

57. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

1. Concentrações iniciais dos reagentes necessários para realização de uma reação em cadeia da polimerase – PCR e variações recomendáveis. Deve-se salientar que a concentração de cada reagente deve ser padronizada em cada caso.

Reagente	Concentração/reação	Recomendáveis
<i>Taq polimerase</i> 5U/ μ l	1,25U	0,5 – 2.5U
<i>Buffer</i> 10X	1X	
<i>MgCl</i> ₂	2,5mM	0 – 5,0mM
<i>Primer Forward</i>	0,5 μ M	0,05 μ M – 1 μ M
<i>Primer Reverse</i>	0,5 μ M	0,05 μ M – 1 μ M
<i>dNTPs</i> 10mM	0,2 μ M	20 – 200 μ M
<i>DNA</i>	250ng	1 – 500ng
H ₂ O qsp	50 μ L	

2. Os reagentes necessários para uma PCR são: polimerase, tampão da polimerase, dNTPs, *primer forward* e *reverse*, cloreto de magnésio, DNA e água destilada e esterilizada. No entanto, em algumas situações há necessidade da adição de co-solventes.
3. Os co-solventes são indicados nos casos em que os templates possuem grandes quantidades de G-C, possuem estruturas secundárias complexas e estáveis, que podem interferir com a reação. Os solventes normalmente usados e suas variações nas concentrações são:
 - a. DMSO : 1-10%
 - b. Glicerol : 5-20%
 - c. Formamida : 1,25-10%
 - d. Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄: 15-30mM
 - e. Polietilenoglicol: 5-15%
4. Condições gerais de temperatura e tempo:

<i>Estádio</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Finalidade</i>
<i>1</i>	92 – 95°C	2 – 5 minutos	Denaturação
	90 – 98°C	10 segundos a 1 minuto	Denaturação
<i>2</i>	55 - 70°C	30 segundos a 1 minuto	Anelamento
	70 – 72°C	1minuto/kb de produto*	Extensão
<i>3</i>	72°C	5 – 10minutos	Extensão final
<i>4</i>	4°C	Infinito	Manutenção

*recomenda-se 1 minuto para cada kilobase de produto, ou seja, para um produto de 500bp recomenda-se 30 segundos e 45 segundos para um produto de 750bp.

57.1 *Diluição de primers*

1. Geralmente os *primers* são enviados pelo fabricante na forma liofilizada. Nessa forma podem ser armazenados a temperatura ambiente durante semanas.
2. Após o recebimento no laboratório recomenda-se a sua ressuspensão com água bidestilada e estéril. Para ressuspender os *primers* utilize H₂O bi-destilada estéril ou TE e armazene à -20°C.
3. Nunca trabalhe com *primers* e DNA simultaneamente, a contaminação inadvertida dos *primers* com DNA irá inutilizá-los.
4. Inicialmente os *primers* devem ser diluídos em uma solução estoque de 500µM, que será mantida a -20°C e usada para preparar a solução de trabalho a 10µM.
5. Algumas informações importantes para o entendimento de como funciona a diluição dos *primers*.

- **Mole (mol)** = é definido como a unidade fundamental para se medir a quantidade de uma substância,

- **Molar (M)** = é definido como sendo um mol do soluto diluído em um litro da solução.

- Por definição uma solução a 50 μ M é o equivalente a 50 μ mol/L

6. Juntamente com os *primers* são enviadas algumas informações importantes e necessárias para a realização da diluição. Antes de iniciar a diluição observe essas informações, pois será com base nelas que os cálculos dos volumes serão realizados. As informações que devem ser mantidas e observadas são: “OD’s, μ g’s e nmoles”
7. Sempre armazene as informações (nome do *primer*, sequência, concentração, região alvo, diluição, etc...) em uma mesma pasta de registro comum do laboratório.
8. Prepare sempre as soluções estoque e de trabalho da mesma forma, assim sempre que alguém for utilizar os *primers* saberá qual é a concentração. No caso de optar por uma diluição diferente lembre-se de anotar em algum lugar visível e fácil de encontrar.

Exemplo: *Primer* BHV-1 gC.

- Sequência: CTT CGG TCG ACA CGGTCT TCA

- OD’s = 19,48 ; μ g’s = 563,03 ; nmoles = 51,2

Cálculo da **Solução Estoque 500 μ M:**

$$\frac{[51.200\text{pmoles}]}{0.0512\mu\text{mol}} \times [1\mu\text{mol}/1.000.000\text{pmol}] =$$

- $0,0512\mu\text{mol}/X = 500\mu\text{mol}/1000\text{mL} = 0,1024\text{mL}$, ou seja, para obter uma concentração de 500 μ M será necessário ressuspender o *primer* liofilizado em 102,4 μ L de água estéril ou TE.

Simplificadamente:

- O valor de “nmoles” multiplicado por 2 será igual ao volume de água ou TE necessário para preparar uma solução de 500 μ M do *primer* em questão.

A partir desta solução prepare a solução de trabalho a 10 μ M, diluindo 1:50 (2 μ L + 98 μ L, ou 4 μ L + 196 μ L, ...), e utilize esta solução para as reações.

Cálculo da **Solução de Trabalho 10 μ M:**

- A concentração de *primer* recomendada para o PCR varia entre 0,1 μ M e 1 μ M para cada reação de PCR.
- Preparando uma solução de trabalho de 10 μ M, será necessário pipetar um volume entre 0,25 μ L e 2,5 μ L para 0,1 μ M e 1 μ M, respectivamente, para um volume total de 25 μ L/reação.
- Com base na concentração da solução estoque de 500 μ M prepare uma diluição de 1:50 para obter a concentração de 10 μ M, ou seja, 2 μ L da solução estoque + 98 μ L de água estéril = 100 μ L de Primer BHV-1 gE na concentração de 10 μ M.

Exemplos da concentração/volume de primer utilizado na reação, partindo de uma solução de trabalho de 10 μ M.:

Concentração em μ M	Concentração pmol/ μ L	Volume da reação		
		25 μ L	50 μ L	100 μ L
0,1 μ M	0,1pmol/ μ L	0,25 μ L	0,5 μ L	1,0 μ L
0,2 μ M	0,2pmol/ μ L	0,5 μ L	1,0 μ L	2,0 μ L
0,5 μ M	0,5pmol/ μ L	1,25 μ L	2,5 μ L	5,0 μ L
0,7 μ M	0,7pmol/ μ L	1,75 μ L	3,5 μ L	7,0 μ L
1,0 μ M	1,0pmol/ μ L	2,5 μ L	5,0 μ L	10,0 μ L

57.2 Preparação de gel de agarose com Gel Red

1. Pesar quantidade desejada de agarose e acrescentar o volume de tampão TAE (Tris-ácido acético-EDTA). Por exemplo, para um gel de agarose a 0,8%, necessita-se 0,8 gramas de agarose em 100mL de tampão.
2. Aquecer a mistura no microondas até a agarose dissolver por completo.

3. Transferir o gel para a cuba. Posicione o pente mais adequado para a quantidade de amostras a serem utilizadas. Aguarde solidificar.
4. Utilizando os próprios tubos de PCR, ou outra superfície delimitada, misture o produto da PCR com o *loading buffer* (tampão de corrida: 4 µL para 10 µL de produto de PCR) e o Gel Red (adicionar 2,5 µL de Gel Red para 10 µL do produto de PCR).
5. Reserve o primeiro poço do gel para carregar o Marcador de peso molecular (DNA ladder) (2,5 µL de Gel Red para 5 µL do marcador; não é necessário adicionar tampão de corrida).
6. Carregue as amostras no gel. Adicione também o marcador de peso molecular, pois este será o indicador do tamanho do produto da PCR.
7. Visualizar o resultado da eletroforese sobre luz UV.
8. Após a eletroforese, despreze o gel no recipiente identificado para essa finalidade. Nunca dissolva e reutilize gel.

Reagentes e Soluções:

1. Tampão de corrida

Reagentes	Quantidades
Bromofenol (0,25%)	0,075g
Glicerol (30%)	9ml
H ₂ O	21 ml

2. Gel Red - solução de trabalho 1:500
1 µL Gel Red -----499 µL de água estéril

57.3 Purificação de produto de PCR com fenol/clorofórmio

1. Dispense em um microtubo o produto do PCR, e adicione o mesmo volume de fenol/clorofórmio.
2. Misture cuidadosamente os reagentes através da inversão do tubo,

3. Centrifugue a mistura a 14.000 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente,
4. Com auxílio de uma pipeta, transfira a fase aquosa para um novo tubo,
5. Adicione um volume igual de clorofórmio,
6. Misture cuidadosamente,
7. Transfira a fase aquosa para um novo tubo,
8. Adicione 1/10 do volume de acetato de potássio 3M e 2,5 x de etanol 100%,
9. Incube 20 minutos a -20°C,
10. Centrifugue 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C
11. Adicione 250µL de etanol 70%, centrifugue a 14.000 rpm por 2 minutos a 4°C,
12. Cuidadosamente remova o sobrenadante e ressuspensa o *pellet* com H₂O ou TE.