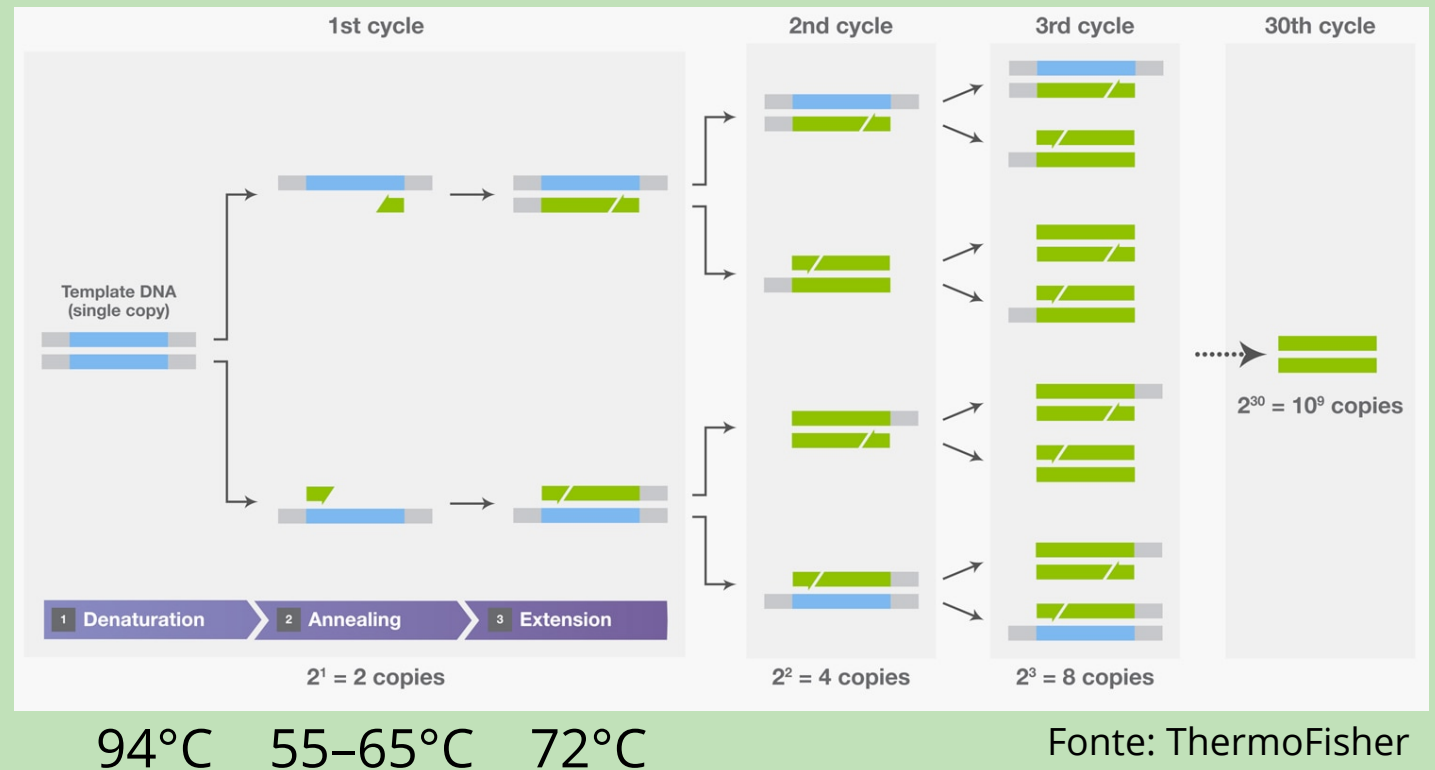


PCR

Alan Silva

Polymerase Chain Reaction (PCR)

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



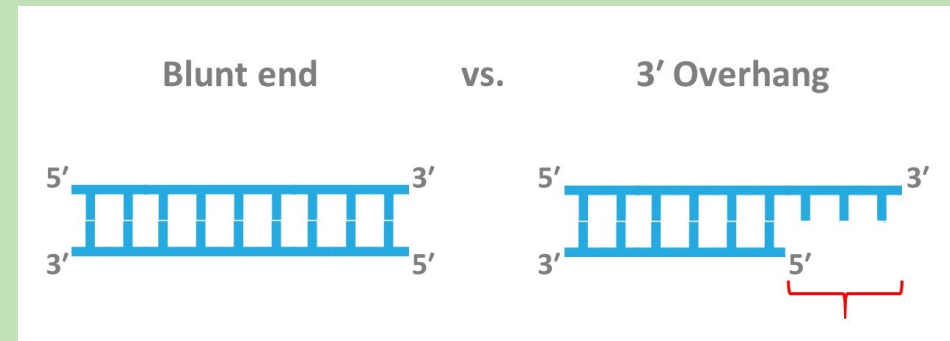
Fonte: ThermoFisher

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

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 porém aumentam as chances de estruturas secundárias.

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

Regra genérica para *Taq*: $2^{\circ}\text{C} \times \text{A/T} + 4^{\circ}\text{C} \times \text{C/G}$, 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: $\leq 5^{\circ}\text{C}$

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 de alvos

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

Síntese de Primers

- Escala
 - Basicamente a concentração
 - Maior escala = maior rendimento
 - 25 nmol para poucas reações, 50 nmol em uso mais constante
- Purificação
 - Dessalinização: coluna de gel poroso
 - Filtração em gel, remove sais mas deixa sequências truncadas
 - RP-OPC: cartucho de purificação de fase reversa
 - Remove sais e sequências truncadas, aplicações mais precisas
 - HPLC: coluna de fase reversa de alto desempenho
 - Altíssima pureza, para sondas, oligos longos ou marcados

Síntese de Primers

MLU Halle-Wittenberg
IAEW
Phytopathologie und Pflanzenschutz

Order ID:
Customer ID:
Your Order ID (PO#):

Order Date: 09.02.2023 06:46:00
Lab No: 4008

Eurofins Genomics
Anzinger Straße 7a
D-85560 Ebersberg

No	Oligo Name	Sequence (5'->3')	Yield [OD]	Yield [µg]	Yield [nmol]	Conc. [pmol/µl]	Vol for 100 pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Content	Barcode IDO	QC Report
1	ITS1_forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	4,11	118.71	20.31		203	61.0	5844.8	63%		QCReport Free
2	ITS4_reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	6,41	193.51	32.07		321	55.3	6033.9	45%		QCReport Free
3	ITS1f_forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	6,26	165.70	24.32		243	54.7	6813.46	36%		QCReport Free

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

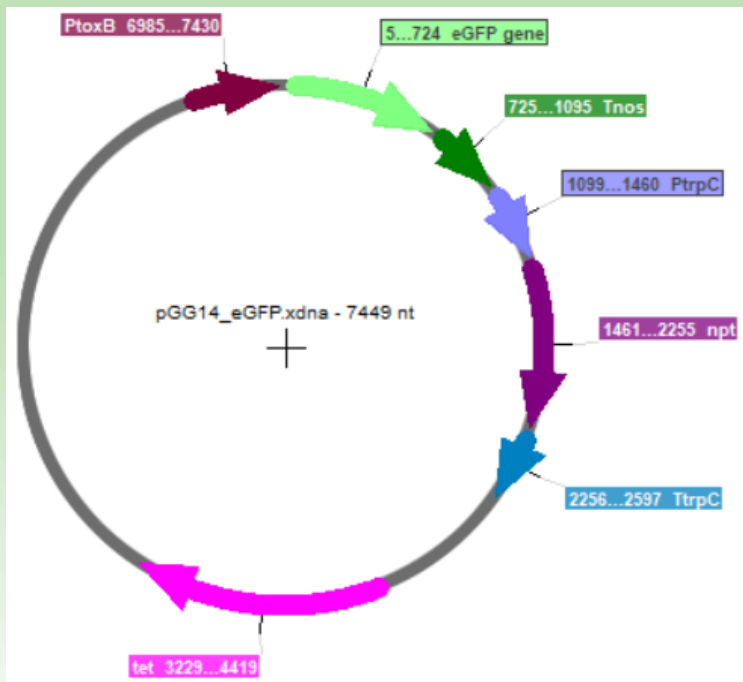
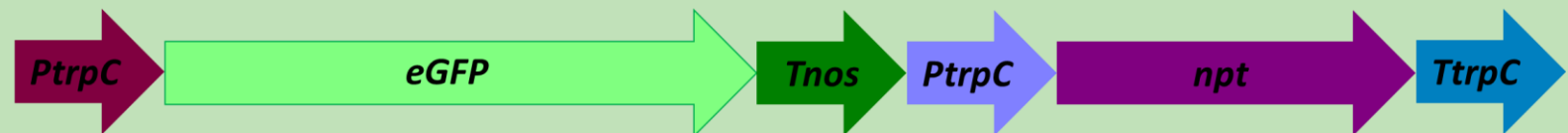
Ex:

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

Primers para amplificação e detecção simples

- Detecção de integração de cassete de transformação
 - *E. coli* foram clonadas com cassete eGFP+*npt*
 - Preciso fazer uma pré-seleção de colônias
- Origem dos genes: cassete montado em um plasmídeo

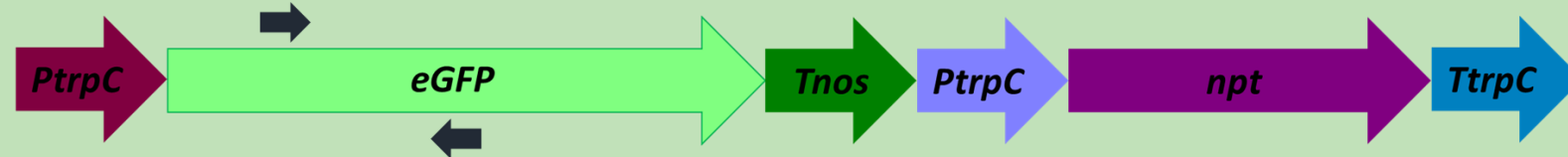
[illegible]

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

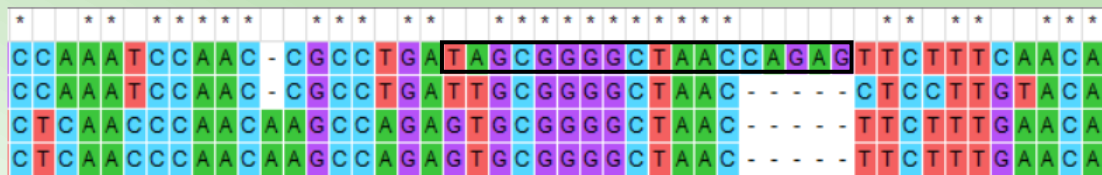
- Primer 3 Plus: <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
 - NCBI Primer-Blast: <http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

- Validar os primers para estruturas primárias e secundárias

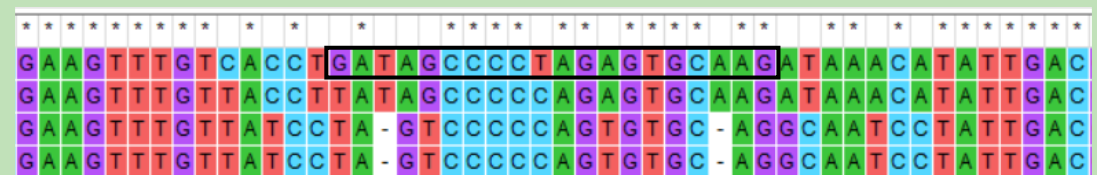
- Oligoanalyzer: <http://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
 - ≤ 4 nts; evitar estruturas na ponta 3'; $\Delta G > -9$ kcal/mole

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

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 μ L: verificar amplificação
 - 25/50 μ L: 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:
 - Substância para aumento de densidade
 - Corante de alto peso molecular
 - Corante de baixo peso molecular
- 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” com fragmentos conhecidos

thermo
scientific

PRODUCT INFORMATION

Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix

Pub. No. MAN0013012

Rev. Date 12 February 2018 (Rev. C.00)

Components	#SM0331	#SM0332
GeneRuler DNA Ladder Mix, 0.5 µg/µL	250 (5 x 50) µg (for 500 applications)	1250 (25 x 50) µg (for 2500 applications)
6X TriTrack DNA Loading Dye	2 x 1 mL	10 x 1 mL

Store at -25°C to -15°C

www.thermofisher.com

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Description

Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix is designed for sizing and approximate quantification of wide range double-stranded DNA on agarose gel. The ladder is composed of 21 chromatography-purified DNA fragments (in base pairs): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, and 100. It contains three reference bands (3000, 1000 and 500 bp) for easy orientation.

The ladder is dissolved in TE buffer.

Storage Buffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA.

6X TriTrack DNA Loading Dye

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 0.15% orange G, 60% glycerol and 60 mM EDTA.

Protocol for Loading

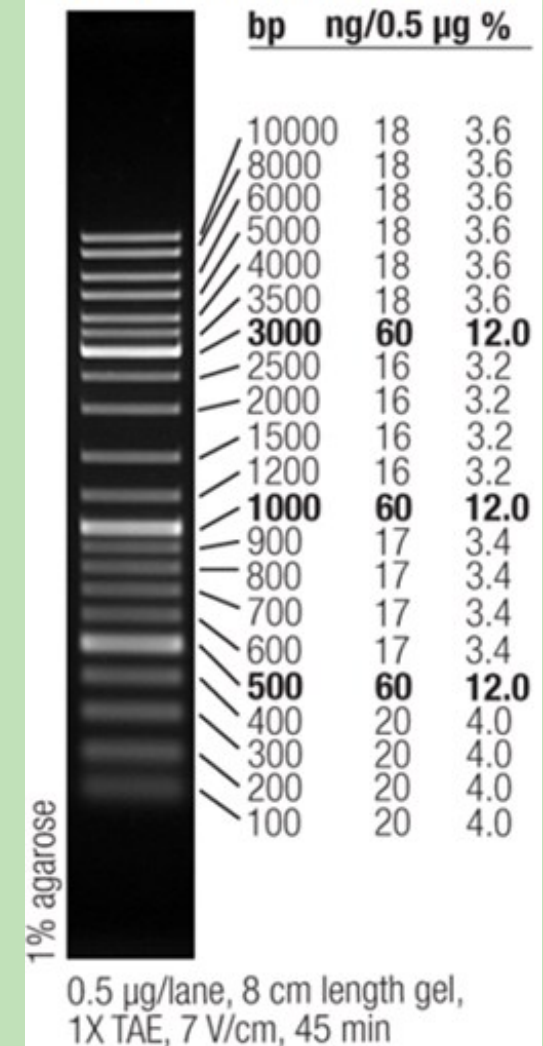
Loading mixture for the 5 mm agarose gel lane*:

DNA Ladder	1 µL
6X TriTrack DNA Loading Dye	1 µL
Deionized water	4 µL
	<hr/> 6 µL

Step 1: Mix gently

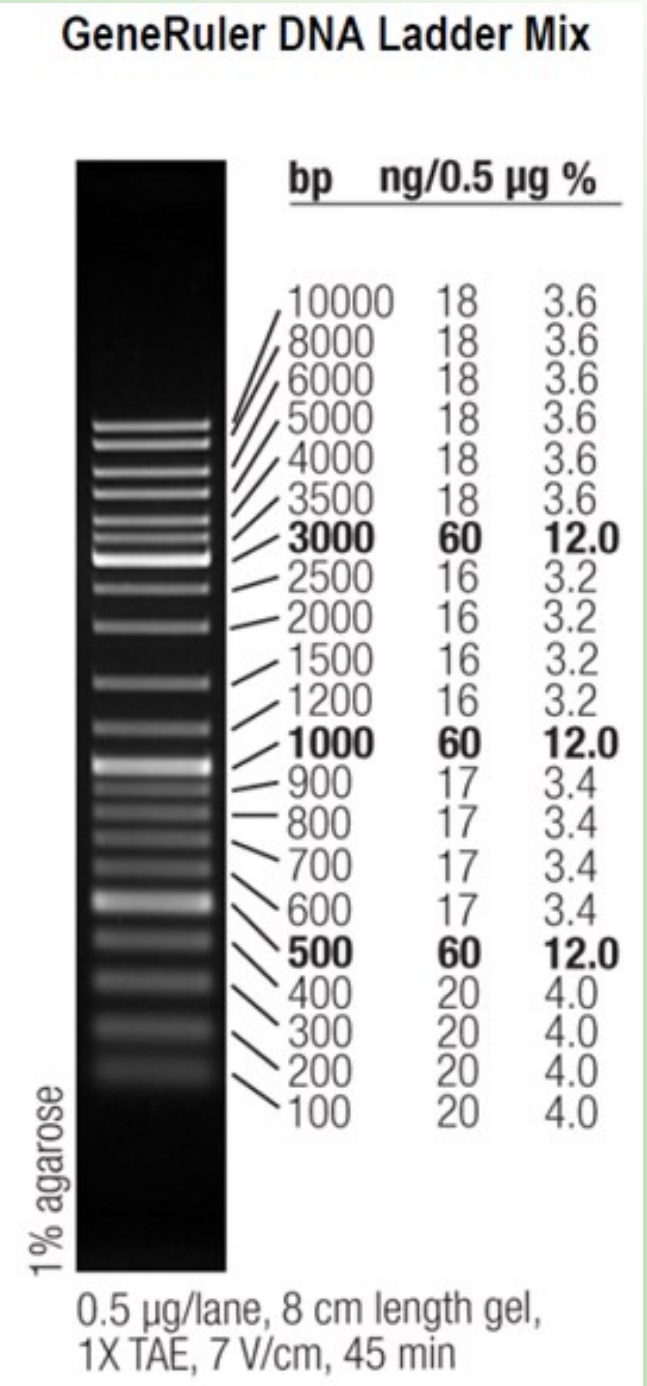
Step 2: Load on the gel

GeneRuler DNA Ladder Mix



Gel de Eletroforese

- 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.