



Universidade Federal de Pelotas
CDTec - Graduação em Biotecnologia
Disciplina de Biologia Molecular



Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Priscila M. M. de Leon

Dra., Médica Veterinária

Profa, PNDP Biotecnologia/UFPEL



PCR

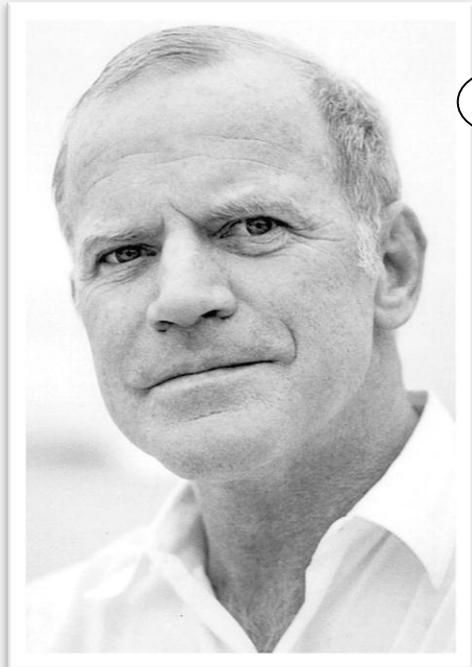
Polymerase Chain Reaction

Amplificação *in Vitro* de uma
seqüência específica de DNA

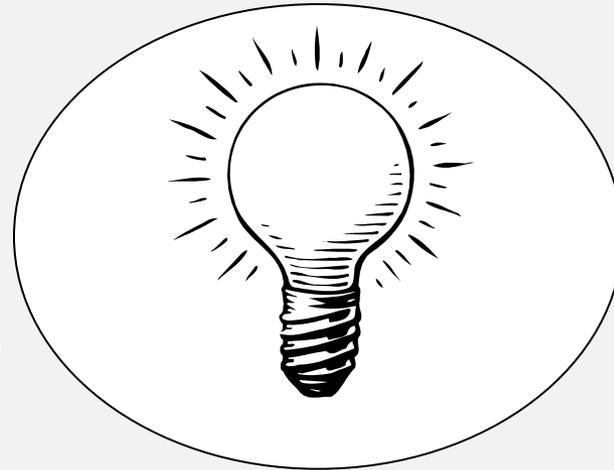
* replicação *in Vitro*

História PCR – Como tudo começou...

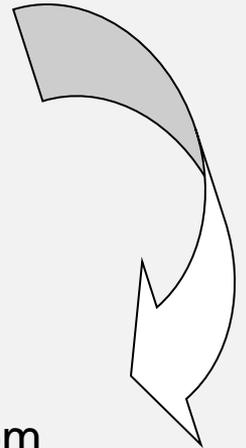
- Dezembro de 1983



Kary Mullis

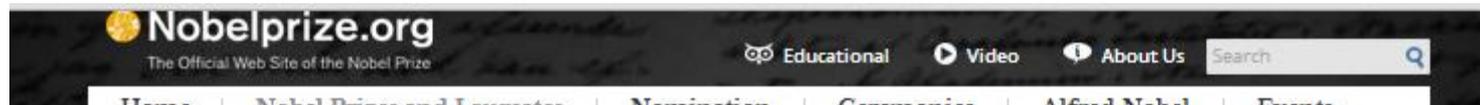


A sua ideia: desenvolver um processo com o qual o DNA poderia ser multiplicado artificialmente através de ciclos repetidos de duplicação catalisada pela DNA polimerase



História

Kary Mullis (1983)



...with one half to Kary Mullis "for his development of the polymerase chain reaction (PCR) method" and with one half to Michael Smith "for his fundamental contributions to the establishment of oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis and its development for protein studies".



PCR

PCR se constitui hoje no método de rotina para isolar rapidamente sequências específicas a partir de uma mistura complexa de sequências genômicas ou de cDNAs.

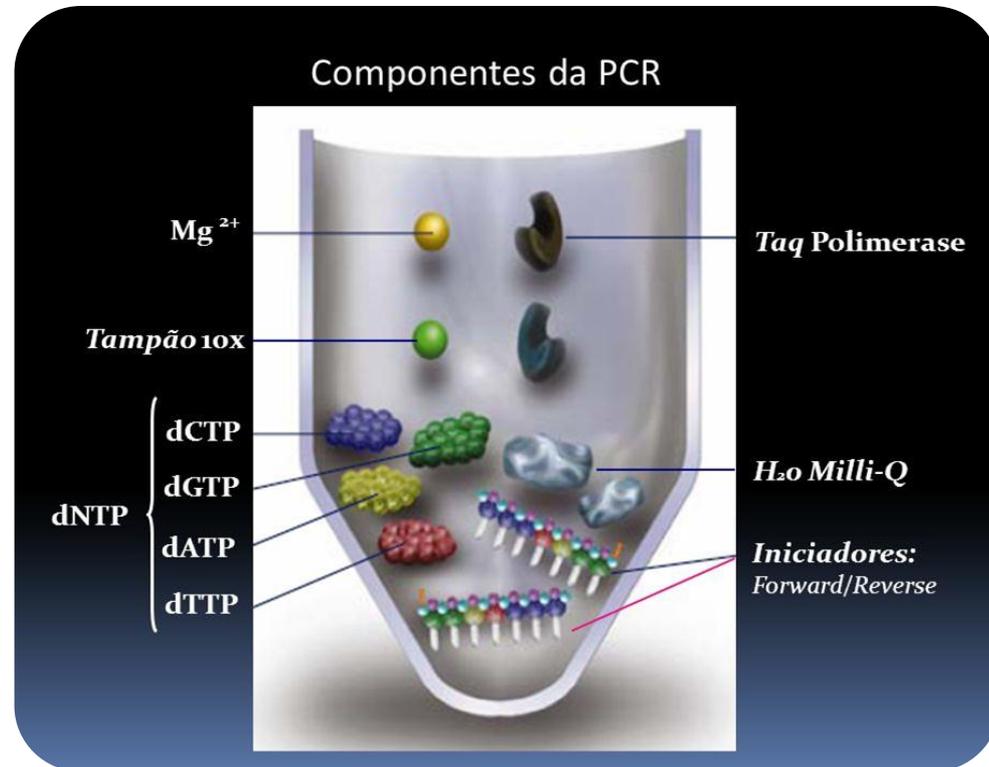
Aplicações:

- Diagnóstico de doenças genéticas
- Diagnóstico de doenças infecciosas
- Medicina forense
- Pesquisa básica e aplicada
- Identificação genética
- Identificação de mutações

Componentes da reação

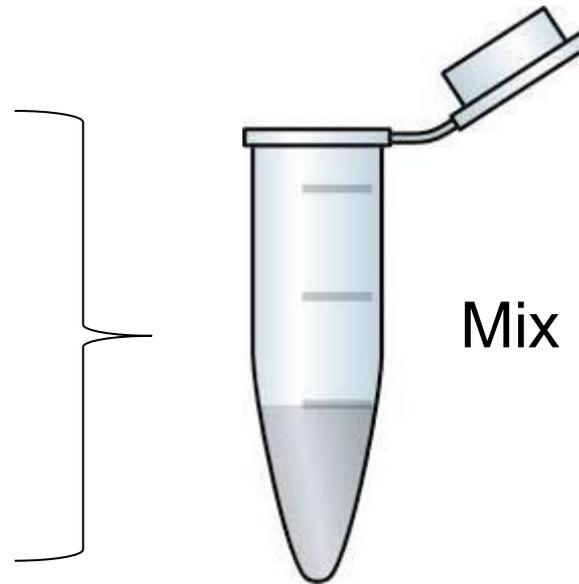


- DNA molde
- Oligonucleotídeos (primer)
- dNTP's
- DNA Polimerase
- Magnésio
- Tampão
- Água



MASTER MIX PCR

- ❖ DNA molde
- ❖ Oligonucleotídeos (primer)
- ❖ Água
- ❖ DNA Polimerase
- ❖ Magnésio
- ❖ Tampão
- ❖ dNTP's



PCR – DNA Polimerase

- DNA Polimerases são enzimas que sintetizam uma nova fita de DNA complementar a uma fita molde.



Atuam no processo de replicação do DNA

- **DNA-Polimerase I** tem a capacidade de **se ligar** em uma região fita simples de DNA fita dupla e **sintetizar uma fita complementar** nova, degradando a fita existente conforme prossegue na polimerização;

- **Taq-DNA-Polimerase:** enzima DNA-Polimerase I extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, utilizada na reação de PCR;

Thermus aquaticus

-Estável a temperaturas de 177 graus;



Temperatura Ótima:
72 graus

Thomas D. Brock no lago do “Yellowstone National Park”
de onde foi isolado o *Thermus aquaticus*



Em 1969: Thomas D. Brock e Hudson Freeze, da Universidade de Indiana relataram uma nova espécie de bactéria termofílica que deram o nome *Thermus aquaticus*. A bactéria foi descoberta no Parque Nacional de Yellowstone e desde então tem sido encontrada em ambientes térmicos semelhantes em todo o mundo.

PCR – componentes da reação

- **DNA molde:** deve estar livre de impurezas, pois estas podem inibir a PCR
- **Solução tampão:**
 - Tris: mantém o pH da solução
 - Ions monovalentes: K^+ , Na^+ e NH_4^+ otimizam as condições da reação
 - Albumina sérica bovina: atua como proteína estabilizadora
 - Magnésio:
 - Baixa concentração: pouco ou nenhum produto
 - Elevada concentração: baixa especificidade da reação
- **Nucleótidos (dNTPs)**
 - Baixa concentração: maior especificidade e pouco produto final.
 - Elevada concentração: menor especificidade e mais produto final
- **Primers**
 - Baixa concentração: induz má polimerização
 - Elevada concentração: induz produtos inespecíficos e formação de dímeros de *primers*

Equipamento: Termociclador



CICLOS DA PCR

Programa

94 °C por 5 min

94 °C por 1 min

55 °C por 1 min

72 °C por 1 min

35 ciclos

72 °C por 5 min

4 °C

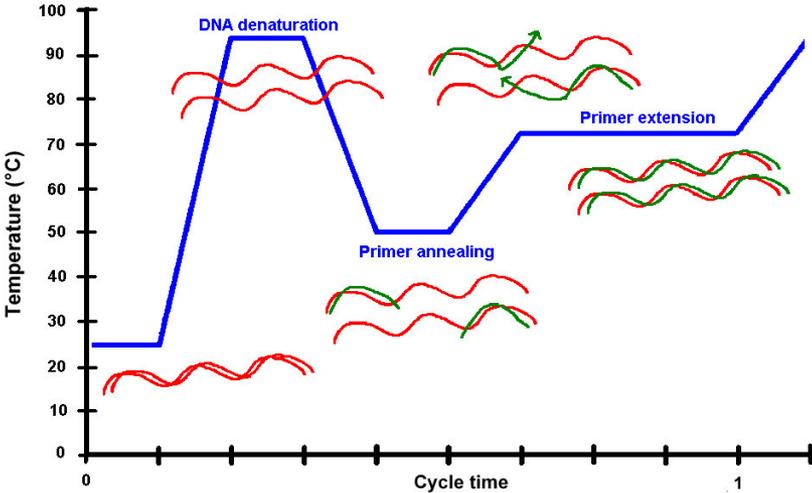


O ciclo da PCR

Anelamento dos primers
55 °C

Desnaturação do DNA
94 °C

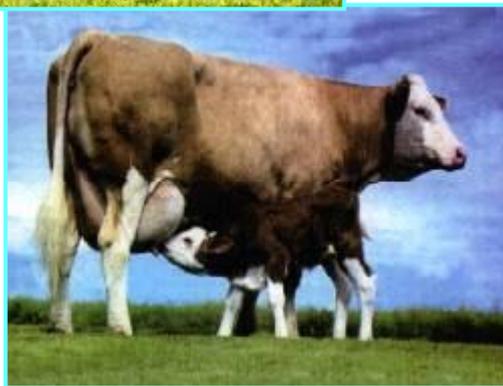
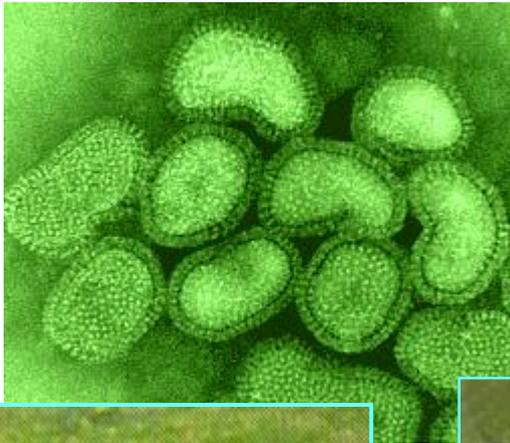
Extensão pela Taq-DNA-polimerase
72 °C



ETAPAS

- Extração de DNA
- Desenho dos Primers
- Reação de PCR
- Análise dos resultados

EXTRAÇÃO DO DNA



DELINEAMENTO DE *PRIMERS*

Os iniciadores (*oligos / primers*) são a chave do sucesso ou da falha de um experimento com PCR.

- Tamanho dos primers (18 a 30 pb);
- Produto amplificado até 1000 pb;
- Estabelecimento das temperatura [CG];



p53

GENE TP53

11 éxons e 10 íntrons

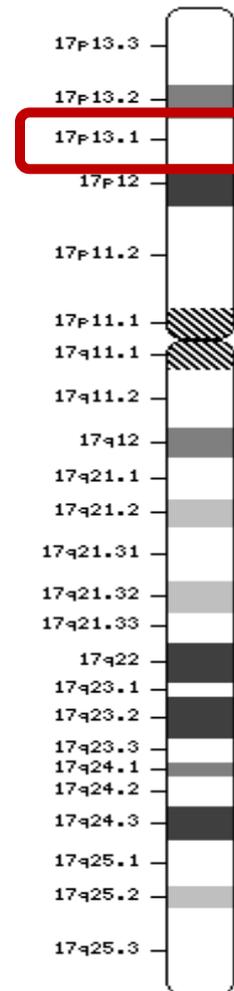
20 Kb

cromossomo 17p13.1

p53

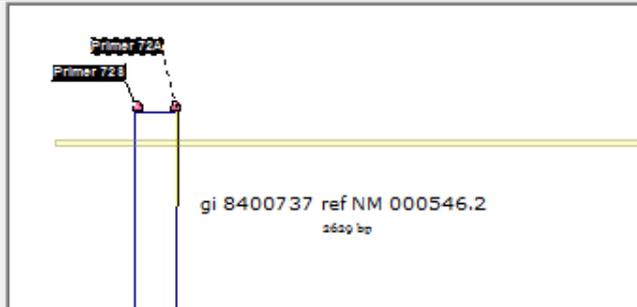
393 aminoácidos

53kD





- gi_8400737_ref_NM_000546.2
- General Description
- Standard Fields
- Comments
- Annotations
- Feature Map



101	TTTGAGCTTC	TCAAAAAGTCT	AGAGCCACCG	TCCAGGGAGC	AGGTAGCTGC	TGGGCTCCGG	GGACACTTIG	CGTTCGGGCT	GGGAGCGTGC	TTTCCACGAC
201	GGTGACACGC	TTCCTGGAT	TGGCAGCCAG	ACTGCCTTCC	GGGTCAGTGC	CATGGAGGAG	CCGCAGTCAG	ATCCTAGCGT	CGAGCCCCT	CTGAGTCAGG
301	AAACATTTTC	AGACCTATGG	AAACTACTTC	CTGAAAACAA	CGTTCTGTCC	CCCTTGCCGT	CCCAAGCAAT	GGATGATTTG	ATGCTGTCCC	CGGACGATAT
401	TGAACAATGG	TTCAGTGAAG	ACCCAGGTCC	AGATGAAGCT	CCCAGAATGC	CAGAGGCTGC	TCCCCGCGTG	GCCCCTGCAC	CAGCAGCTCC	TACACCGGCG
501	GCCCCTGCAC	CAGCCCCCTC	CTGGCCCCTG	TCATCTTCTG	TCCCTTCCCA	GA	AAACCTAC	CAGGGCAGCT	ACGGTTTCCG	TCTGGGCTTC
601	GGACAGCCAA	GTCTGTGACT	TGCACGTACT	CCCCTGCCCT	CAACAAGATG	TTTGGCCAA	TGGCCAAGAC	CTGCCCTGTG	CAGCTGTGGG	TTGATTCCAC
701	ACCCCCGCC	GGCACCCGCG	TCCGCGCCAT	GGCCATCTAC	AAGCAGTCAC	AGCACATGAC	GGAGGTTGTG	AGGCGCTGCC	CCCACCATGA	GCGCTGTCTA

354 bp - 552 bp (199 bp)

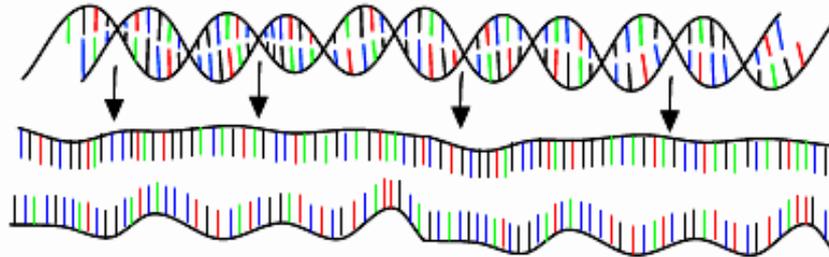
553 bp (3')

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

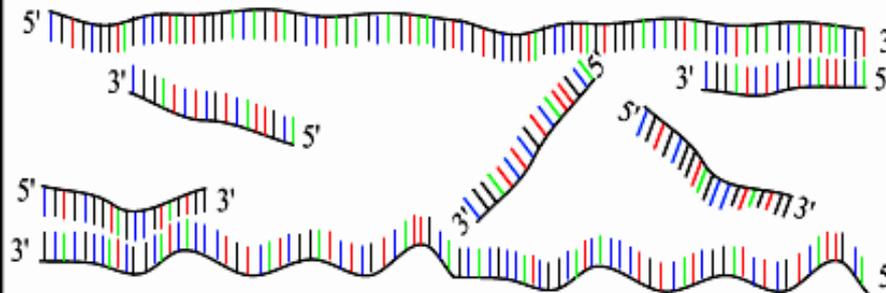
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

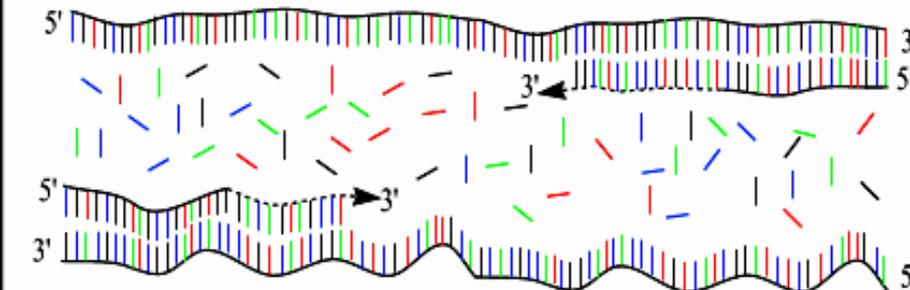
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

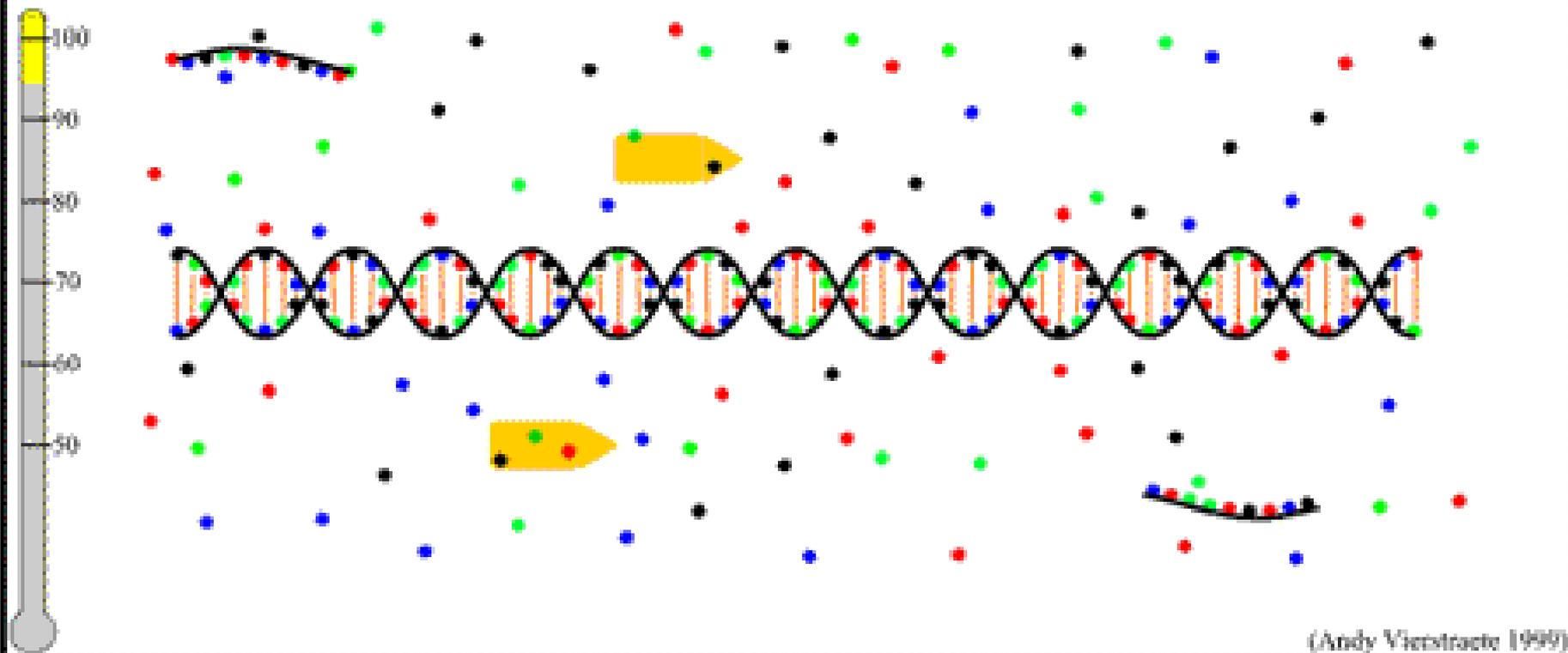
2 minutes 72 °C

only dNTP's

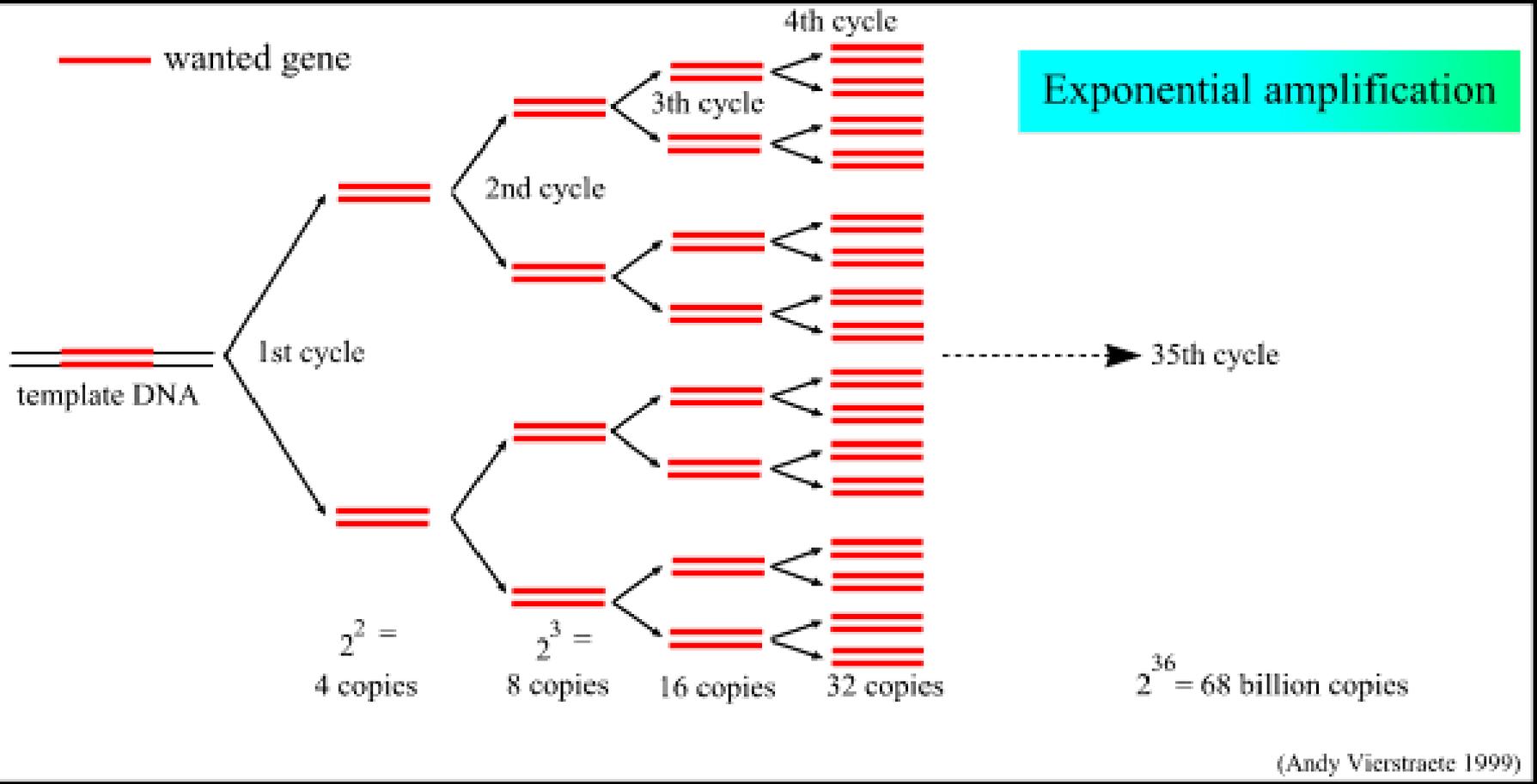


ETAPAS DA PCR

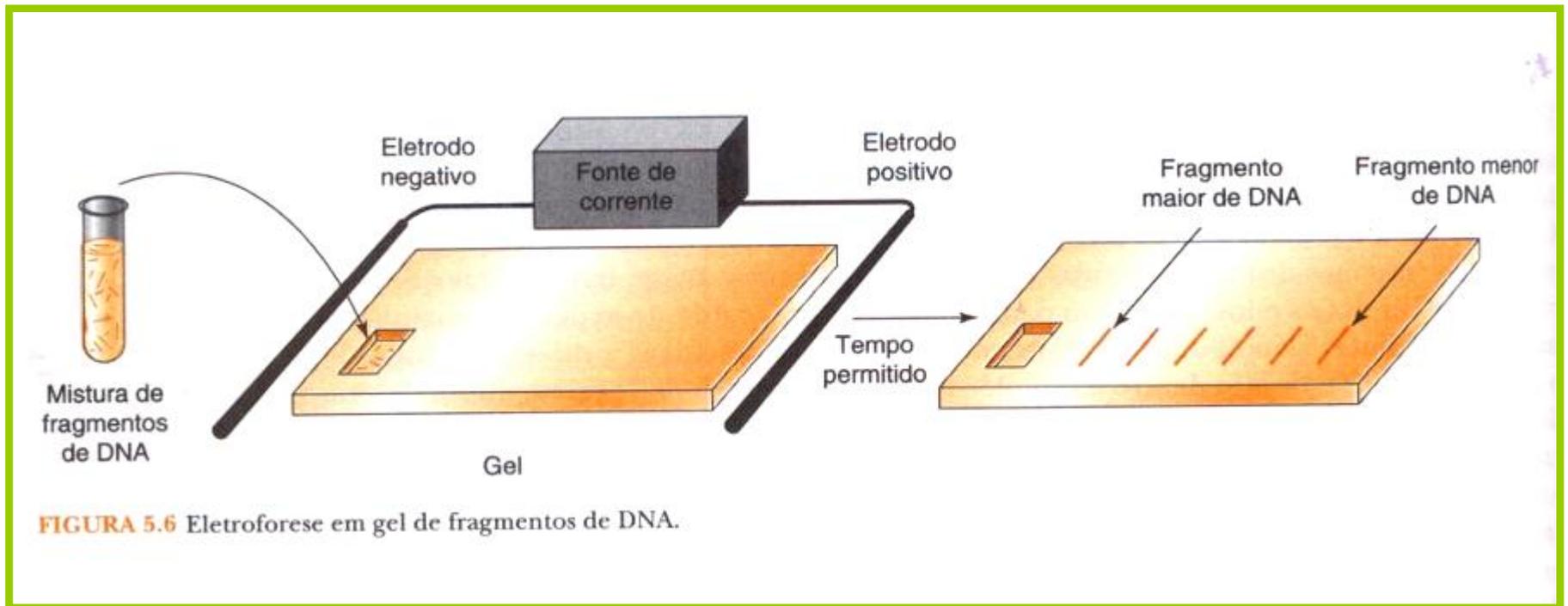
PCR : Denaturation 94°C



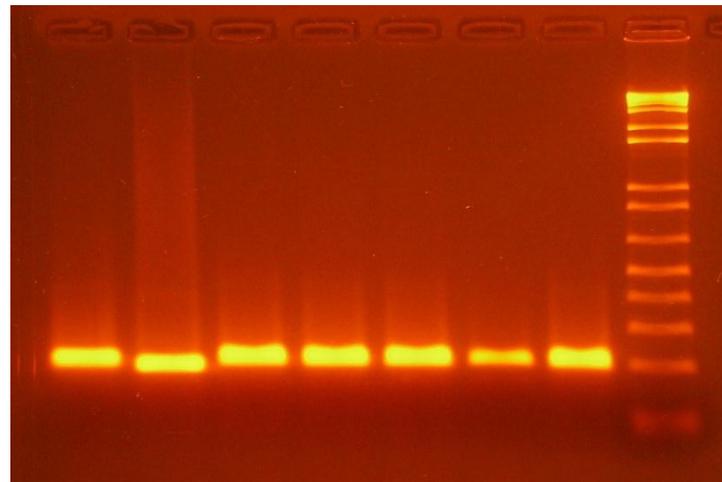
(Andy Vietstraete 1999)



Eletroforese



Amplificação do fragmento do SNP Arg72Pro



199pb