

Reacção em cadeia da polimerase

(PCR - *Polymerase chain reaction*)

- Realiza a replicação selectiva e rápida de uma sequência específica de nucleotídeos a partir de uma mistura complexa de DNAs → **amplificação específica**
- Amplificação de genes (ou fragmentos de DNA) *in vitro* em oposição à clonagem *in vivo*, muitas outras aplicações



- detecção de mutações e infecções ou contaminações com vírus e microrganismos
- medicina forense - identificação de um indivíduo a partir da sequenciação de fragmentos de DNA amplificados por PCR com vários pares de *primers* para regiões variáveis do genoma

Polymerase chain reaction (PCR)

The Nobel Prize in Chemistry 1993

"for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry"

<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1993/index.html>

"for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry"

"for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method"

Kary B. Mullis



"for his fundamental contributions to the establishment of oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis and its development for protein studies"

Michael Smith



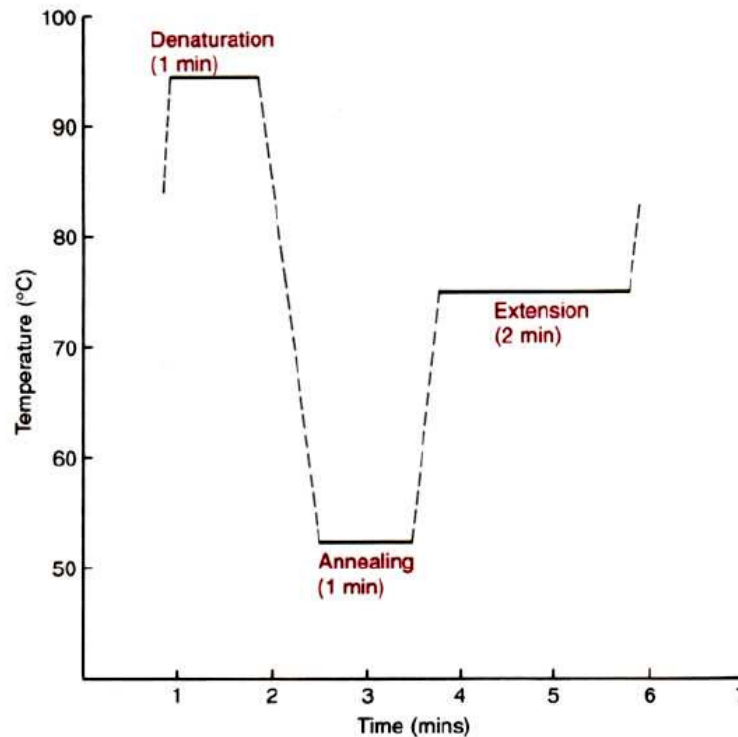
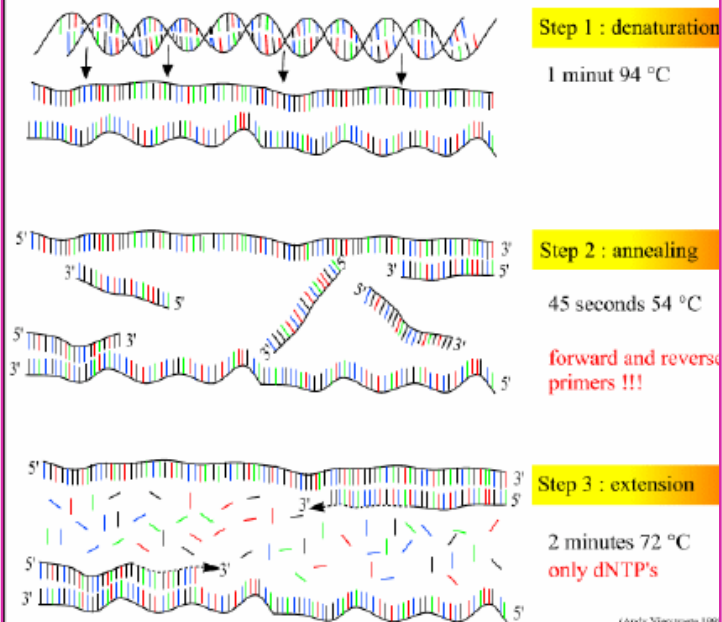
Componentes necessários para a reacção em cadeia da polimerase (PCR)

- DNA
- oligonucleótidos de iniciação (*primers Forward e Reverse*)
- tampão (Mg^{2+})
- DNA polimerase
(*Taq* polimerase → *Thermus aquaticus* resistente à temperatura)
- dNTPs

PCR - Reacção em cadeia da polimerase

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps

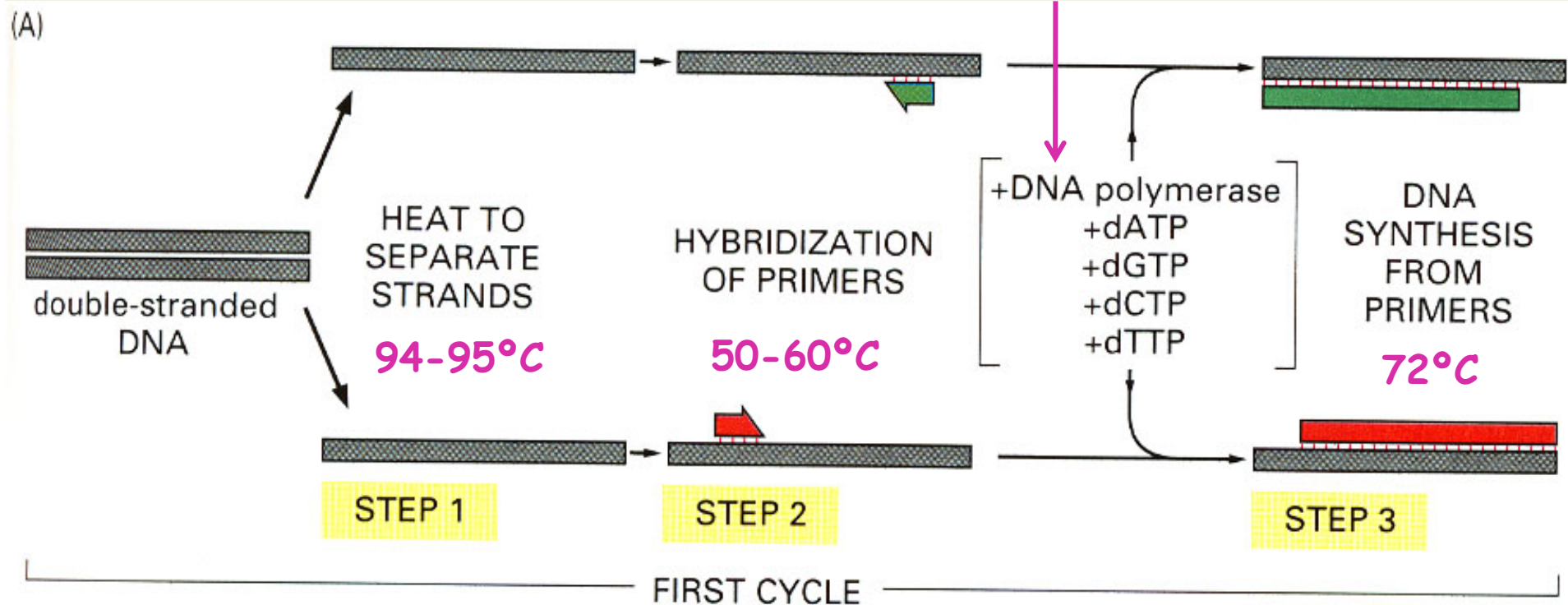


Cada ciclo 3 passos:

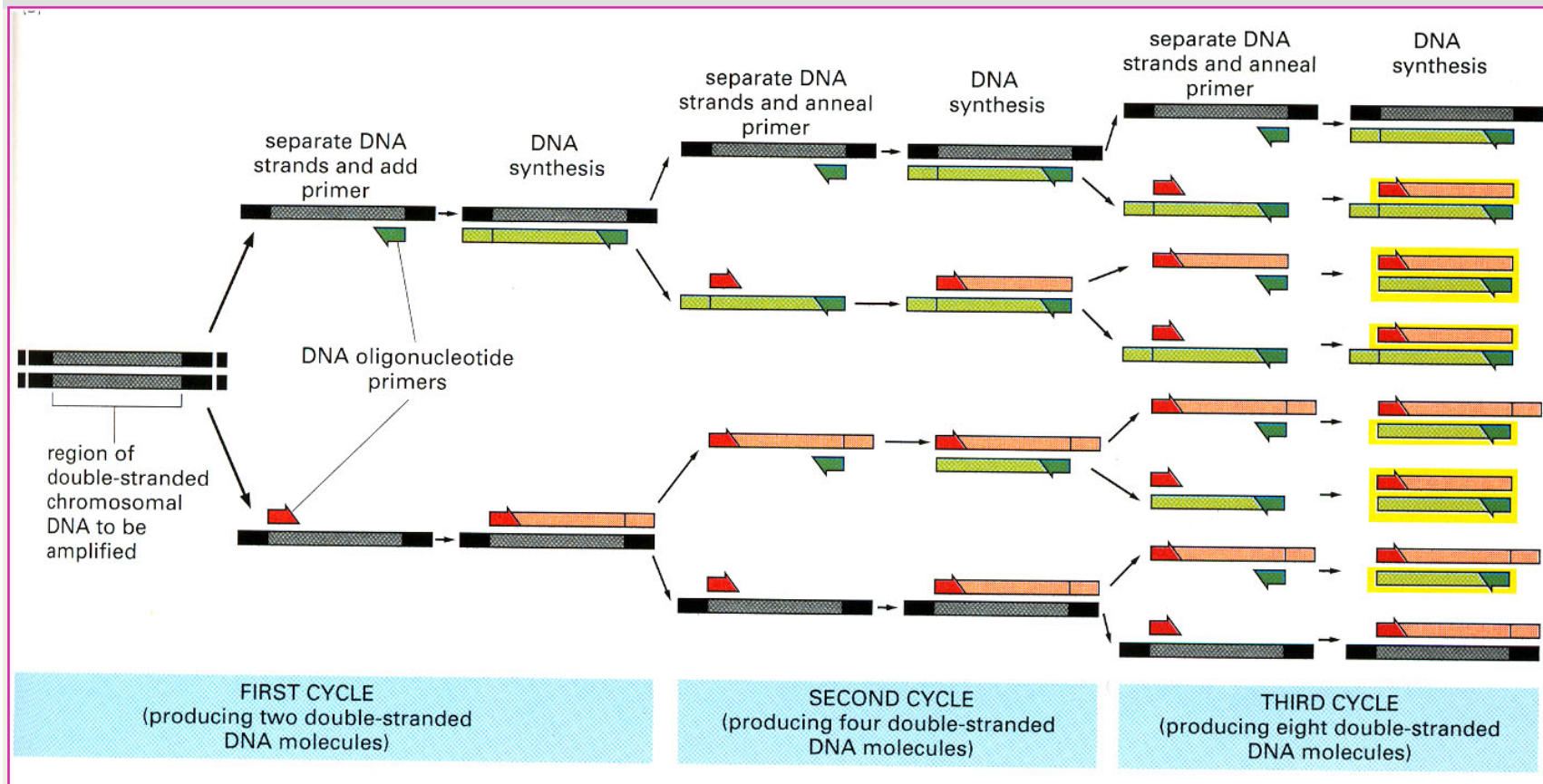
- Desnaturalização
- Emparelhamento (hibridação)
- Extensão

PCR - Reacção em cadeia da polimerase

Taq polimerase - de *Thermus aquaticus* - resistente a temperaturas elevadas



PCR - Reacção em cadeia da polimerase



etc...

20 a
40 ciclos

PCR - Termociclador



Gradiente - várias temperaturas de emparelhamento podem ser testadas em simultâneo

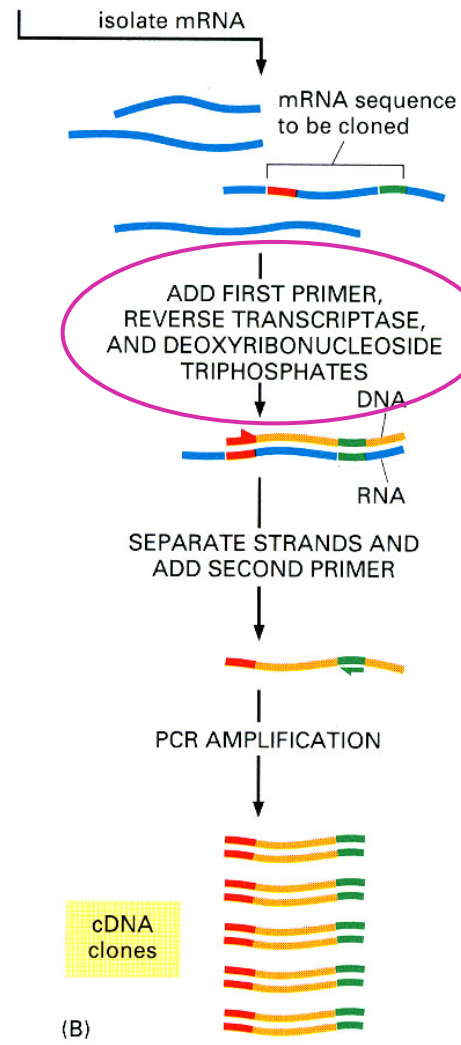
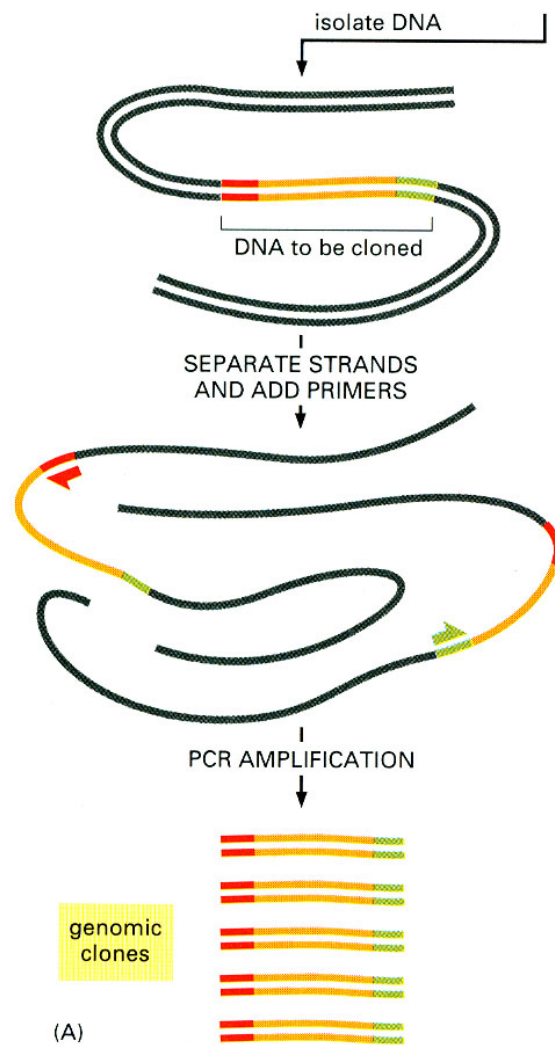
<http://bio-rad.cnpg.com/lscv/videos/ScientistsForBetterPCR>

PCR - Reacção em cadeia da polimerase

pode ser utilizado para clonar um fragmento particular de DNA de uma célula (um gene por exemplo)



o molde para a reacção de PCR pode ser DNA ou RNA obtendo-se uma cópia de DNA genómico ou uma cópia de cDNA (s/ intrões ou sequências reguladoras)



Transcriptase reverse
e dNTPs

Factores que afectam a reacção em cadeia da polimerase PCR

- **quantidade e qualidade do DNA "molde"**
ex. max. 500 ng para DNA humano, 1-10 ng DNA bacteriano
pureza e integridade
- **oligonucleótidos de iniciação (*primers* F e R)**
- **Mg²⁺ (1-5 mM)**
os iões magnésio formam complexos solúveis com os dNTPs e com o DNA → importante para acção da polimerase
- **DNA polimerases**
(*Taq* polimerase, *Pfu*, polimerases específicas para PCRs longos +3 kb, etc.)
- **dNTPs (entre 50-500 mM, normalmente 200 mM cada)**

Factores que afectam a reacção em cadeia da polimerase PCR

Desenho dos oligonucleótidos de iniciação (*primers* Forward e Reverse)

- Tamanho → 18 a 24 bases
- Especificidade
- Sequência → evitar seqs repetitivas
- Aprox. 50% G/C
- Evitar a complementaridade entre os 2 *primers*
- extremidade 5' deve ter mais G/C
- evitar Gs na extremidade 3'
- T_m (*melting temperature*) idêntico para os 2 *primers*

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T) ^\circ C$$

Bioinformática → programas para o desenho de *primers* e cálculo de T_m s

This formula is valid for oligos <14 bases and assumes that the reaction is carried out in the presence of 50mM monovalent cations. For longer oligos, the formula below is used:

$$T_m = 64.9^{\circ}\text{C} + 41^{\circ}\text{C} \times (\text{number of G's and C's in the primer} - 16.4)/N$$

Where N is the length of the primer.

For example, Promega's T7 Promoter Primer (TAATACGACTCACTATAGGG) is a 20mer composed of 5 T's, 7 A's, 4 C's, and 4 G's. Thus, its melting temperature is calculated:

$$64.9^{\circ}\text{C} + 41^{\circ}\text{C} \times (8 - 16.4)/20 = 47.7^{\circ}\text{C}$$

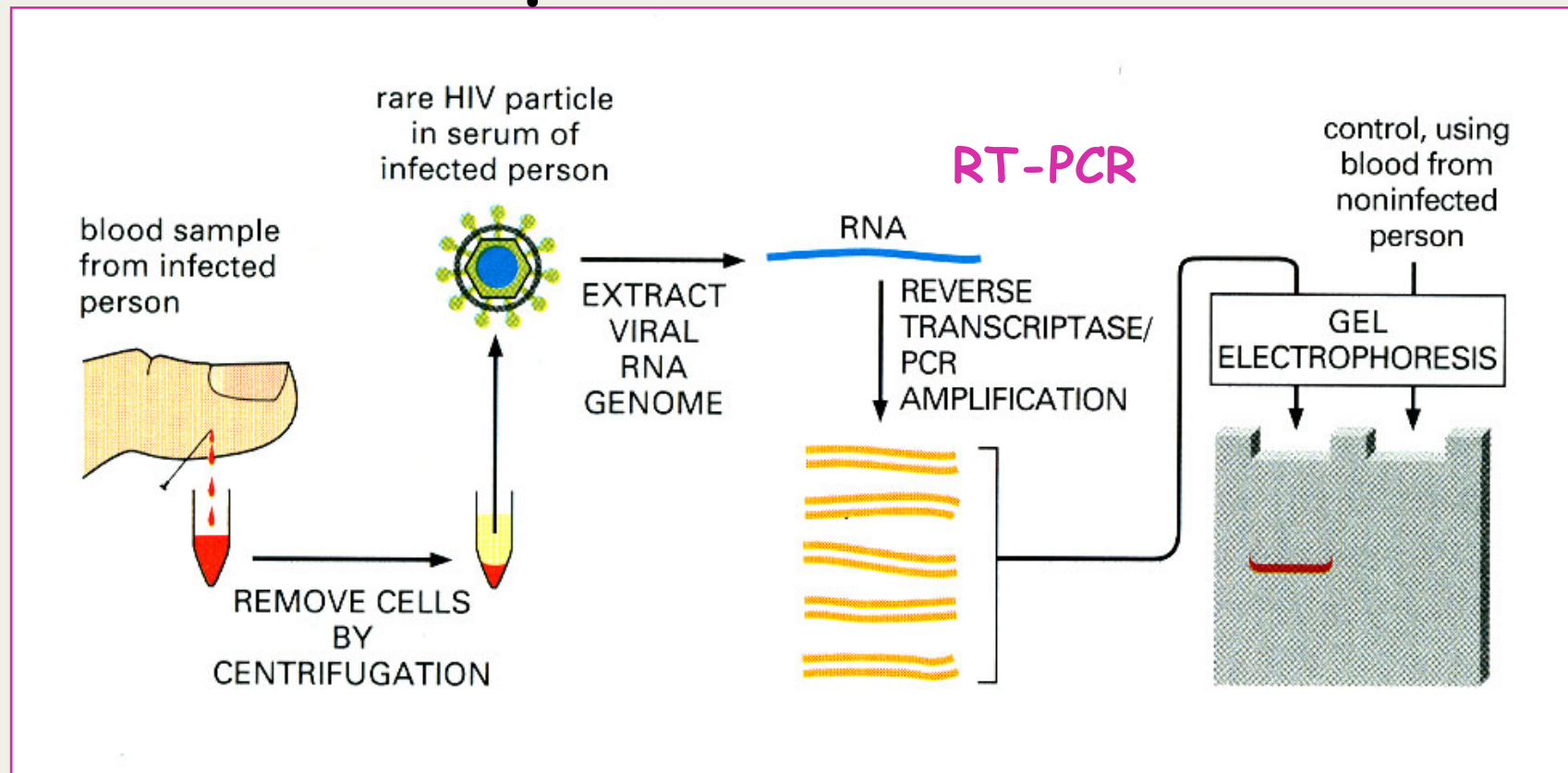
http://www.promega.com/biomath/calc11.htm#melt_results

Factores que afectam a reacção em cadeia da polimerase PCR

- temperaturas (5° abaixo do T_m) e tempo de emparelhamento
- tempo de extensão (a 72°C *Taq* DNA polimerase ~60 bases /segundo ; 45 seg. suficientes para fragmentos até 1 kb)
- número de ciclos (normalmente 25-35 ciclos)

Extensão final 5-15 min. a 72°C → completa a extensão de produtos parciais e facilita emparelhamento

Aplicação da PCR na detecção de infecção pelo vírus HIV



Aplicação da PCR em medicina forense

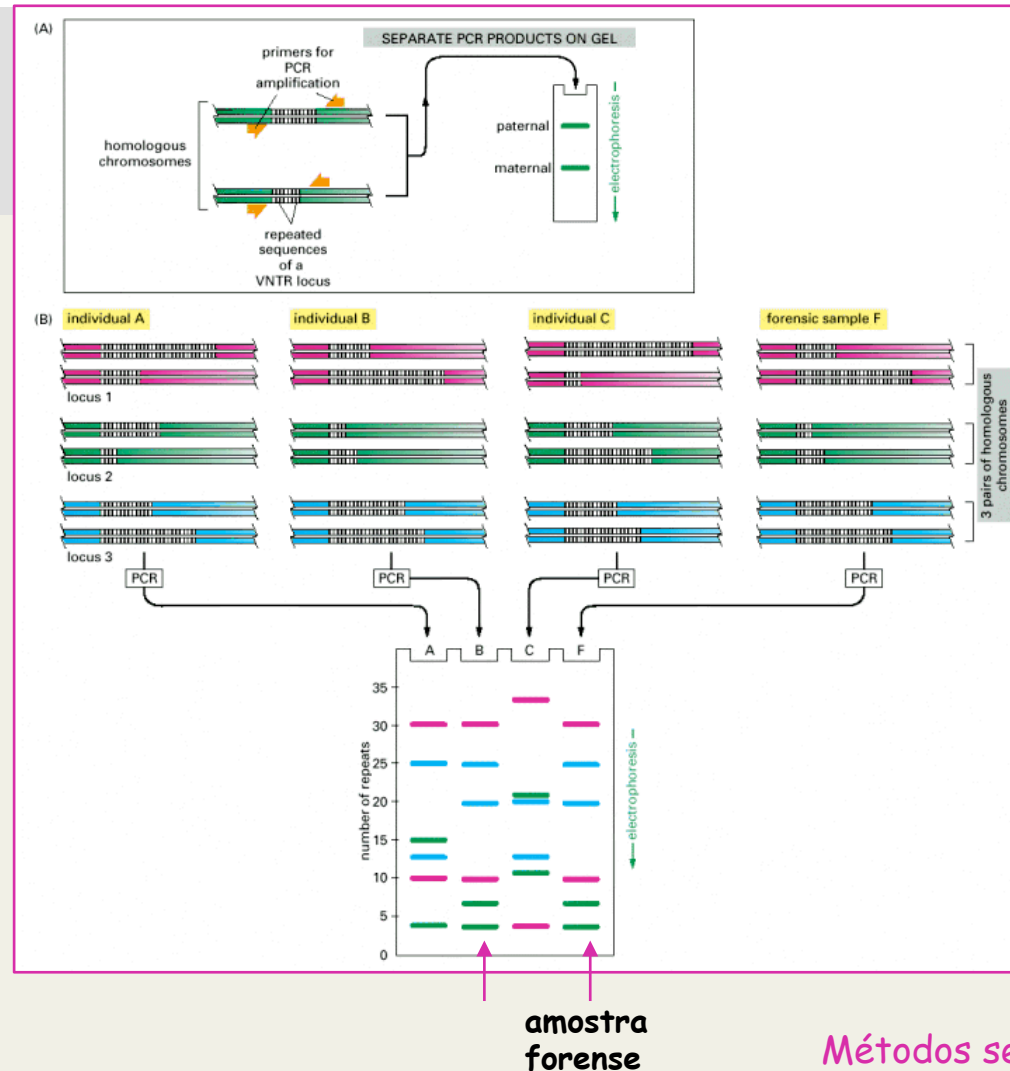


Figure 8-41. How PCR is used in forensic science. (A) The DNA sequences that create the variability used in this analysis contain runs of short, repeated sequences, such as CACACA . . . , which are found in various positions (loci) in the human genome. The number of repeats in each run can be highly variable in the population, ranging from 4 to 40 in different individuals. A run of repeated nucleotides of this type is commonly referred to as a *hypervariable microsatellite* sequence also known as a VNTR (*variable number of tandem repeat*) sequence. Because of the variability in these sequences at each locus, individuals usually inherit a different variant from their mother and from their father; two unrelated individuals therefore do not usually contain the same pair of sequences. A PCR analysis using primers that bracket the locus produces a pair of bands of amplified DNA from each individual, one band representing the maternal variant and the other representing the paternal variant. The length of the amplified DNA, and thus the position of the band it produces after electrophoresis, depends on the exact number of repeats at the locus. (B) In the schematic example shown here, the same three VNTR loci are analyzed (requiring three different pairs of specially selected oligonucleotide primers) from three suspects (individuals A, B, and C), producing six DNA bands for each person after polyacrylamide gel electrophoresis. Although some individuals have several bands in common, the overall pattern is quite distinctive for each. The band pattern can therefore serve as a "fingerprint" to identify an individual nearly uniquely. The fourth lane (F) contains the products of the same reactions carried out on a forensic sample. The starting material for such a PCR can be a single hair or a tiny sample of blood that was left at the crime scene. When examining the variability at 5 to 10 different VNTR loci, the odds that two random individuals would share the same genetic pattern by chance can be approximately one in 10 billion. In the case shown here, individuals A and C can be eliminated from further enquiries, whereas individual B remains a clear suspect for committing the crime. A similar approach is now routinely used for paternity testing

Métodos semelhantes aplicados na análise de paternidade

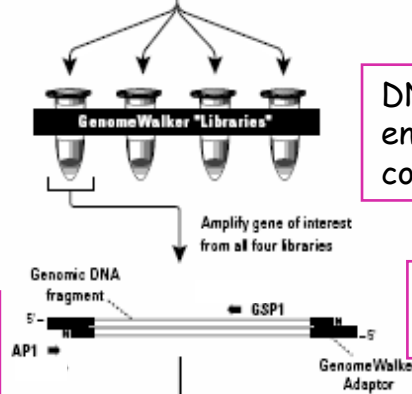
Genome Walking

Permite obter regiões adjacentes a regiões já conhecidas

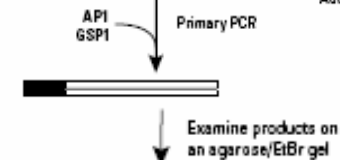
Adaptador - molécula de DNA em cadeia dupla



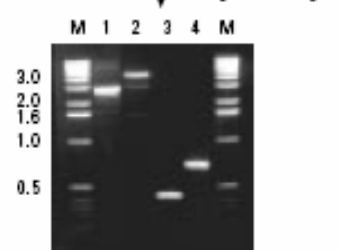
DNA genómico cortado com enzimas de restrição que cortam a direita



A todos os fragmentos obtidos ligam-se adaptadores



Amplificação por PCR
AP1 - oligo dentro do adaptador
GSP1 - oligo dentro da região já conhecida



Clonagem e sequenciação dos produtos

- Clone & characterize major PCR products
- Test for promoter activity by cloning into reporter vector