



Universidade Federal Fluminense
Instituto Biomédico
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Disciplina: **Virologia**

Apostila de aula prática

REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi criada em 1987 por Mullis e Fallona e desde então tem revolucionado a genética molecular. Ela possibilita a produção de um enorme número de cópias da seqüência **específica** de um DNA, explorando certas características do processo de replicação do DNA.

A DNA polimerase é uma enzima que usa o DNA de fita única como molde para a síntese de uma nova fita complementar. Este molde de DNA de fita simples pode ser produzido pelo aquecimento a temperaturas próximas da ebulição. A DNA polimerase também requer uma pequena porção de DNA de fita dupla para o início de sua síntese. São os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Sendo assim, o ponto inicial para a síntese de DNA pode ser determinado pelo fornecimento de um oligonucleotídeo iniciador que se liga ao molde naquele ponto. Esta é a primeira característica importante da PCR: a DNA polimerase pode ser direcionada para sintetizar uma região específica do DNA.

As duas fitas podem servir como molde para a síntese, desde que se forneça um oligonucleotídeo iniciador para cada fita. Os *primers* escolhidos irão demarcar a região do DNA que deve ser amplificada, de forma que novas fitas de DNA sejam sintetizadas, iniciadas a partir de cada *primer* e irão se estender além da posição do *primer* da fita oposta. Portanto, novos sítios de ligação dos *primers* são gerados para cada nova fita de DNA sintetizada. A mistura de reação é novamente aquecida para se separarem as fitas novas e as originais disponíveis, para posteriores ciclos de hibridização com *primers*, síntese de DNA e separação das fitas.

O resultado final da PCR é encontrado ao término de **n** ciclos e a reação contém o valor máximo de 2^n moléculas de DNA de fita dupla, que são cópias de seqüências de DNA entre os *primers*. Então, a segunda característica importante da PCR: ela resulta na amplificação de uma região específica de DNA.

(A) Extração do DNA viral a partir de amostras fecais:

A fim de se realizar as técnicas de detecção do ácido nucleico viral na amostra clínica para o diagnóstico de uma virose, inicialmente é necessário realizar a extração do genoma viral da amostra clínica (soro, aspirado de nasofaringe, urina, fezes, liquor, tecido). Existem várias técnicas de extração de genoma dependendo do tipo de amostra clínica e do ácido nucleico viral que se deseja pesquisar. Para alguns materiais é necessário a digestão com proteases (proteínase K) e extração com fenol/clofoformio (desnaturantes de proteínas). Isotiocianato de guanidina e sílica podem ser usados para a extração de RNA, e como o RNA é mais sensível que DNA, deve-se adicionar ao material extraído inibidores de ribonuclease.

(B) Reação de PCR:

A PCR se baseia na amplificação de uma determinada sequência de ácido nucleico. Após a extração do genoma viral da amostra clínica, este é adicionado à mistura de reação que contém: H₂O, dNTPs (mistura de nucleotídeos), 1 par de *primers* (iniciadores), cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão da enzima e a enzima Taq polimerase (DNA polimerase termoestável derivada da bactéria *Thermus aquaticus*). A seguir, a mistura da reação é colocada em um termociclador e procede-se a PCR que é constituída de vários ciclos (30-40 ciclos).

Cada ciclo da PCR é dividido em 3 fases:

• Desnaturação	conversão do DNA dupla fita em simples fita	≅ 95°C	30 seg – 1 min
• Anelamento	ligação dos <i>primers</i> às fitas complementares do DNA	≅ 55°C	30 seg – 2 min
• Extensão	Taq polimerase sintetiza uma fita complementar de DNA	≅ 72°C	30 seg – 2 min

Os *primers* (iniciadores) são pequenas sequências de 20-30 nucleotídeos complementares a uma determinada sequência do ácido nucleico viral. Os *primers* é que determinam a sequência de ácido nucleico a ser amplificada, por isso é necessário na reação a utilização de 1 par de *primer*: o *primer* sense (PS) que se liga a fita antisense (3'-5') e o *primer* antisense (PAS) que se liga a fita sense (5'-3'). Partindo de uma fita de DNA, ao final de um ciclo serão 4 fitas. Cada fita será usada como molde para a síntese de uma fita complementar sendo que ao final do 2º ciclo serão 8 fitas, de modo que a sequência de DNA seja amplificada exponencialmente. Na prática ao final de uma reação de PCR se produz 10⁷ a 10⁸ cópias do genoma viral.

Procedimentos Gerais:

Cuidados a serem tomados ⇒ Problemas da PCR: Contaminação

A reação de amplificação do ácido nucleico é altamente sensível e por isso resultados falso-positivos podem ocorrer resultante da contaminação da reação com ácidos nucleicos exógenos. A fonte dos ácidos nucleicos contaminantes pode ser o produto amplificado em uma reação anterior ou ácidos nucleicos presentes em um espécime diferente. A prevenção da contaminação pode ser realizada através de várias maneiras:

- Usar sempre luvas e trocá-las constantemente
- Nunca usar a mesma ponteira para pipetar soluções diferentes
- Usar sempre ponteiras e tubos Eppendorf novos.
- Se possível, ter um conjunto de pipetas automáticas só para os reagentes de PCR e um só para as amostras.
- Utilizar sempre água autoclavada e deionizada e dedicar seu uso ao PCR.
- Uso de ponteiras contendo algodão para bloquear a produção de aerossóis,
- Irradiação UV dos componentes da reação (com exceção da Taq polimerase e *primers*)
- Uso de pequenas alíquotas
- Limpeza dos equipamentos e bancada com solução de hipoclorito de sódio a 10%
- Manter a máquina de PCR limpa.
- Incluir sempre **controles positivo e negativo**.
- Centrifugar rapidamente os tubos ao terminar de preparar a mistura da reação.

- Separação física do laboratório em seções onde:
 - (a) extração do genoma
 - (b) mistura da reação de PCR
 - (c) reação de amplificação (termociclador)
 - (d) detecção do produto amplificado (após a PCR o tubo só pode ser aberto na seção do laboratório para a detecção do produto).

Aula prática:

Reagentes:

- **Tampão 10X concentrado:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0 , 50mM KCl \Rightarrow mantém o pH ótimo para a reação - estocado a -20°C .
- **Solução de dNTP:** precursores das novas fitas do DNA específico \Rightarrow solução com os quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (deoxiadenosina, deoxitimidina, deoxicitidina, deoxiguanosina, na concentração de 20 a $200\mu\text{M}$ de cada dNTP). Esta solução pode ser preparada segundo as especificações do fabricante e estocada a -20°C .
- **Cloreto de Magnésio (MgCl_2):** otimiza a atividade da Taq polimerase. Concentração: 0,5 a 2,5 mM. Estocado a -20°C .
- **Oligonucleotídeos iniciadores ou primers:** sintetizados por fabricante a pedido do pesquisador (liofilizado) e normalmente tem de 18 a 28 nucleotídeos. Concentração de 0,1 a $0,5\mu\text{M}$. Aliquotado e estocado a -20°C .
- **Taq polimerase:** é uma DNA polimerase \Rightarrow Extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, que vive em água com temperatura de 75°C . Estocada a -20°C . A concentração varia de 1 a 2,5U.
- **Água autoclavada e deionizada:** completa o volume final da reação

Execução da técnica:

Em uma sala limpa:

- Determinar o número total de reações a serem executadas. Preparar a mistura da reação (mix) contando um tubo a mais. Incluir ao menos uma reação sem DNA (água no lugar da amostra).
- Identificar os tubos da reação ($200\mu\text{l}$): controle positivo (1), controle negativo (2), amostra (3), H_2O (4).
- Em um tubo eppendorf $1,5\mu\text{l}$: preparar a mistura de reação (água, tampão, dNTPs, primers e enzima) de acordo com o esquema abaixo:

	Concentração final	Volume / reação	4 tubos \Rightarrow preparar o mix para 5 reações
H_2O		30 μl	150 μl
10 x buffer	1X	5 μl	25 μl
MgCl_2 50mM	1,5 mM	1,0 μl	5 μl
dNTP 10mM	0,2mM	1 μl	5 μl
Primer Sense (S)	20 pM	1,0 μl	5 μl
Primer Antisense (AS)	20 pM	1,0 μl	5 μl
Taq polimerase (5u/ μl)	1u/ μl	1.0 μl	5 μl
Total		40 μl	200 μl

- Distribuir 40 μl da mistura de reação a cada tubo identificado com o número da amostra a ser testada.

Na sala de extração:

- Colocar 10 μ l da amostra em cada tubo contendo a mistura de reação.
- Colocar no termociclador para a execução de 35 ciclos da reação de amplificação de acordo com o esquema:

	Temperatura	Tempo	Efeito
	95° C	30 seg	Desnaturação das fitas de DNA
35 ciclos	55° C	30 seg	Hibridização (pareamento) dos <i>primers</i>
	72° C	30 seg	Extensão (síntese de fitas de DNA complementares)

Esse processo demora aproximadamente 2 hs.

(C) Detecção do produto da PCR: Eletroforese em gel de agarose

O produto da reação de PCR pode ser visualizado através da eletroforese em gel de agarose ou policrilamida. A eletroforese é uma técnica em que proteínas ou ácidos nucleicos podem ser separados por tamanho e carga. No caso da PCR, o produto da reação é aplicado em um gel de agarose e sob efeito da corrente elétrica, migra para o polo positivo (ânodo) já que o DNA tem carga negativa, e os fragmentos de DNA podem ser separados de acordo com o tamanho, sendo que as moléculas maiores migram mais lentamente que as menores. O ácido nucleico sendo negativamente carregado migra para o polo positivo (ânodo).

Após a corrida do gel, o produto pode ser visualizado pela coloração com brometo de etídeo, um corante fluorescente que se intercala entre as fitas da dupla hélice de DNA. O DNA pode ser revelado colocando-se o gel no transiluminador pois após coloração com brometo de etídeo o DNA fluoresce quando exposto à luz ultravioleta (UV).