

PCR

Polymerase Chain Reaction

Prêmio Nobel em Química 1993



Kary B. Mullis

USA, for his invention of the
polymerase chain reaction (PCR)
method (1987)

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

O ciclo de PCR

Desnaturação

Calor é usado para desnaturar a dupla fita;

Usualmente 94° C

Temperaturas mais baixas ou curtos períodos de incubação:
desnaturação incompleta

Taq DNA pol. é termoestável, mas não imune ao calor...

Após 30x a 94° C /1' = ½ atividade

Anelamento

A temperatura cai para ligação dos primers aos sítios específicos:

É a fase mais crítica!!

O anelamento é aleatório e depende:
*[primers];

*Disponibilidade de sítios de anelam/o;

*Sítios competidores de anelamento;

Anelamento (hibridização)

Primers movem-se aleatoriamente (movimento Browniano);
Interações entre *primers* e molde são feitas e desfeitas;

Primers, por serem menores e abundantes ,
movem-se + rapidamente que o molde

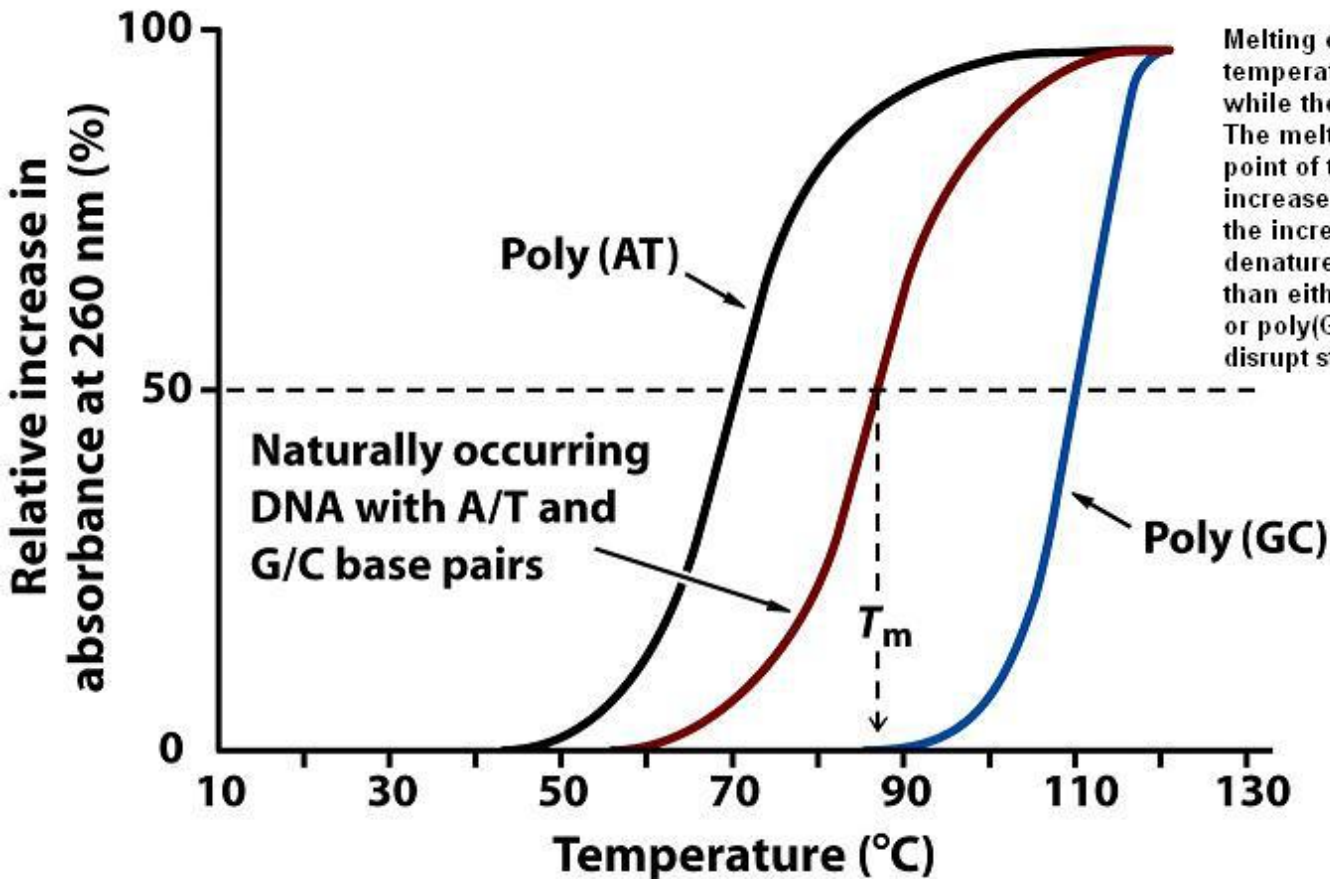


Maiores chances de encontrar os sítios “alvo”.

Cada primer é diferente...como determinar a melhor condição?

A **T_m** é uma medida importante!!

Curvas de desnaturação térmica do DNA



Melting curve for DNA. In this experiment, the temperature of a DNA solution is increased while the absorbance at 260 nm is monitored. The melting point (T_m) corresponds to the inflection point of the sigmoidal curve where the increase in absorbance of the sample is one-half the increase in absorbance of completely denatured DNA. Poly(AT) melts at a lower temperature than either naturally occurring DNA or poly(GC) since more energy is required to disrupt stacked G/C base pairs.

T_m x anelamento

Abaixo da T_m : maioria dos alvos são ocupados pelos primers

Acima da T_m: poucos primers se ligam...

Temp. de anelamento de 3 a 5°C abaixo ao T_m calculado.

Extensão

Nesta fase a **polimerase sintetiza o fragmento de DNA alvo**

A temperatura dependerá da polimerase usada:

Taq: 72° C; incorporação estimada de 35 a 100 nt/segundo.

Tempo: usualmente 1 minuto para cada 1000 bp.

Alta taxa de erros (*in vitro* ~ 1 em 2×10^4 nt)

Na maioria dos casos, a temperatura de extensão é sempre bem maior que aquela do anelamento.

Como os primers se mantêm anelados então?

Componentes da PCR

Polimerase termoestável + tampão

Primers e dNTPs (adicionados em excesso, pois são consumidos na reação)

200 a 250 uM de cada dNTP

Molde

Mg⁺² (~1,5mM): cofator

Primers:

Conteúdo de CG ideal entre ~50%, sendo um G ou C no 3'

Universais: amplificam um dado fragmento numa ampla variedade de taxa.

Úteis na sistemática molecular.

Por ex.: primers p/ mtDNA; cpDNA; RNA ribossomal nuclear.

Específicos: 18 nt = tamanho mínimo para uma amplificação específica

Algumas aplicações da PCR

Amplificação e sequenciamento;

Amplificações de genes repetitivos e altamente conservados (genes para RNA ribossomais, p.e.) para uso em sistemática molecular;

PCR diagnóstico (detecção de doenças, p.e. hepatite B)

Amplificações de mRNA: transcrição reversa+PCR

Amplificação de DNA usando primers degenerados...

Real time PCR

Sequência codificante do gene *cas*

```
ATGGCCTCTC CGATAGTTGA CTGCACCCCG TACCGCGACG AGCTGCTCGC GCTCGCCTCC
GAGCTTCCCG AGGTGCCGCG CGCGGACCTC CATGGCTTCC TCGACGAGGC GAAGACGCTG
GCCGCCCGTC TCCCGGAGGG GCTGGCCGCC GCTCTCGACA CCTTCAACGC CGTGGGCAGC
GAGGACGGTT ATCTGCTGCT GCGCGGGCTG CCCGTCGACG ACAGCGAGCT GCCCGAGACG
CCGACCTCCA CCCC GGCCCC GCTGGACCGC AAGCGGCTGG TGATGGAGGC CATGCTCGCG
CTGGCCGGCC GCCGGCTCGG TCTGCACACG GGGTACCAGG AGCTGCGCTC GGGCACGGTC
TACCACGACG TGTACCCGTC GCCCGGCGCG CACTACCTGT CCTCGGAGAC CTCCGAGACG
CTGCTGGAGT TCCACACGGA GATGGCGTAC CACATCCTCC AGCCGAACTA CGTCATGCTG
GCCTGCTCCC GCGCGGACCA CGAGAACCGG GCGGAGACGC TGGTCGGCTC GGTCCGCAAG
GCGCTGCCCC TGCTGGACGA GAAGACCCGG GCCCGTCTCT TCGACCGCAA GGTGCCCTGC
TGC GTGGACG TGGCCTTCCG CGGCGGGGTC GACGACCCGG GCGCGATCGC CAACGTCAAG
CCGCTCTACG GGGACGCGAA CGACCCGTTT CTCGGGTACG ACCGCGAGCT GCTGGCGCCG
GAGGACCCCG CGGACAAGGA GGCCGTCGCC CATCTGTCCC AGGCGCTCGA CGATGTGACC
GTCGGGGTGA AGCTCGTCCC CGGTGACGTC CTCATCATCG ACAACTTCCG CACCACGCAC
GCGCGGACGC CGTTCTCGCC CCGCTGGGAC GGAAGGACC GCTGGCTGCA CCGCGTCTAC
ATCCGCACCG ACCGCAATGG ACAGCTCTCC GCGGGCGAGC GCGCGGGCGA CACCATCTCG
TTCTCGCCGC GCCGCTGAGC CCGGCTCCCC GAGGCCCTGG GCCCGGCGC CGGAACCGGC
TCCCGGTCCT GCCCCTCAC CCGCCGCGCG GGTGAGGGGG CAGG
```