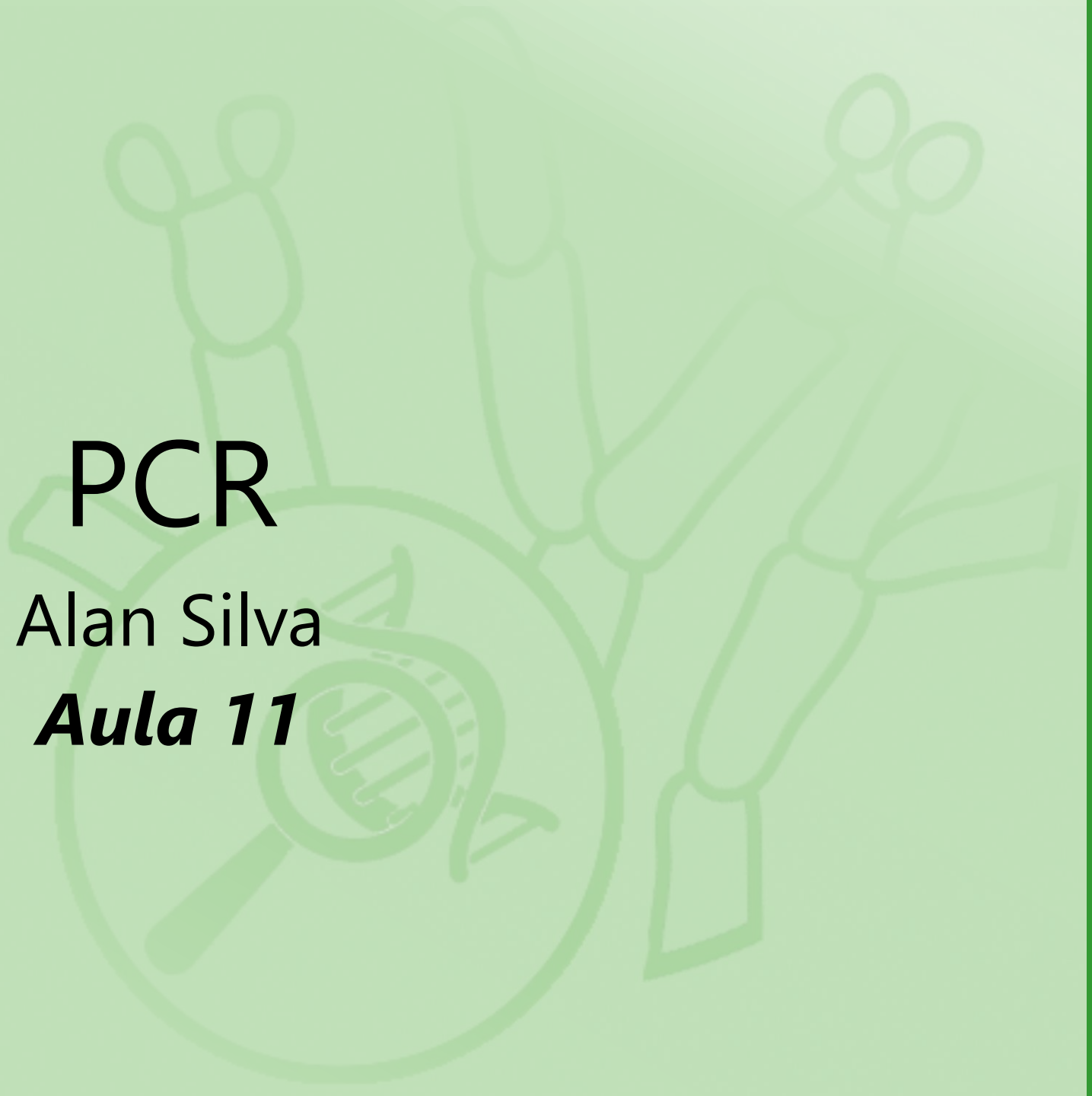


PCR

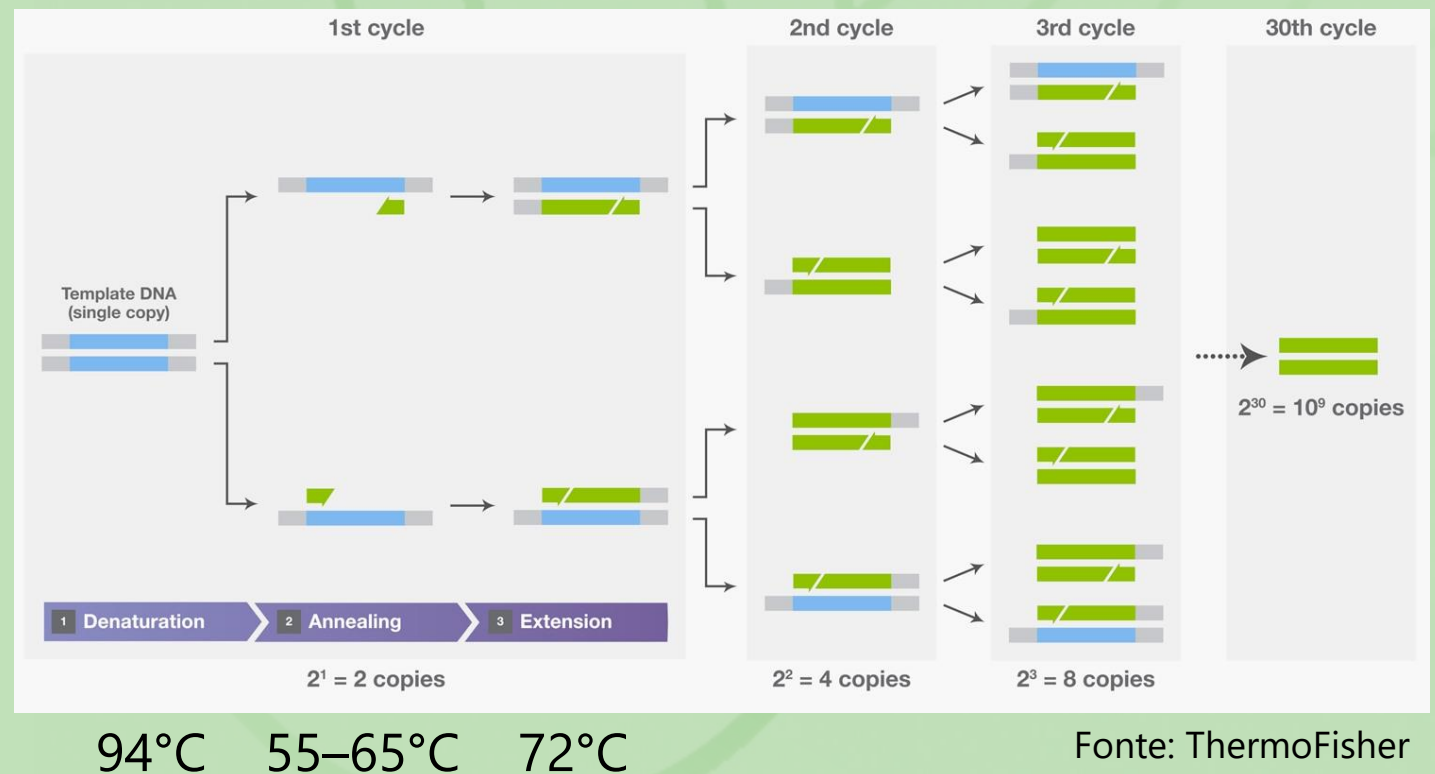
Alan Silva

Aula 11



Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Técnica mais utilizada em Biologia Molecular
- Simulação *in vitro* da duplicação de DNA nas células
- Componentes:
 - Água
 - Tampão de reação
 - Cofator Mg^{2+}
 - dNTPs
 - Iniciadores (*primers*)
 - DNA/RNA alvo
 - Enzima polimerase



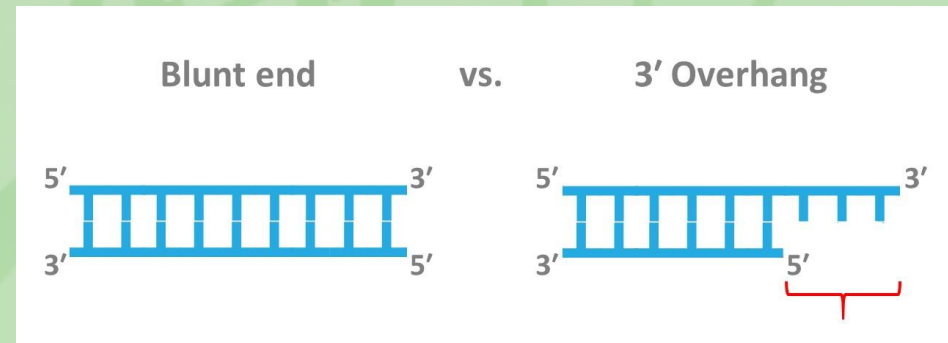
Fonte: ThermoFisher

Tipos de PCR

- Por objetivo:
 - Multiplex
 - Competitiva
 - RT (*reverse transcription*)
 - Nested
 - Touch down
 - Quantitativa
 - Multiple displacement (MDA)
- Por enzima:
 - *High fidelity*
 - *Hot start*
 - *Long range*
 - *Phi29*

- Qual enzima utilizar?
 - *Taq*: aplicações gerais
 - *Taq* especial: fragmentos longos
 - *Phusion/Fusion*: alta fidelidade e velocidade

A-overhang ou blunt-end?



Fonte: Goldbio

Como montar uma reação

- Primers Novos
 - fabricante

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| 10X DreamTaq Buffer* | 5 µL |
| dNTP Mix, 2 mM each (#R0241) | 5 µL (0.2 mM of each) |
| Forward primer | 0.1-1.0 µM |
| Reverse primer | 0.1-1.0 µM |
| Template DNA | 10 pg - 1 µg |
| DreamTaq DNA Polymerase | 1.25 U |
| Water, nuclease-free (#R0581) | to 50 µL |
| Total volume | 50 µL |

Fonte: ThermoFisher

- Primers descritos
 - publicação

Ex:

as amplificações foram conduzidas com a Taq DNA Polymerase (Marca) em volume total de 12,5 µL, contendo 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer, 50 ng de DNA e 1 U de Taq polimerase

| Reagentes | Estoque | Final | Volume |
|-------------------|----------|--------|----------------|
| Tampão | 10 x | 1 x | 1,25 µL |
| MgCl ₂ | 20 mM | 2 mM | 1,25 µL |
| dNTP | 10 mM | 200 µM | 0,25 µL |
| Primer 1 | 10 µM | 0,2 µM | 0,25 µL |
| Primer 2 | 10 µM | 0,2 µM | 0,25 µL |
| DNA | 50 ng/µL | 50 ng | 1 µL |
| Taq | 5 U/µL | 1 U | 0,2 µL |
| Água | | | 8,05 µL |
| TOTAL | | | 12,5 µL |

Questões Gerais:

- Quanto de DNA?
 - Plasmídeo: 10pg a 10ng
 - gDNA: 10ng a 100ng

| Organism | genome size (bp) | genome mass (pg) | GOI | copies/genome | pg/1 copy | ng sample | copies |
|-----------|------------------|------------------|--------|---------------|------------|-----------|-------------|
| human | 3000000000 | 3,288 | gene 1 | 1 | 3,288 | 1 | 304,136253 |
| Cg | 51600000 | 0,0565536 | gene 2 | 1 | 0,0565536 | 1 | 17682,34029 |
| Plasmídeo | 10000 | 0,00001096 | gene 3 | 1 | 0,00001096 | 1 | 91240875,91 |

- Quanto de enzima?
 - 0,5U: fragmentos pequenos, poucos ciclos, pequeno volume
 - 1U: fragmentos grandes, muitos ciclos, muito volume
- Qual volume final?
 - 10/12,5 µL: verificar amplificação
 - 25/50 µL: uso posterior

Gel de Eletroforese

- Análise qualitativa prática e barata
- Separação por tamanho de DNA
- Tampões de corrida:
 - TAE:
 - prático, econômico e versátil
 - Estoque 50X, corrida até 10V/cm
 - TBE:
 - tradicional, menos econômico
 - Estoque 5X, corrida até 10V/cm
 - NaBo
 - ↓ sais, ↓ aquecimento, efeito bactericida, ↑ precipitação
 - Estoque 50X, corrida até 35V/cm

| Tampão | Estoque (L) |
|-------------|--|
| TAE | 50X 242g Tris Base 57,1 mL Ácido Acético Glacial 100 mL EDTA 0,5M pH 8.0 |
| TBE | 5X 54 g Tris Base 27,5 g Ácido Bórico 20 mL EDTA 0,5M pH 8.0 |
| NaBo | 50X 20 g NaOH ~ 120 g Ácido Bórico até pH 8.0 |

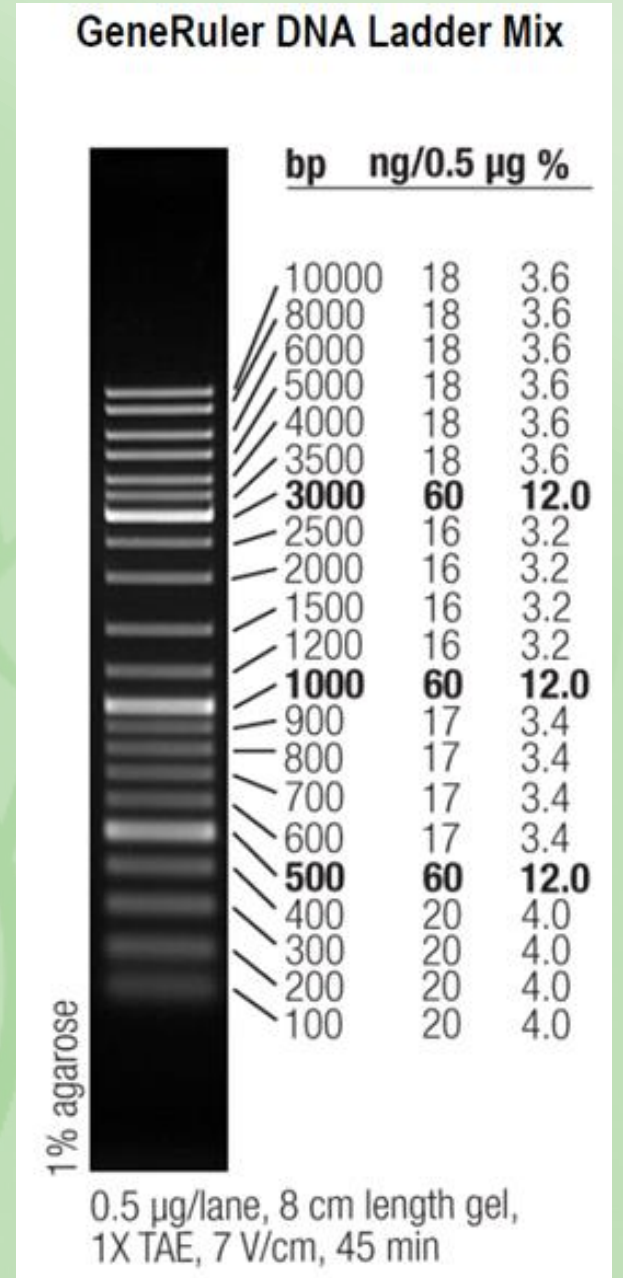
Gel de Eletroforese

- Tampão de Amostra:
 - Corante de alto peso molecular
 - Corante de baixo peso molecular
 - Substância para aumento de densidade
- Exemplo: 1% agarose em TBE 1X
 - **Xileno cianol**: ~ 3500 pb
 - **Azul de bromofenol**: ~ 300 pb
 - **Orange G** (extra): ~ 40 pb

| BUFFER TYPE | 6X BUFFER | STORAGE |
|-------------|---|---------------------|
| I | 0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF 40% (w/v) sucrose in H ₂ O | 4°C |
| II | 0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF 15% Ficoll (Type 400; Pharmacia) in H ₂ O | room temperature |
| III | 0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF 30% glycerol in H ₂ O | 4°C |
| IV | 0.25% bromophenol blue 40% (w/v) sucrose in H ₂ O | 4°C |

Gel de Eletroforese

- Marcador Molecular
 - “régua” contendo fragmentos de tamanho conhecido
 - Cada banda tem tamanho e peso molecular conhecidos
- Como estimar a concentração?
 - Exemplo ao lado
 - 6 μL : 1 μL ladder + 1 μL tampão + 4 μL água
 - Mix = 100 μL + 100 μL + 400 μL = 600 μL total
 - Ex.: usando 5 μL
 - Banda de 3000 pb = 12% = 50 ng
 - Banda de 1500 pb: 13,3 ng



Questões Gerais:

- Concentração do Gel?
 - 1%: versátil, todas finalidades
 - 0,7%: separação de fragmentos grandes; purificação do gel
 - 1,5%: bandas menores mais nítidas
 - 2%: ssDNA, RNA ou bandas muito pequenas
- Detecção no gel de agarose?
 - EtBr: tradicional, barato; tóxico
 - GelRed, SybrSafe: seguro; mais caro

Questões Gerais:

- Em que momento fazer a marcação do DNA?
 - Depois da corrida (ideal)
 - Mergulhando o gel em solução de EtBr (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ou GelRed/SybrSafe
 - Visualizar as bandas em UV (302 ou 312 nm)
 - Bandas de tamanho exato esperado
 - Marcação do gel:
 - Preparar o gel com o marcador e as amostras coram ao correr
 - Contaminação de todos utensílios
 - Marcação do DNA
 - Mistura o marcador ao DNA, que já corre marcado
 - Mais prático e eficiente, menos uso de marcador
 - Amostras podem sofrer pequena alteração de tamanho (devido ao peso molecular especialmente do GelRed).

Como correr um gel padrão de DNA em agarose?

- 1) Prepare 1x de Tampão de corrida TAE diluindo 20 mL do estoque 50x em 980 mL de água destilada. Encha a cuba até um volume que cubra o gel completamente
- 2) Prepare Agarose 1% em TAE 1x (ex.: 1g de agarose em 100 mL de TAE 1x frio, então derretendo no micro-ondas evitando que o líquido ferva e esperando esfriar até ~60 °C) e aplique na cama com o pente desejado para atingir uma espessura de 0,3-0,5cm (ou mais grosso, suficiente para caber o volume de amostra). A agarose não utilizada pode ser bem tampada e guardada líquida em estufa 60 °C por alguns dias.
- 3) Aguarde 20-30 min até o gel solidificar completamente, coloque a cama com o gel na cuba, verificando se o tampão cobriu o gel totalmente, então retire o pente puxando para cima por ambos os lados.
- 4) Misture 2 µL de DNA genômico, produto de PCR ou plasmídeo com 1 µL de tampão de corrida (6X) em um pedaço de parafilme, então aplique em um dos poços do gel. Aplique 3-5 µL de Marcador Ladder no primeiro poço
- 5) Conecte a tampa e observe os cabos, o cabo do lado onde o DNA está aplicado vai no polo negativo e o lado para onde o DNA irá correr vai no polo positivo.
- 6) Aplique a voltagem desejada (100V para um gel médio – 10 cm² em TAE) com amperagem e frequência máximas (elas serão controladas com base na voltagem fixa) e 1h de corrida. Ao iniciar a corrida, verifique se o arame metálico na parte de baixo da cuba está borbulhando, com o lado negativo mais intenso que o positivo (sinal de corrente elétrica passando corretamente).
- 7) Ao terminar, mergulhe o gel numa solução de EtBr em água destilada a 0.5 µg/mL (exemplo: 30 µL EtBr estoque 10 mg/mL em 600 mL água) por 15-20 minutos e então registre o gel em fotodocumentador UV 302/312 nm.

Regras gerais para desenho de primers

1) **Tamanho:** 18-23 bp.

Primers menores: anelam mais rápido no alvo, com mais chance de anelamento inespecífico.

Primers maiores: mais específicos mas aumentam as chances de estruturas secundárias.

2) **Temperatura de melting (T_m):**

Regra genérica para *Taq*: $2\text{ °C} \times A/T + 4\text{ °C} \times C/G$, T_m da reação 5 °C a menos que a menor T_m .

Cálculos variam com enzima e marca (usar calculadora)

Diferença de T_m entre os primers: $\leq 5\text{ °C}$

T_m s muito baixas aumentam as chances de anelamento inespecífico e T_m s muito altas, de não amplificação.

3) **Conteúdo CG:** entre 40 e 60% do primer. A ponta 3' é mais crítica, pois é onde o primer inicia o anelamento, então o último nucleotídeo deve ser C ou G e não mais que 3 CGs entre os últimos 5 nts.

4) **Repetições:** evitar repetições de 4+ bases (ex.: AAAA) ou dinucleotídeos (ex.: TATATATA).

5) **Tamanho do amplicon:** objetivo x flexibilidade
300-700 pb: simples detecção, identificação de linhagens;

200-300 bp: material raro, de difícil extração ou degradado:

90-150 pb: qPCR e RT-qPCR

Evitar: amplicons muito pequenos, por confundir com dímero de primers no gel de agarose.

6) **Outros fatores a evitar:** *hairpins*, *homodimers* e *heterodimers* (≤ 4 nts, $\Delta G \geq -9$ kcal/mole, ~~ponta-3'~~)

7) **Observações:**

- primers com caudas: calcular T_m apenas da região anelada, mas verificar estruturas secundárias do primer inteiro

- primers sempre 5'-3': ao desenhar o primer reverso, lembrar de fazer reverso-complemento da sequência

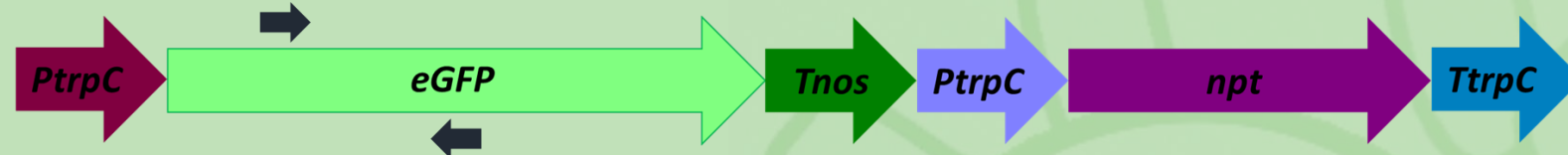


Primers para amplificação e detecção simples

- Passo a passo

- Escolher o alvo

- Qualquer um dos genes exógeno ao organismo (*eGFP* ou *npt*)



- Escolher o tamanho do fragmento

- Simples detecção: flexibilidade de região e tamanho

- Copiar a região desejada para uma ferramenta de design

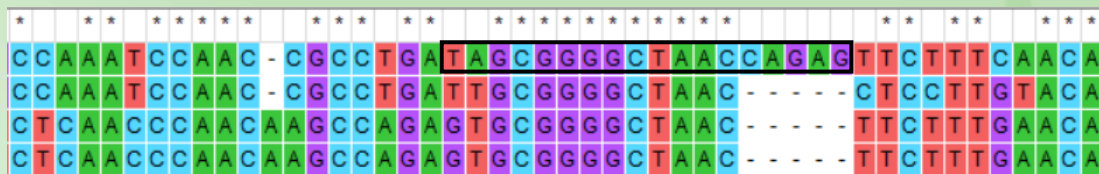
- Primer 3 Plus: <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
 - NCBI Primer-Blast: <http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

- Validar os primers para estruturas primárias e secundárias

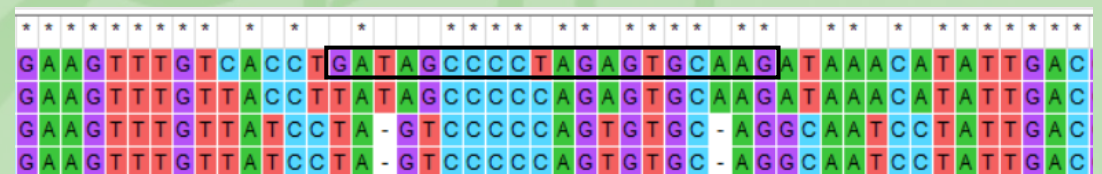
- Oligoanalyzer: <http://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
 - ≤ 4 nts; evitar estruturas na ponta 3'; $\Delta G > -9$ kcal/mole

Primers espécie-específicos

- Identificação de uma espécie entre várias
 - Diferentes espécies isoladas do mesmo hospedeiro
 - Espécies identificadas por sequenciamento
 - Desenhar primers para uma identificação mais rápida de uma das espécies.
- Passo a passo:
 - Dentre as regiões genômicas usadas para sequenciamento e identificação, escolher aquela com certa variabilidade
 - Desenhar os primers nas regiões específicas da espécie-alvo



Primer Forward



Primer Reverse