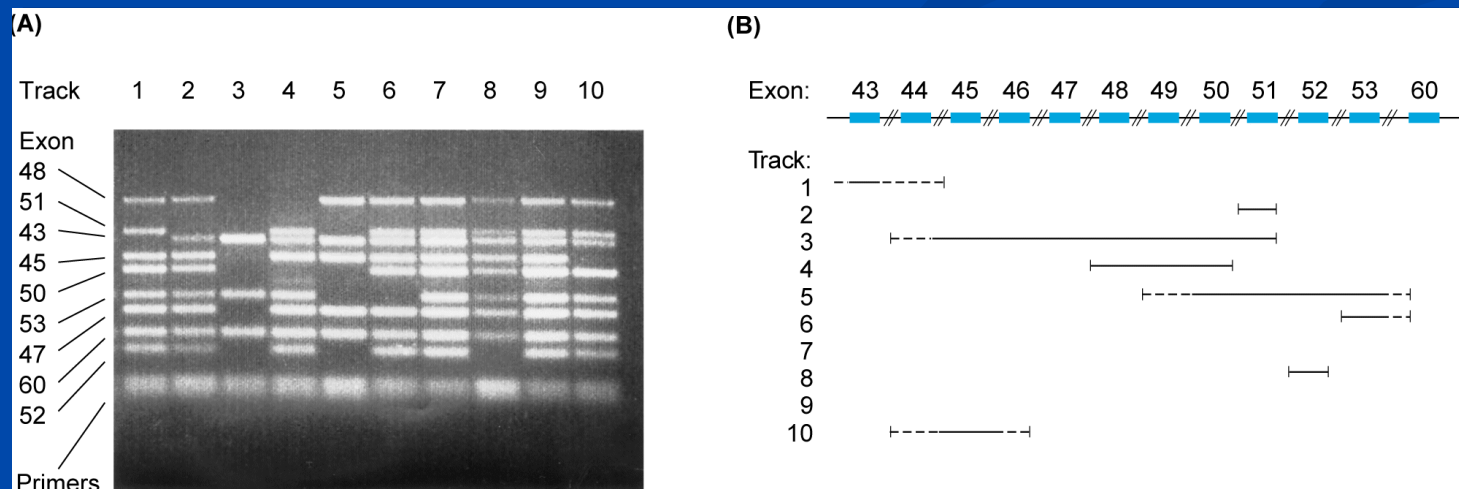
**Onde usar?** Investigação de paternidade

Diagnóstico de doenças

Identificação de transgênicos

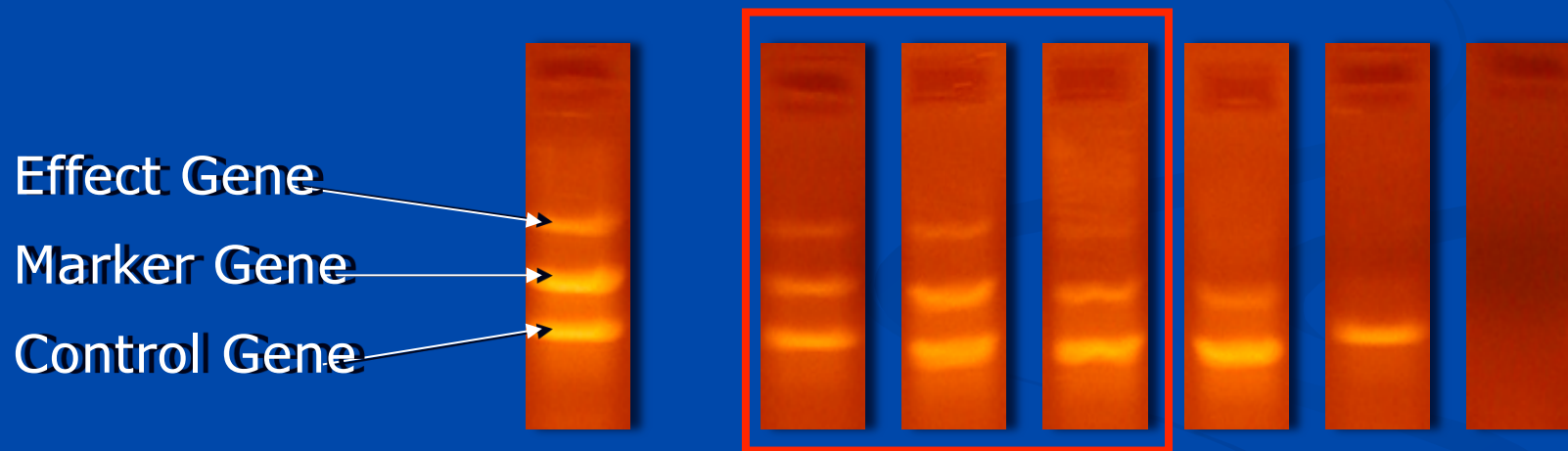
# Multiplex PCR:

- Detecta vários genes de uma só vez
  - Identificação de transgênicos
- Controle interno



# PCR Multiplex : Exemplo

- Três pares de iniciadores



Qual é o transgênico?



# Nested PCR

Duas etapas (*rounds*) de amplificação



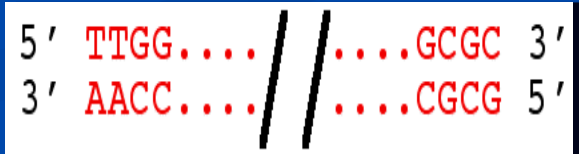
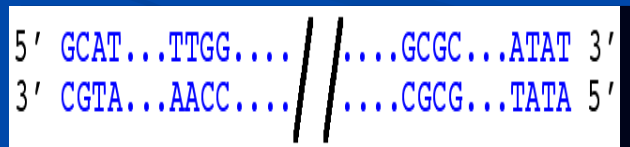
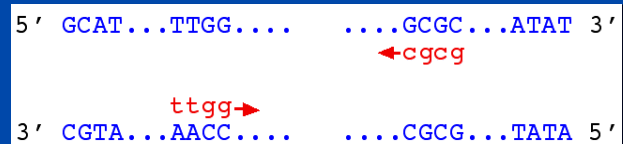
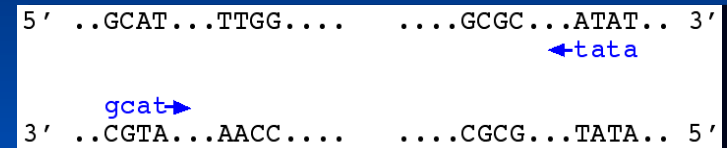
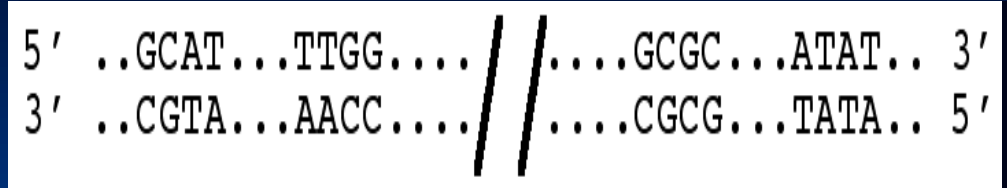
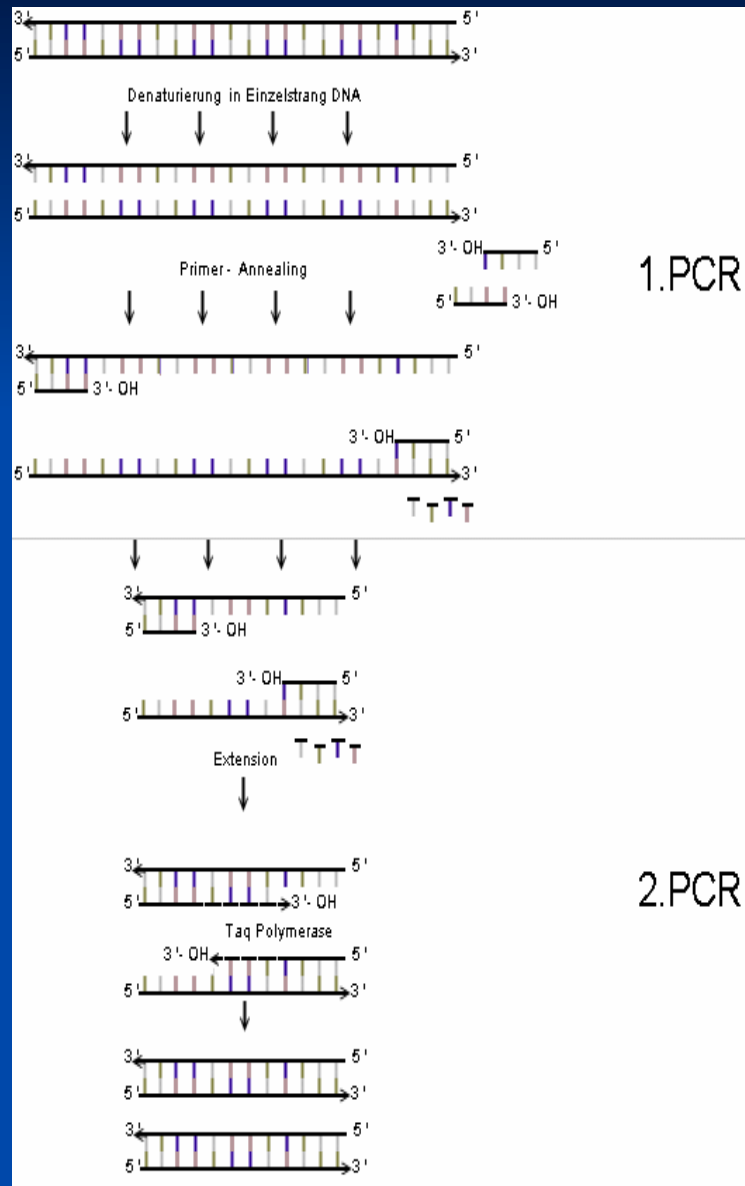
concomitantemente ou em duas reações separadas



*Semi-Nested PCR*

**Melhorar especificidade e eficiência da reação**

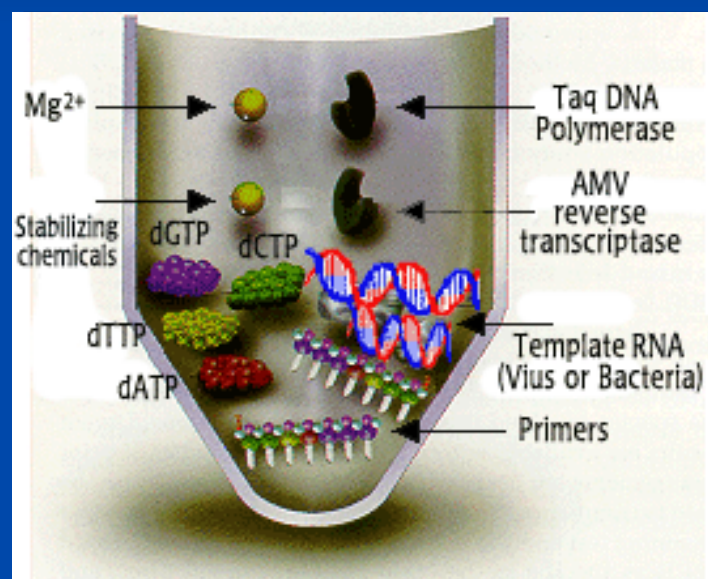
# PCR



# RT-PCR

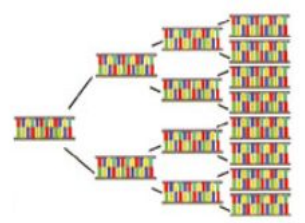
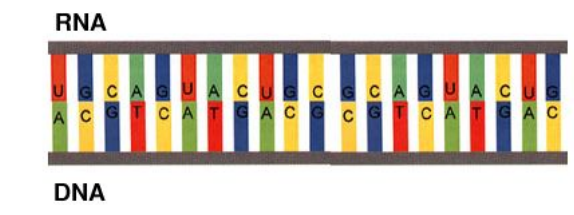
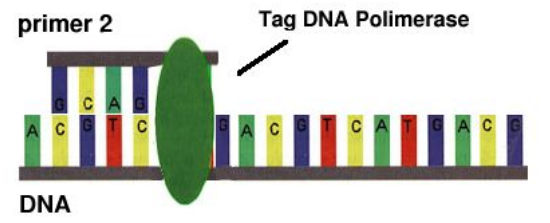
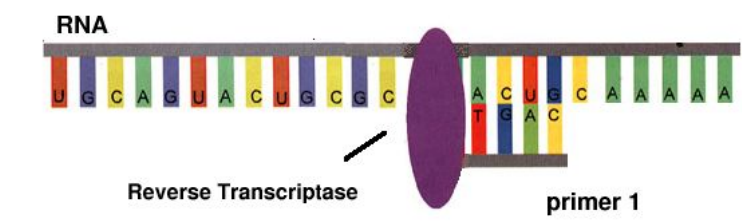
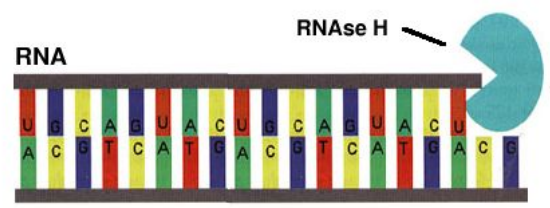
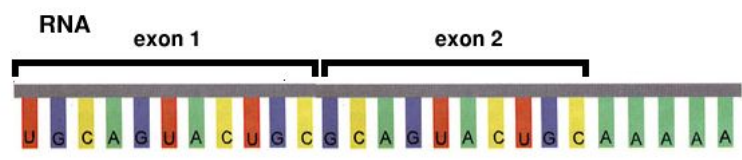
## *(Reverse Transcriptase Chain Reaction)*

RNA, que é convertido em cDNA (DNA complementar)



**Ferramenta útil em estudos de expressão gênica**

# PCR



# Por que usar PCR?

- **PCR pode amplificar quantidade incrível de DNA (visível em gel de eletroforese) em ~2 horas.**
- **Trabalha com amostras mínimas de DNA, extraídas de pequenas quantidades de sangue, pele, folículos pilosos, esperma, culturas ou até mesmo de fragmentos de fósseis**
- **O produto de PCR pode ser digerido com enzimas de restrição, sequenciado ou clonado.**

# Aplicações

Diagnóstico de infecções: bactérias, vírus, fungos, protozoários



Quantificação de DNA ou RNA viral/célula hospedeira

Diagnóstico de mutações gênicas

Diagnóstico de doenças genéticas

Estudo da expressão gênica: detecção e quantificação de RNA  
em: diferentes tipos celulares  
ao longo do desenvolvimento

# Aplicações

Engenharia Genética

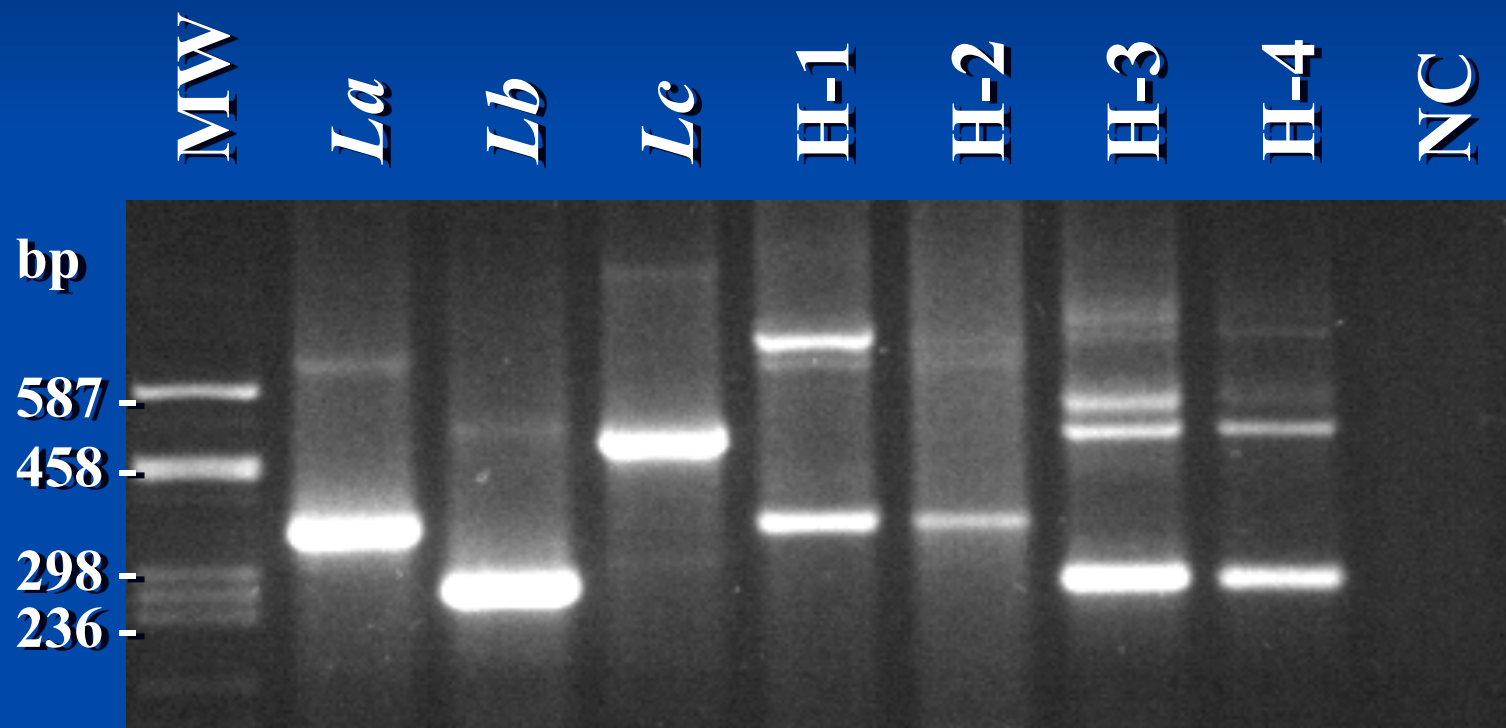
Diagnóstico de paternidade

Medicina Forense

Seqüenciamento de DNA



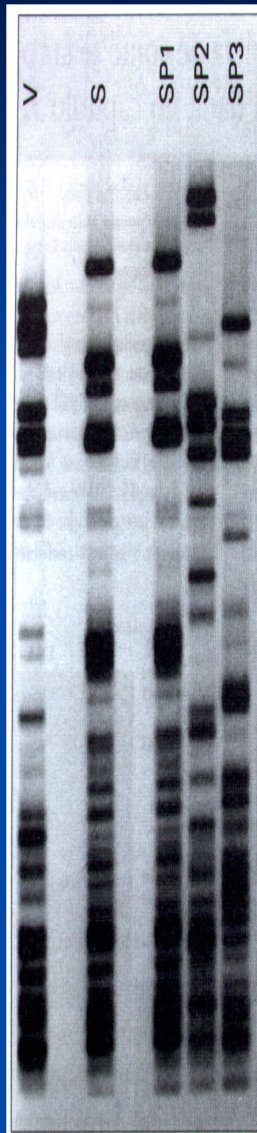
# Amplificação do gene do spliced-leader de diferentes cepas de *Leishmania* spp.



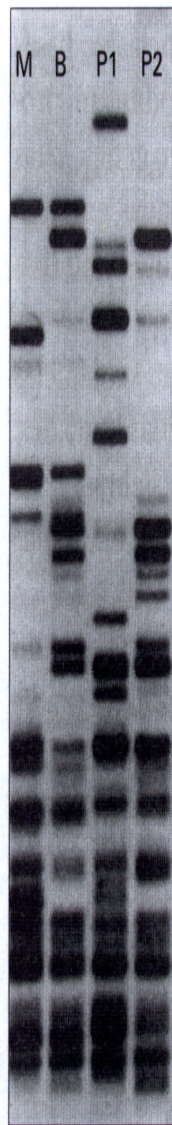
Grisard *et al.*, 2000



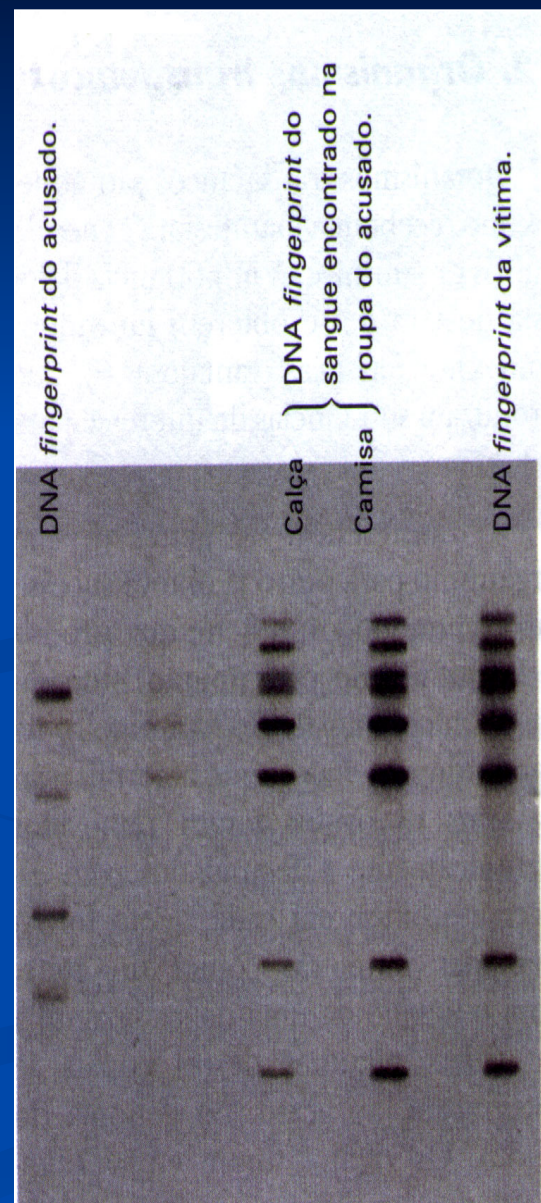


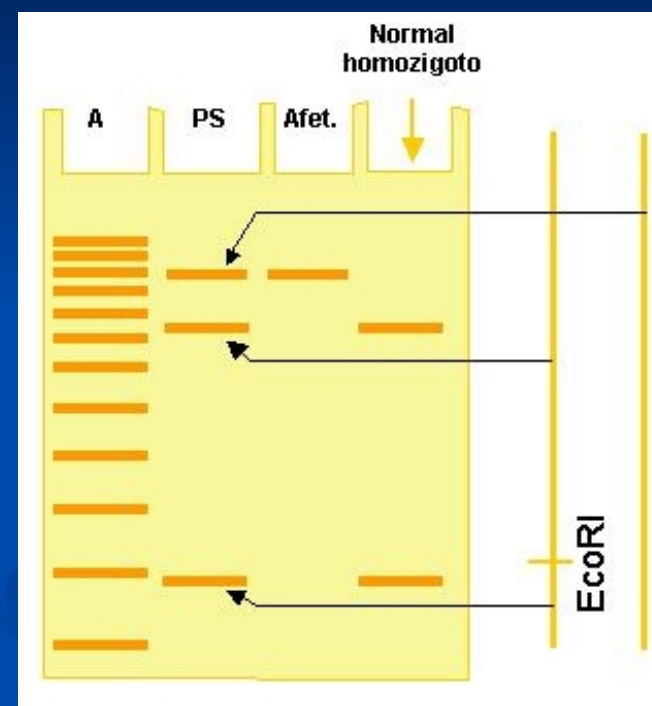
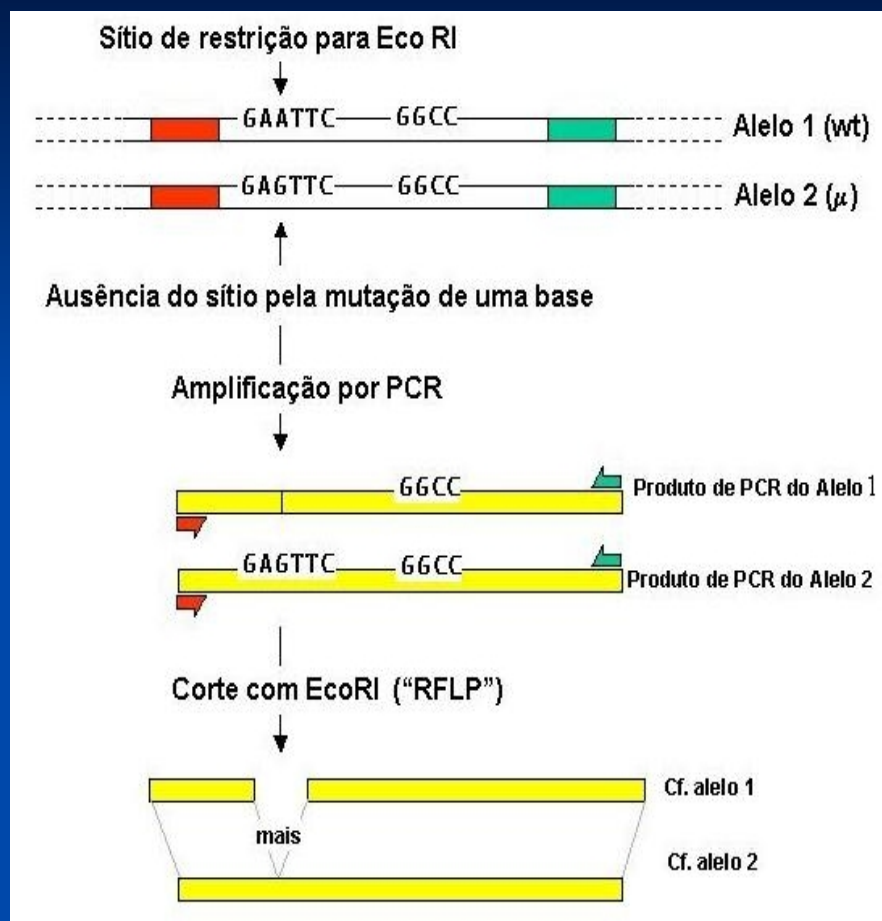


Em um caso de estupro foi feito o DNA *fingerprint* da vítima (V), do sêmen encontrado na vagina (S) e de três suspeitos (SP1, SP2, SP3). Veja que o código de barras do suspeito número 1 (SP1) coincide com o obtido a partir do sêmen (S), confirmando que ele foi o culpado pelo estupro.



Teste de paternidade duvidosa. Compare os códigos de barras da mãe (M) e do bebê (B) com o código de barras dos dois prováveis pais (P1 e P2). O bebê deve ter 50% do padrão da mãe e 50% do padrão do pai, que, no caso, é o homem número 2 (P2).





Identificação de mutações pontuais através da eliminação/criação de sítios de restrição e geração de fragmentos de digestão com polimorfismo de comprimento a partir de produtos de PCR (PCR/RFLP).



# RAPD PCR

## Randomly Amplified Polymorphic DNA

Uma PCR com um primer só...e amplificando qualquer DNA

Primer (10 a 15 bases)

Temperatura de pareamento ou annealing  $< 45^{\circ}\text{C}$

Número de bandas superior a 4 e polimórficas (isto é, com diferentes migrações) para indivíduos diferentes

# PCR

This DNA fragment contains 3 genes. A scientist is interested in amplifying only *gene B*:



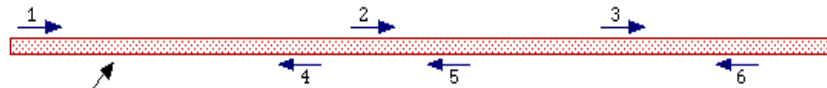
The scientist prepares 2 primers which will anneal to each end of *gene B*:



PCR reaction

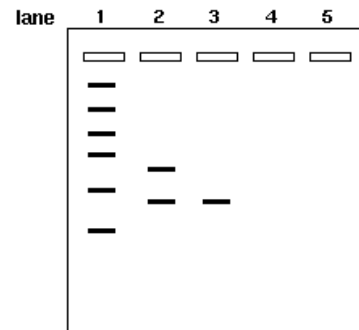


Only *gene B* is amplified, and can then be purified for further



DNA template

PCR reaction

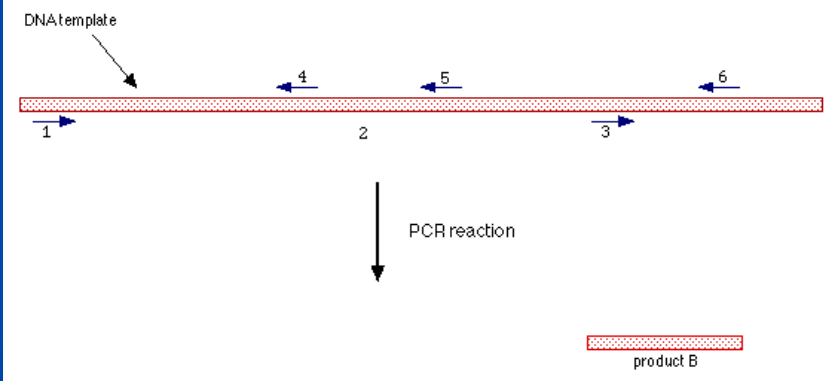


← product B  
← product A

lane 1: molecular weight markers

lane 2: RAPD Rxn. #1

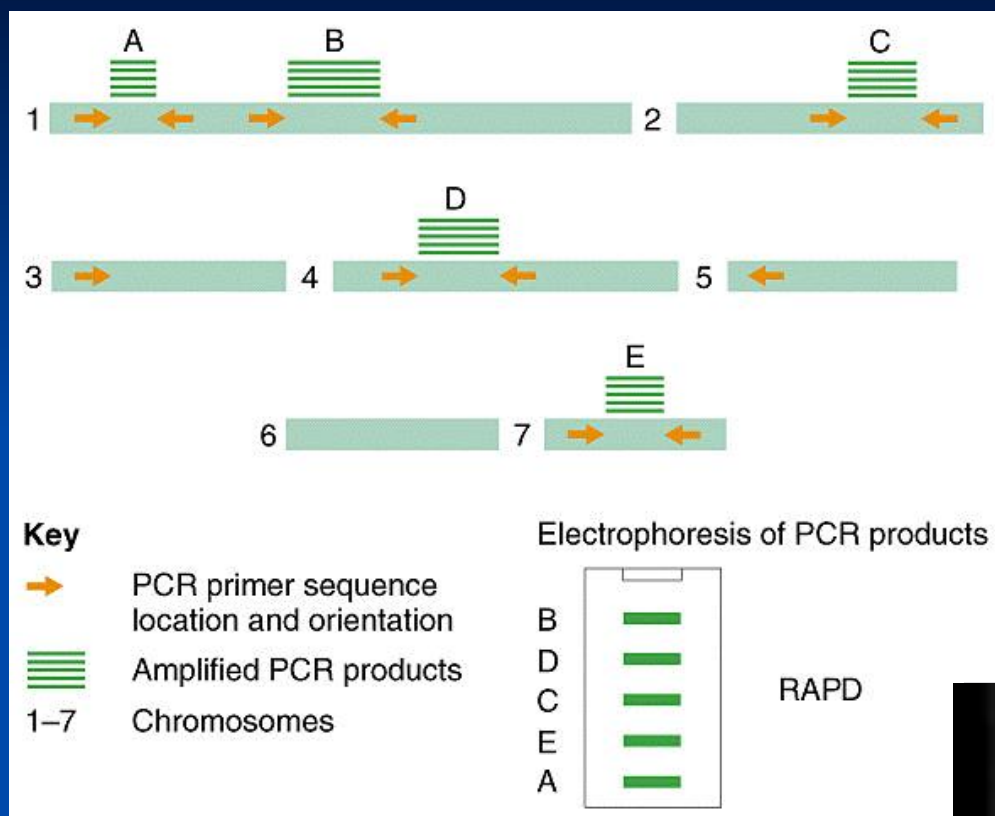
lane 3: RAPD Rxn. #2



DNA template

PCR reaction





O RAPD permite não apenas discriminar entre populações diferentes de organismos, mas inferir sua correlação filogenética

