

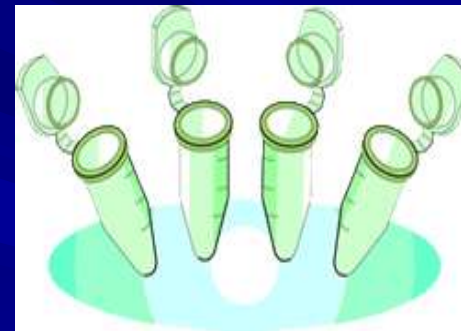
Polimerase Chain Reaction ***PCR***

Reação em cadeia da polimerase

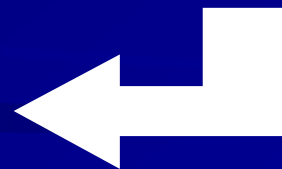
Técnica *in vitro* utilizada para sintetizar muitas cópias de DNA
Amplificar uma seqüência alvo específica



Termociclador



DNA molde
dNTP
DNA polimerase
Primers



Reação em cadeia da polimerase

■ Existem dois pontos chave para a PCR:

- 1- Ela permite amplificar o DNA: começando com uma pequena amostra pode chegar a grandes quantidades de DNA
- 2- A técnica permite a seletividade, amplificando somente uma região específica do DNA que codifica um gene em particular

A reação é catalisada pela DNA polimerase

- A reação requer:
- DNA polimerase
- dNTPS - (A, C, G e T)
- Uma curta região dupla fita no início da região a ser amplificada
- A DNA polimerase adiciona unidades de dNTPs na extremidade OH 3'.

Oligonucleotídeos ou Primers

Uma solução contendo DNA genômico + oligonucleotídeo = oligo vai anelar em uma sequência complementar

Se a solução for aquecida vai chegar um ponto em que o oligo vai dissociar do DNA genômico. Esta temperatura é chamada T_M ou Temperatura de Melting e pode ser calculada para qualquer molécula de DNA

Oligonucleotídeos ou Primers

- Fatores que afetam a T_m :
- Proporção de pareamentos GC
- Comprimento da região complementar

- $T_m \text{ } ^\circ\text{C} = 4 \times (\text{G+C}) + 2 \times (\text{A+T})$

Calcular Temperatura de Melting

5'GATAAGGCCAGGGCTACCTTAGC3'

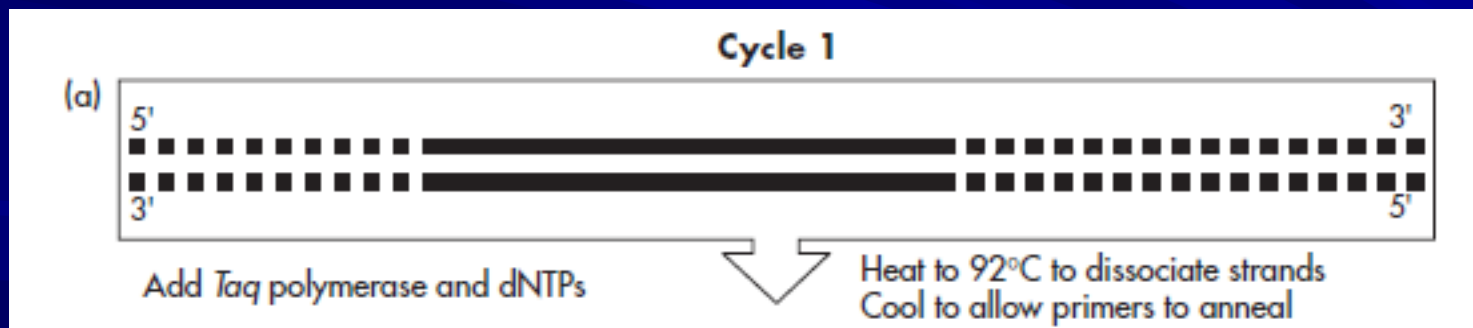
$$\blacksquare T_m^{\circ}\text{C} = 4 \times (\text{G}+\text{C}) + 2 \times (\text{A}+\text{T})$$

$$\begin{aligned} T_m^{\circ}\text{C} &= 4 \times (5 + 6) + 2 \times (6 + 4) \\ &= 4 \times 11 + 2 \times 10 \\ &= 44 + 20 = 64^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

Como a PCR funciona?

Passo 1: os primers são desenhados de maneira que possam anelar em sequencias que vão limitar a região a ser amplificada

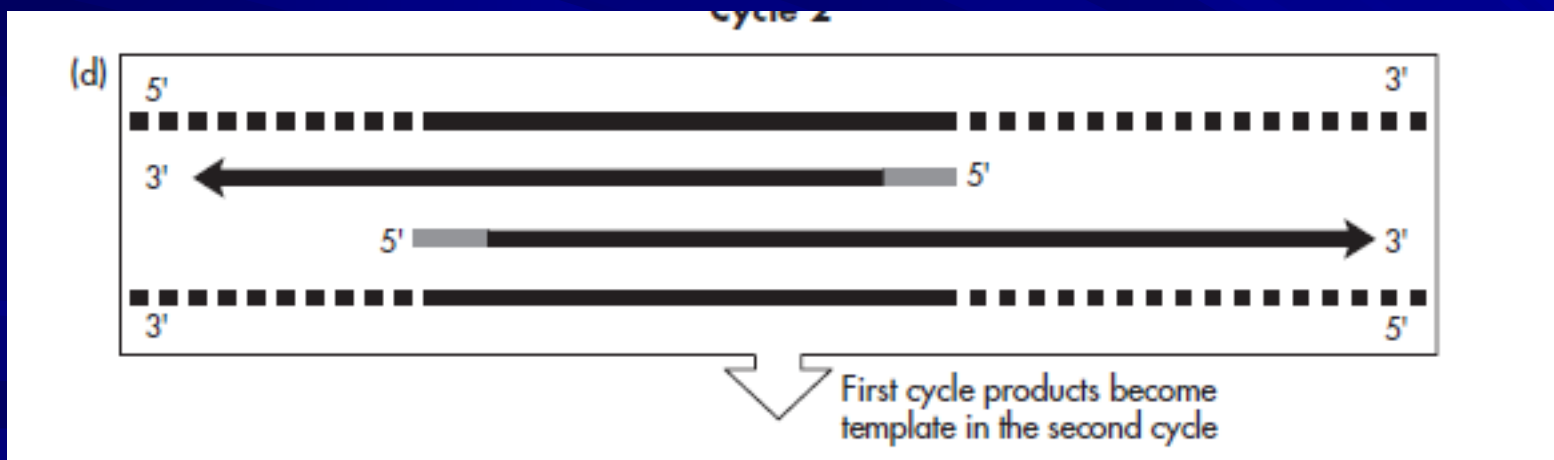
Ciclo 1: O DNA molde é aquecido para separar as duas fitas, fornecendo um molde simples fita para a DNA polimerase



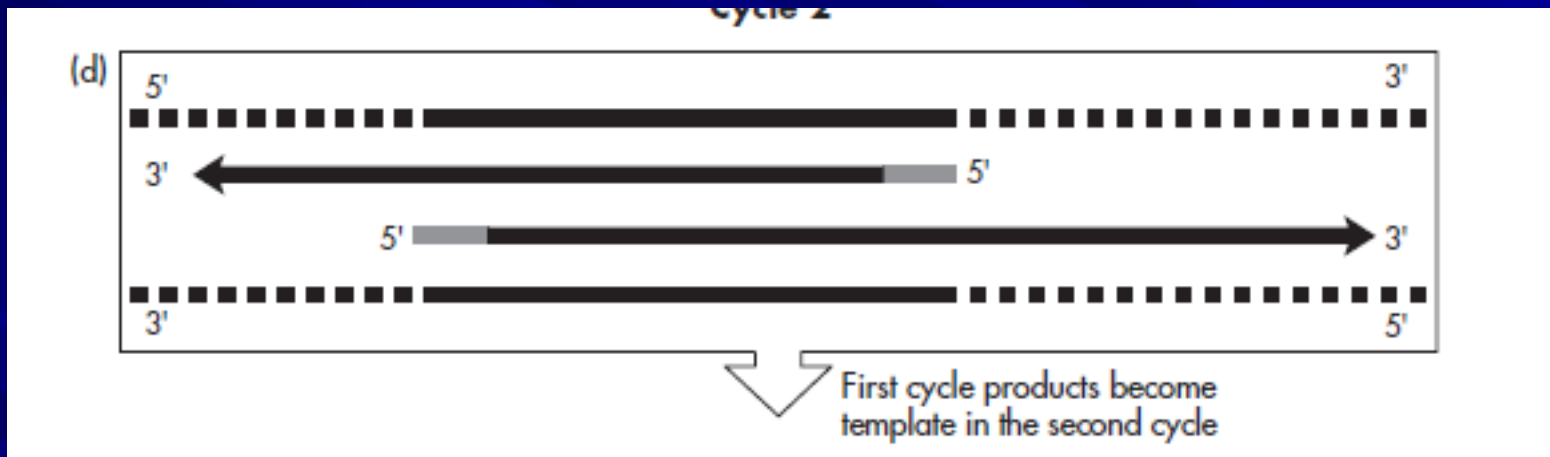
- A reação é resfriada a uma temperatura na qual os primers vão se anelar ao DNA TM
- Ocorre mudança de temperatura (72°C) e a DNA polimerase vai sintetizar a fita de DNA complementar



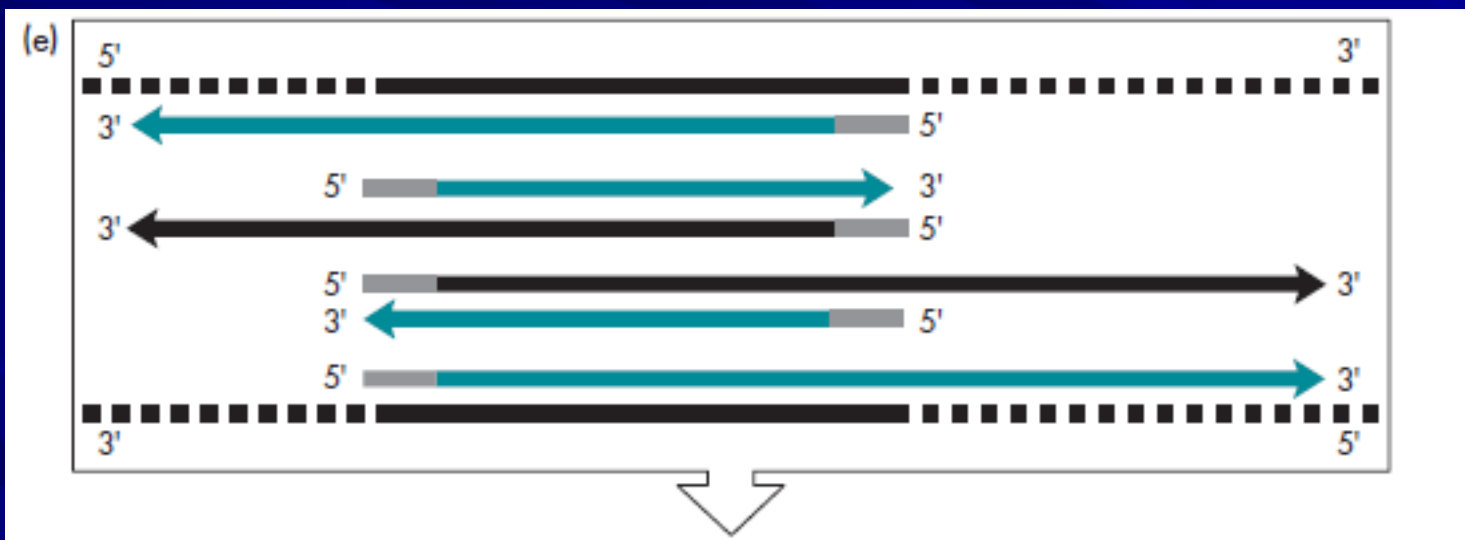
- No primeiro ciclo o produto formado que começa nos primers servirá de molde para a síntese de uma nova fita



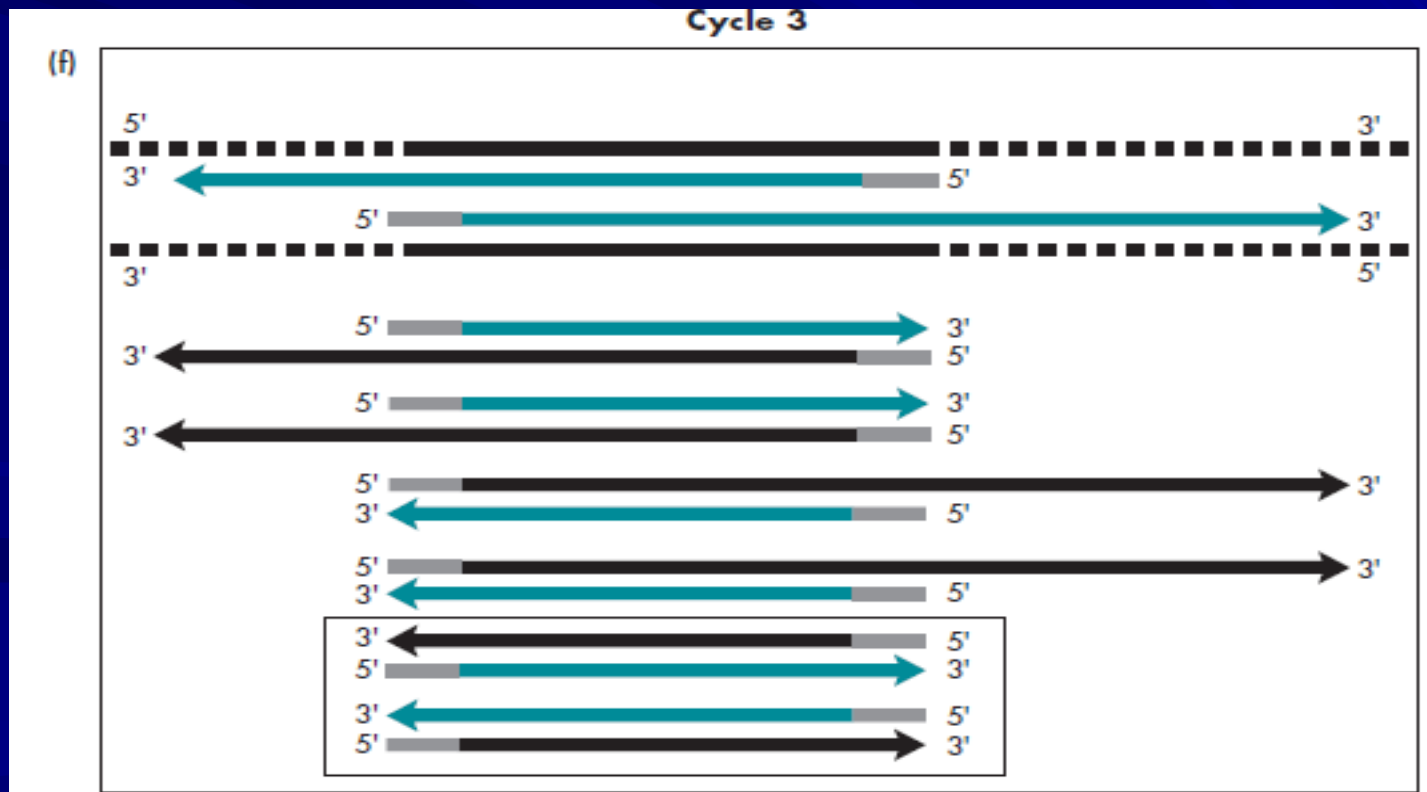
- No ciclo 2 a temperatura aumenta para **94°C** novamente. O novo DNA formado vai dissociar fornecendo 4 moléculas molde para a síntese de DNA

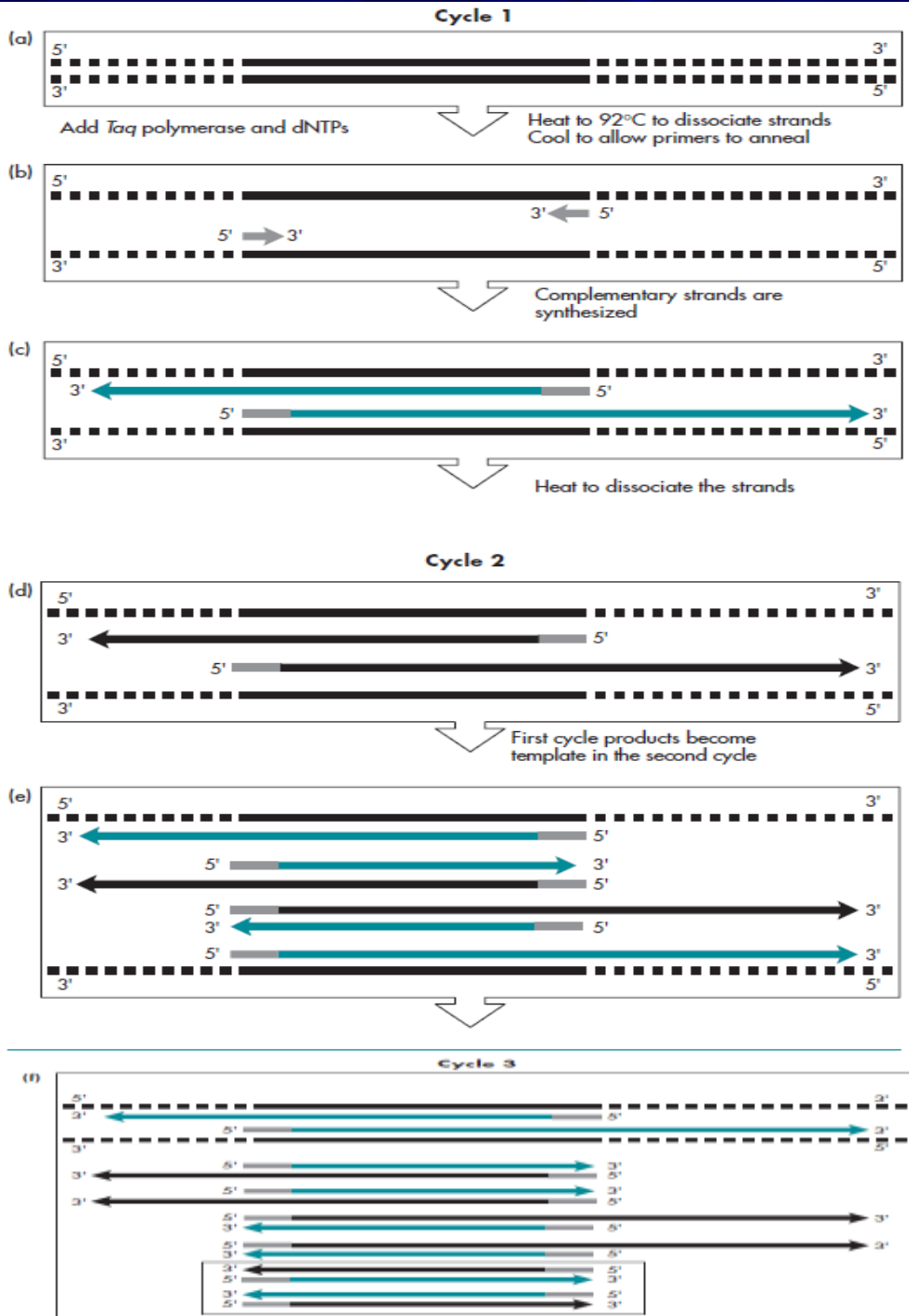


- No ciclo 2 os primers vão se anelar no DNA molde produzido no primeiro round da síntese, neste caso a síntese vai começar **na posição em que o primer anela**



- Estas novas moléculas vão ser exatamente do mesmo comprimento da região alvo, ligadas por sequencias definidas por dois primers, e esta região vai ser amplificada em subseqüentes ciclos de PCR





Perfil da reação

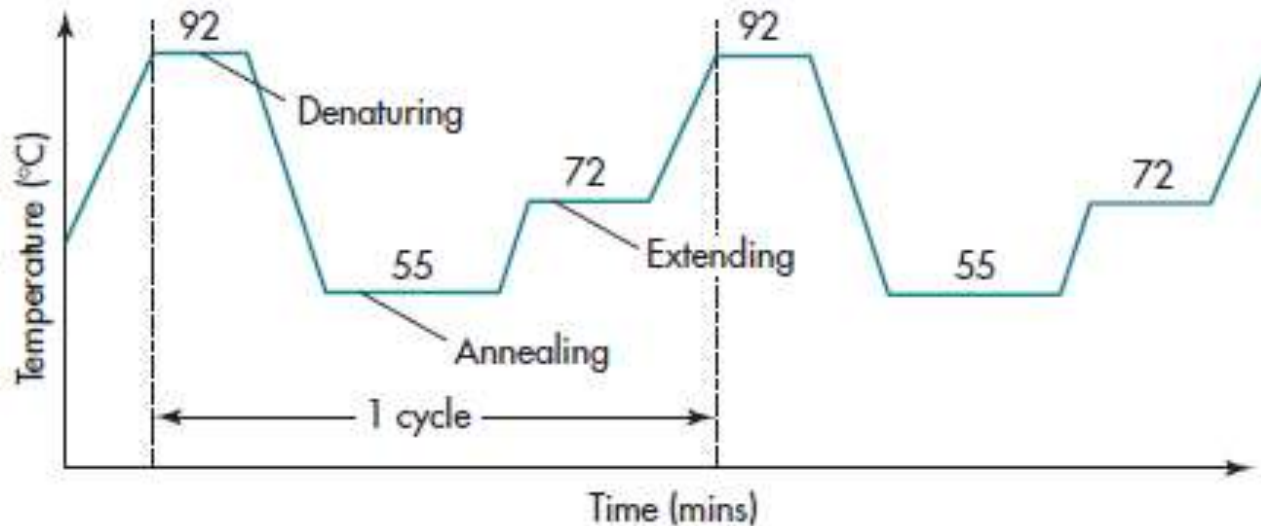


Figure 3.22 A typical PCR reaction involves 30 cycles in which the temperature is raised to 92°C to denature the template, cooled to a temperature suitable for annealing of the primers, 55°C in this example and then raised to 72°C the optimum temperature for Taq polymerase. There are many variations on this basic pattern.

- Ao término dos ciclos haverá três classes de moléculas de DNA dupla fita:

1-DNA genômico dupla fita

2-DNA dupla fita recém sintetizado de comprimento indefinido

3-Moléculas dupla fita representando a sequencia entre as posições dos dois primers.

- Estas moléculas vão aumentar de forma linear.
- É um aumento exponencial no número de moléculas alvo em ciclos sucessivos, levando a amplificação das sequencias alvo.

Table 3.1. PCR amplification

Cycle Number	Number of Double-stranded Target Molecules
1	0
2	0
3	2
4	8
5	22
6	52
7	114
8	240
9	494
10	1,004
11	2,026
12	4,072
13	8,166
14	16,356
15	32,738
22	1,048,536
30	1,073,741,764

Desenho dos primers

Alguns pontos importantes a serem considerados:

- 1- A seqüência que se tem disponível
- 2- A seqüência dos primers deve ser derivada de duas regiões de seqüências em fitas opostas
- 3- O comprimento deve ser em torno de 20 pb
- 4- Verificar se os dois primer possuem T_m próxima
- 5- Verificar se eles podem se anelar um com outro
- 6- Não podem ter complementaridade interna

Desenhando um oligonucleotídeo ou primer...

Left hand primer

5'GTCGACGCTGGTTGTTGTG 3'

5'GTCGACGCTGGTTGTTGTGGGTGGACAGCGCAGATCGATCCAGAGATGATACTACAGGTT 3'

3'CAGCTGCGACCAACAACACCCACCTGTCGCGTCTAGCTAGGTCTCTACTATGATGTCCAA 5'

3'GGTCTCTACTATGATGTCCAA 5'

Right hand primer

Figure 3.20 The sequence of a short stretch of double-stranded DNA is shown together with two oligonucleotide sequences (shown in bold) which could be used as PCR primers. The left-hand primer would anneal to the 3' end of the bottom strand and initiate synthesis in the direction of the right hand primer.

Como montar a reação

A reação é realizada em um termociclador. As máquinas são programadas e vão ciclar através de uma série de incubações a temperaturas diferentes.

Uma reação deve conter:

Pequenas quantidades de DNA molde, dNTPs para a síntese de DNA , primer e *Taq* DNA polimerase

Programa da reação

- Passo 1: 92°C separação das duas fitas
- Passo 2: 55°C temperatura de anelamento dos primers (T_m) esta temperatura
- Passo 3: 72°C atividade da *Taq* DNA polimerase
- Estes passos são repetidos 30 vezes

■ Animação

Uma eletroforese em gel de agarose é usada para analisar os produtos das reações de PCR



■ Se não amplificou nada? O que fazer?
Mudar as condições da reação:

- 1- T_m : utilizar temperatura menor
- 2- Concentração de DNA molde (10-20 ng de DNA)
- 3- Concentração de Cloreto de magnésio

Clonagem de produtos de PCR

Na teoria o produto de PCR deve ser uma molécula de DNA dupla fita com extremidade cega

Mas na prática a *Taq* DNA polimerase tem uma tendência em adicionar um nucleotídeo adicional, normalmente uma adenina na extremidade 3' da molécula.

Alguns vetores de clonagem foram desenvolvidos especialmente para clonar estes produtos de PCR. Eles apresentam uma timina (T) na extremidade 3' na qual o produto de PCR pode ser clonado diretamente.

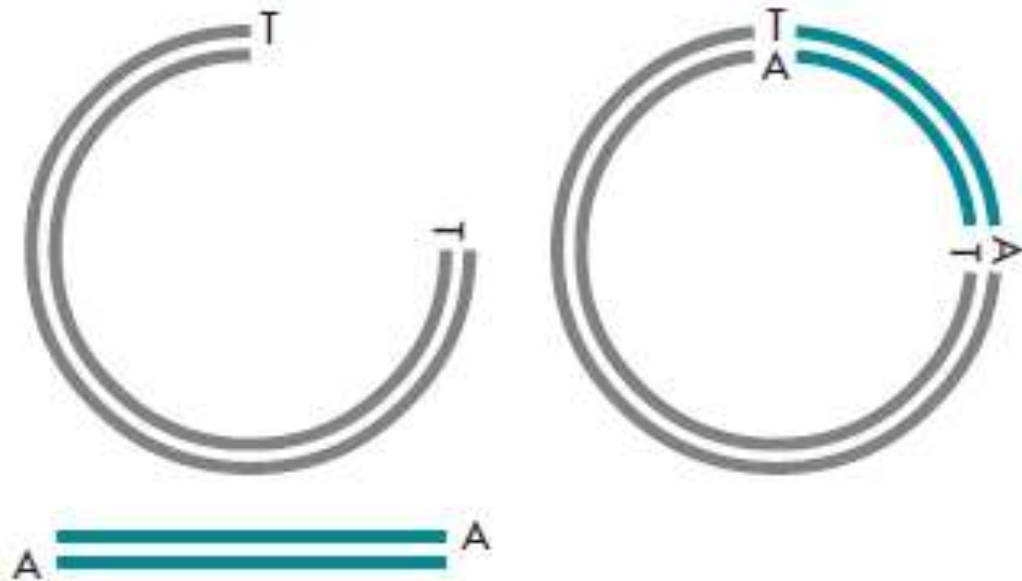
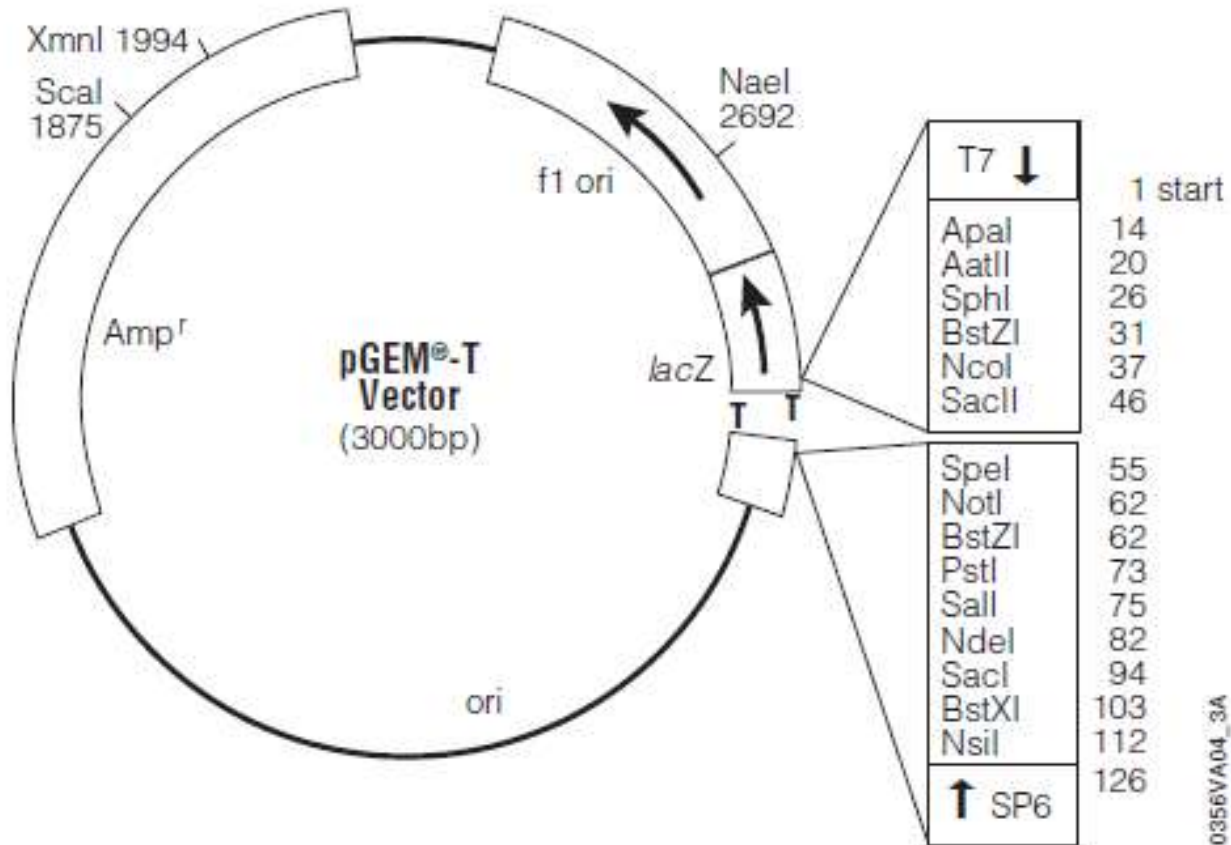


Figure 3.23 PCR products (shown in blue) often have an extra adenosine at the 3' end; this is exploited in the cloning of PCR products using vectors with a 3' T overhang.

Exemplos de vetor com T



Exemplo de desenho de primer com sítio de restrição

Left hand primer

5'GTCGACGCTGGTTGTTGTG3'

5'GTCGACGCTGGTTGTTGTGGGTGGACAGCGCAGATCGATCCAGAGATGATACTACAGGTT3'

3'CAGCTGCGACCAACAACACCCACCTGTCGCGTCTAGCTAGGTCTCTACTATGATGTCCAA5'

3'GGTCTCTACTATGATGTCCAA5'

Right hand primer

Figure 3.20 The sequence of a short stretch of double-stranded DNA is shown together with two oligonucleotide sequences (shown in bold) which could be used as PCR primers. The left-hand primer would anneal to the 3' end of the bottom strand and initiate synthesis in the direction of the right hand primer.

Sense: 5'**CATATG**GTCGACGCTGGTTGTTGTG 3' sitio para *Nde I*

Reverse: 5'**GAATTC**AACCTGTAGTATCATCTCTGG 3' sitio para *Eco RI*

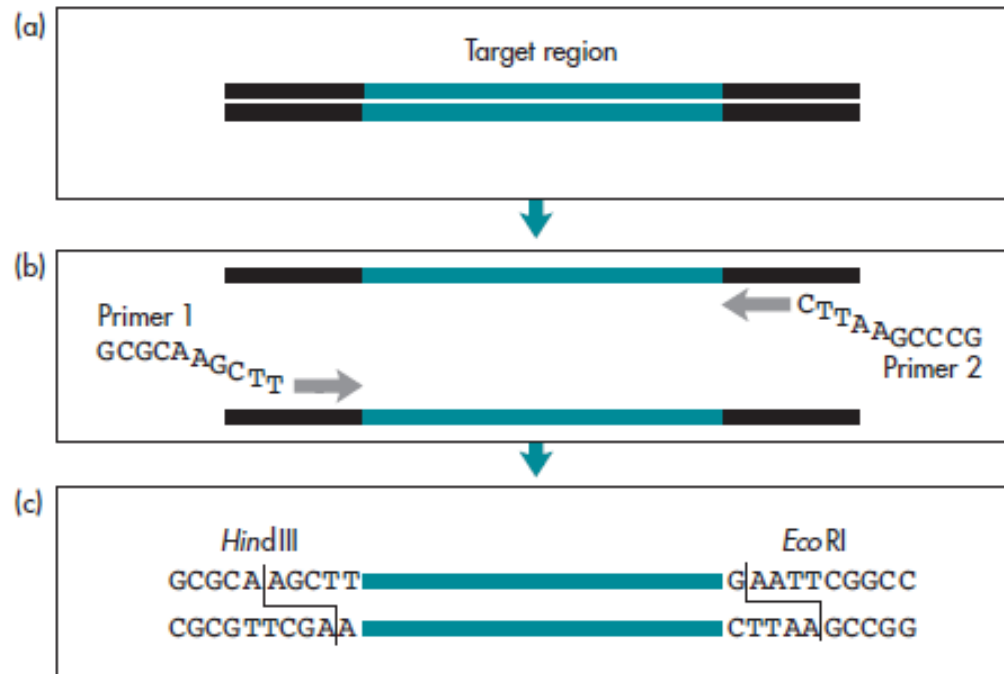


Figure 3.24 PCR reactions can be used to introduce restriction sites into the product, which can be used in cloning. Primers are designed to be complementary to sequences flanking the target region, and a 5' extension, including a restriction site, is added to each primer. During the first few rounds of PCR the complementary part of the primer anneals to the template, amplifying the target region but also incorporating the restriction site into the product. In later cycles the whole extended primer will be able to anneal and the temperature of the PCR reaction can be raised. The PCR product can be cut with appropriate restriction enzymes and cloned in a vector such as pUC18.

Limitações da PCR

É necessário ter alguma informação sobre a sequência do DNA alvo

Comprimento da região a ser amplificada (até 2 kb) acima disso deve se aumentar o tempo de extensão

A *Taq* DNA polimerase não tem atividade revisora

Desenhar primer

5'GTCGACGCTGGTTGTTGTGGGTGGACAGCGCAGATCGATCCAGAGATGATACTACAGGTT3'
3'CAGCTGCGACCAACAACACCCACCTGTCGCGTCTAGCTAGGTCTCTACTATGATGTCCAA5'