

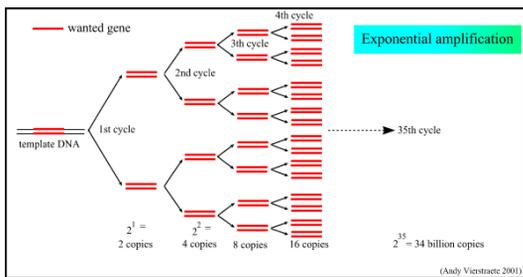
## PCR - Fundamentos e desenho de *primers*

Prof. Alan McBride  
Biotecnologia 2013.1  
CDTec, UFPel

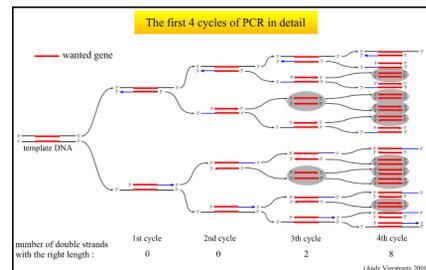
## O que é PCR?

- PCR: *Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase.
- Amplificação seletiva de uma região única, específica de DNA dentro uma mistura complexa de moléculas de DNA/RNA.
- Os alvos a serem considerados no PCR são as regiões que flanqueiam a sequência específica de DNA a ser amplificada, a qual pode ser um gene inteiro ou somente uma região pequena.
- PCR pode ser considerado uma copiadora molecular.

## PCR



## PCR



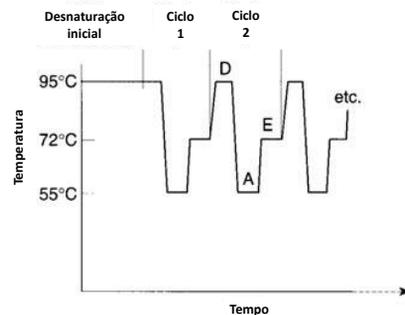
## *Polymerase chain reaction* - PCR

### • História do PCR

- 1971 Primeiro uso de *primers* para copiar DNA:
  - Kleppe *et al.* (1971) *J. Mol. Biol.* 56, 341-346.
- 1983 PCR desenvolvido por Kary Mullis;
- 1985 Primeiras publicações de uso do PCR
  - Saiki *et al.* (1985) *Science* 230, 1350-4;
  - Mullis *et al.* (1986) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51, 263-73.
- 1993 Mullis recebeu Prêmio Nobel (Química).



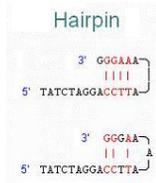
## A reação em cadeia





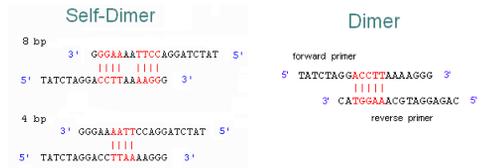
## Desenho de Primers cont.

- Os primers não podem formar grampos (*hairpins*):



## Desenho de Primers cont.

- Primers não devem conter regiões repetitivas de DNA:



- Mas, dependerá na temperatura.

## Problemas com estruturas secundárias

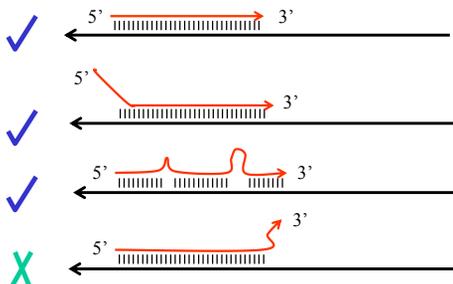
- Se os iniciadores podem anelar entre se, a eficiência do PCR reduzirá drasticamente.
- Entretanto, estas estruturas secundárias são inofensivo quando a temperatura de anelamento não deixa formar:
  - Se os dímeros ou grampos formam as 50 °C e a temperatura mínimo do PCR é de 55 °C, não terá uma problema.

## Pares de iniciadores apropriados

Os iniciadores funcionam em pares - iniciador directo e o iniciador inverso. Uma vez que são utilizadas na mesma reacção de PCR, deve-se garantir que a condição de PCR é adequado para ambos.

Uma característica fundamental é a sua temperatura de anelamento, que devem ser compatíveis uns com os outros. A diferença máxima permitida é de 3 °C. Quanto mais perto sua  $T_{anneal}$ , melhor.

## Quando um primer é um primer?

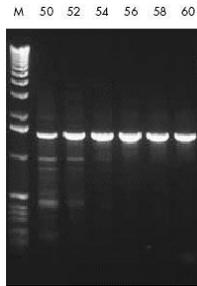


## Otimizando o PCR

- Temperatura de anelamento dos primers.
- A concentração de  $Mg^{2+}$  na reacção.
- O tempo de extensão.
- Os tempos de desnaturação e anelamento.
- A temperatura de extension.
- A quantidade de DNA molde e de polimerase - "mais é menos".

## Otimizando a temperatura de anelamento

- *Primers* tem uma temperatura de anelamento calculada (e.g. 54 °C).
- Temperatura deve ser confirmada na prática.
- Variações de temperatura em 2°C acima e abaixo.
- Use um gradiente.



## Otimizando a concentração de Mg<sup>2+</sup>

- O fidelidade do PCR dependerá na [Mg<sup>2+</sup>].
- Variações na [Mg<sup>2+</sup>] a nível de 0.5 mM.
- Pode ser necessário ter um meio termo entre rendimento e especificidade.

