

# Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Profa. Dra. Aline Maria da Silva  
Instituto de Química- USP

## Bibliografia:

Recombinant DNA - James Watson & Michael Gilman

Guia de Rotas na Tecnologia do Gene - Matthew Walker & Ralph Rapley

Biologia Molecular Básica-Arnaldo Zaha

# Reação em cadeia da polimerase (PCR)

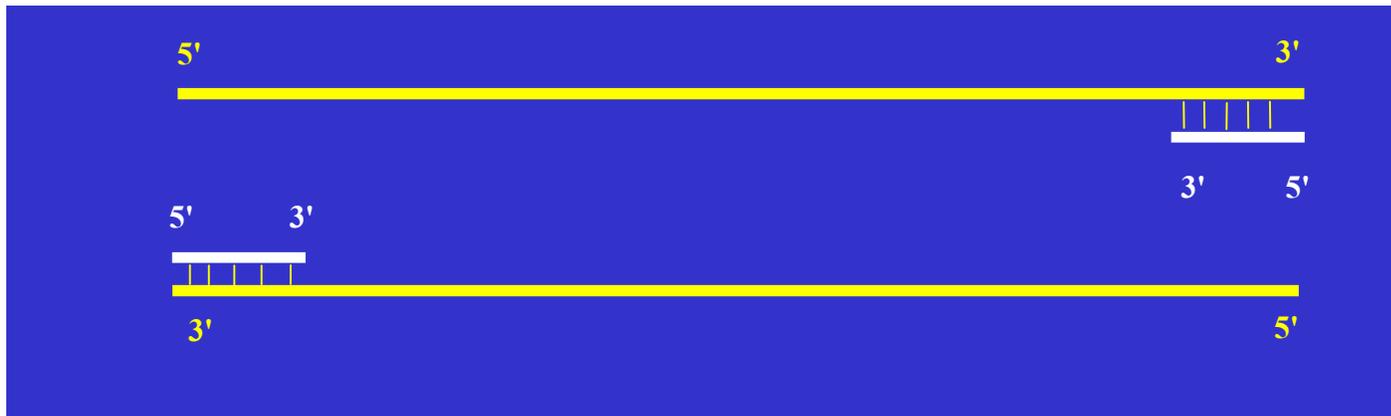
- Desenvolvida por Kary Mullis em 1983
- Revolucionou a biologia molecular
- Um método *in vitro* rápido, sensível e versátil para amplificação seletiva de seqüências definidas de DNA (ou RNA) a partir de um amostras complexas de ácidos nucleicos
- Gera quantidade de DNA suficiente para manipulação e análises subsequentes

# Aplicações da PCR

- Clonagem de genes ou segmentos de genes da mesma espécie (parálogos) ou de espécies distintas (ortólogos)
- Mutagênese dirigida para estudos de função de proteínas ou sequências regulatórias
- Diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas
- Identificação de indivíduos (teste de paternidade)
- Detecção de contaminação por bactérias, vírus ou fungos
- Quantificar diferenças na expressão de genes (RT-PCR)

## Como funciona a PCR:

- Requer a ligação de pequenas sequências de DNA (oligonucleotídeos, primers) a sequências complementares que flanqueiam a região alvo a ser amplificada
- Requer a ação da enzima DNA polimerase para sintetizar novas cópias idênticas a região alvo a ser amplificada



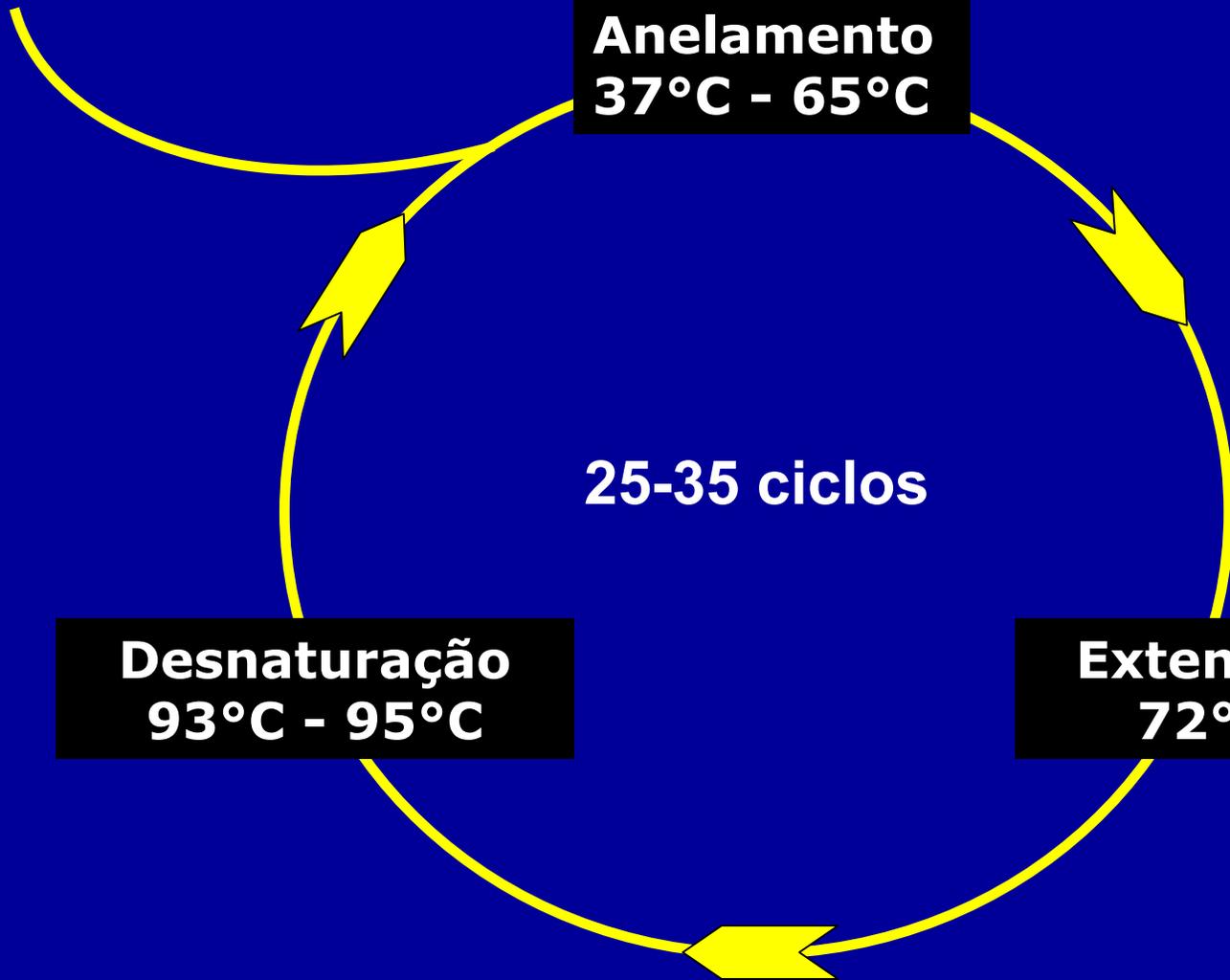
**Desnaturação**  
**93°C - 95°C**

**Anelamento**  
**37°C - 65°C**

**25-35 ciclos**

**Desnaturação**  
**93°C - 95°C**

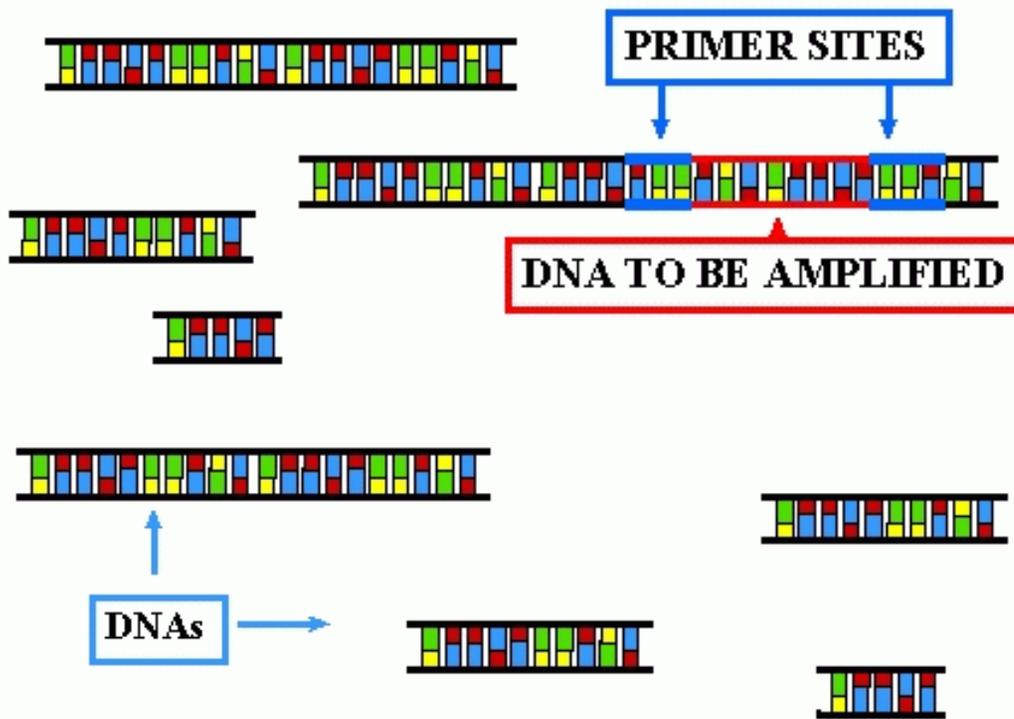
**Extensão**  
**72°C**



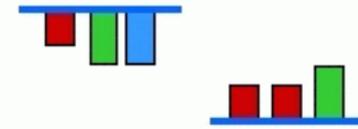
## Cada ciclo da PCR tem três etapas:

1. Desnaturação                      93°C - 95°C                      30 secs - 1min
2. Anelamento                      37°C - 65°C                      30 secs - 1min  
*depende da T<sub>m</sub> do primer*
3. Extensão/Polimerização                      72°C                      1min  
**(+ 30secs per 500bp DNA)**

# Para PCR:



## Primers



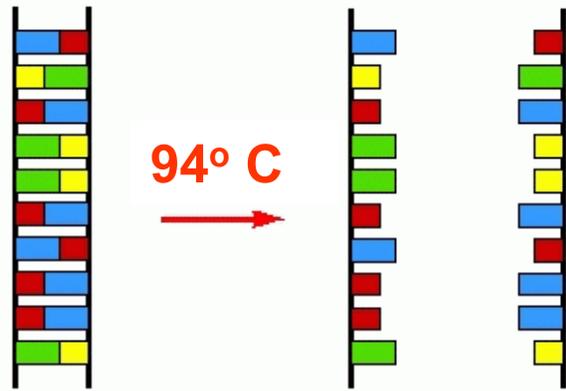
dNTPs, tampão,  $MgCl_2$

**Taq DNA polimerase**

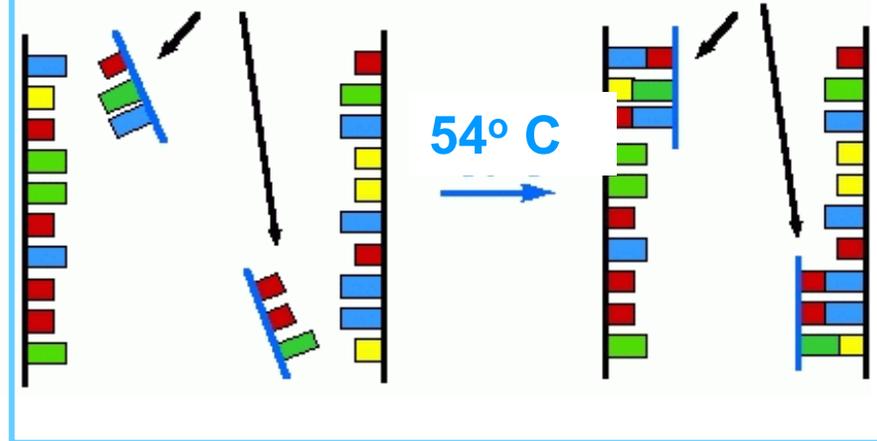


**Enzima Termoestável!!!!**

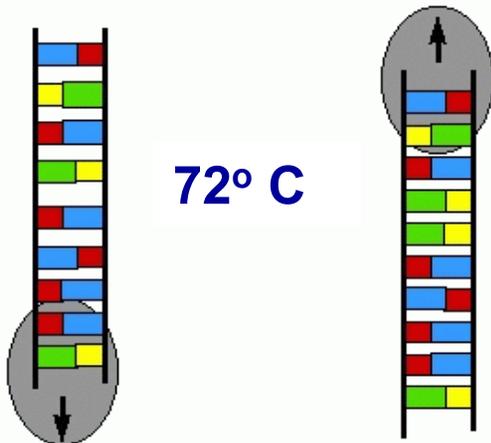
## Desnaturação do molde



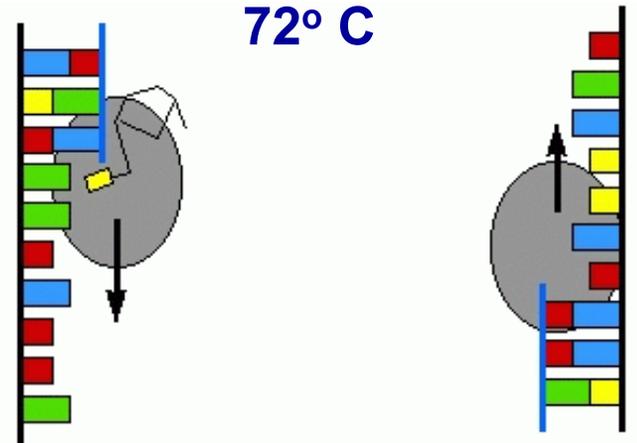
## Anelamento dos primers



## Término da polimerização



## Extensão/Polimerização



# CICLOS

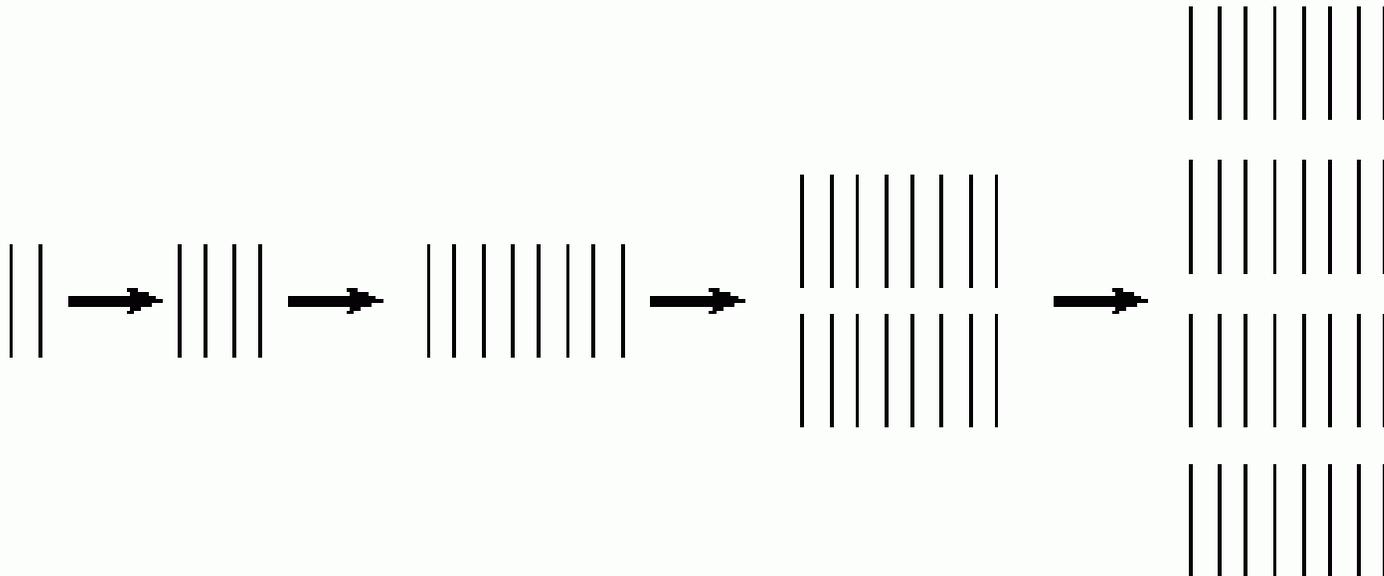
1

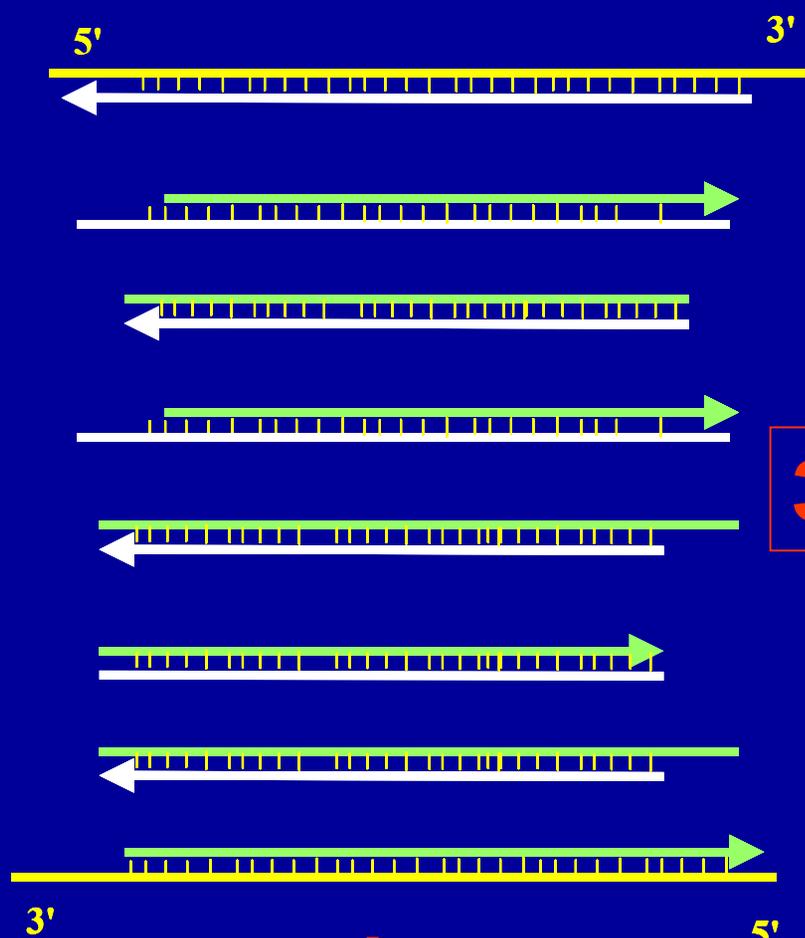
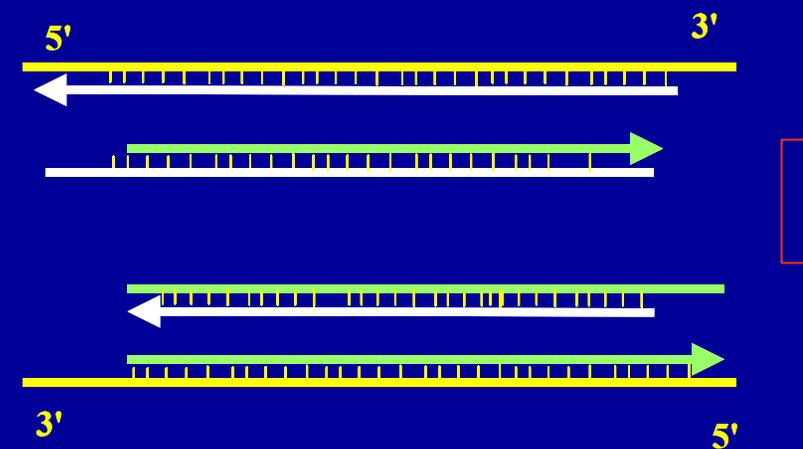
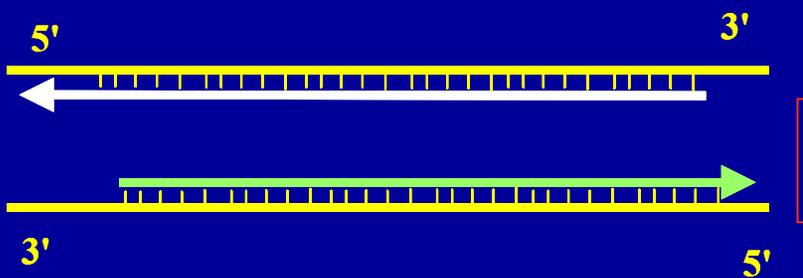
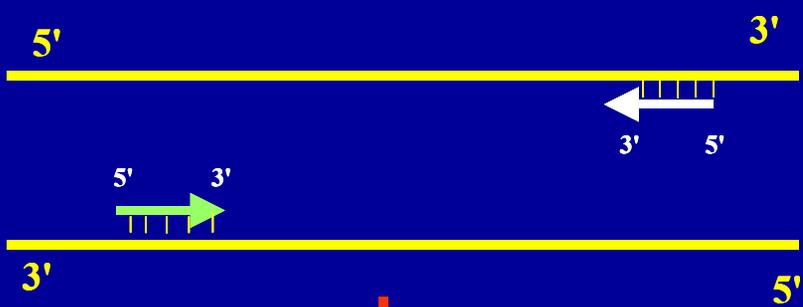
2

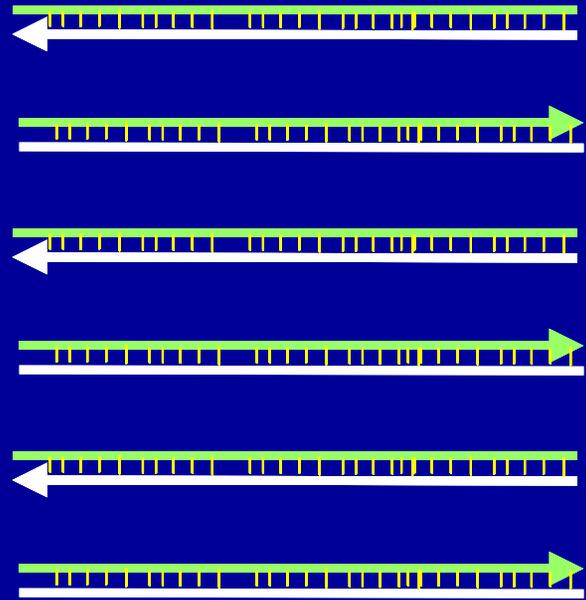
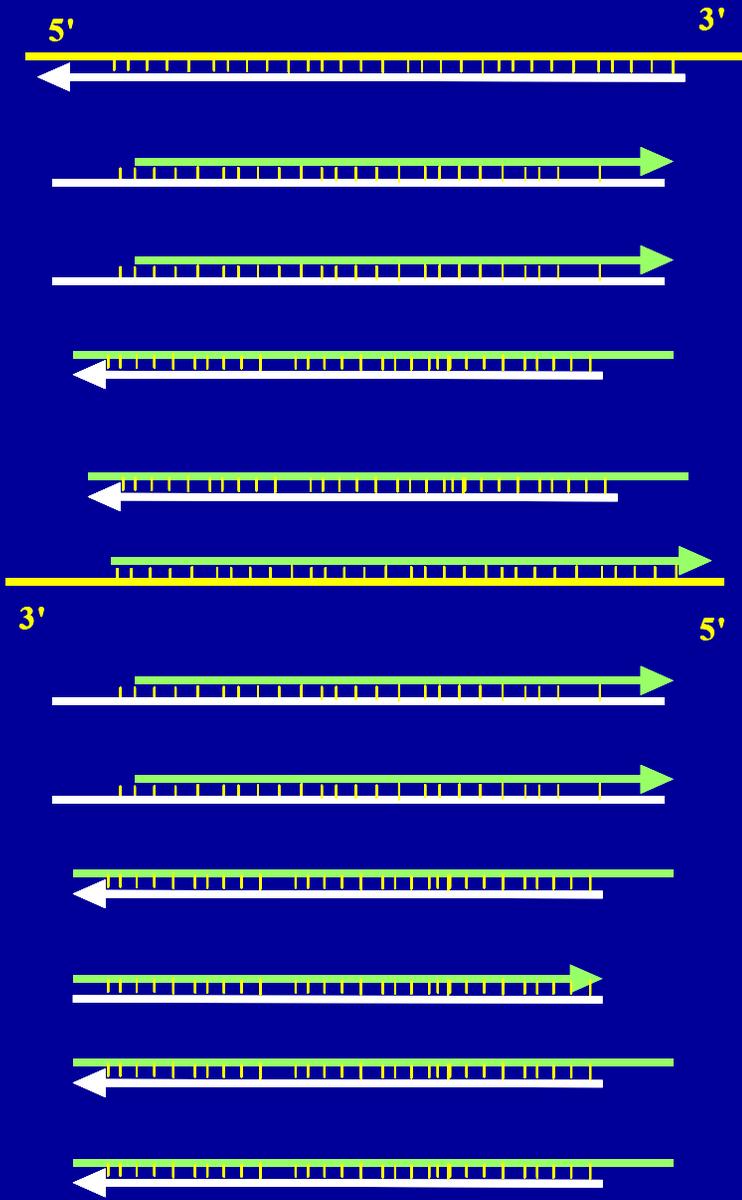
3

4

5







4

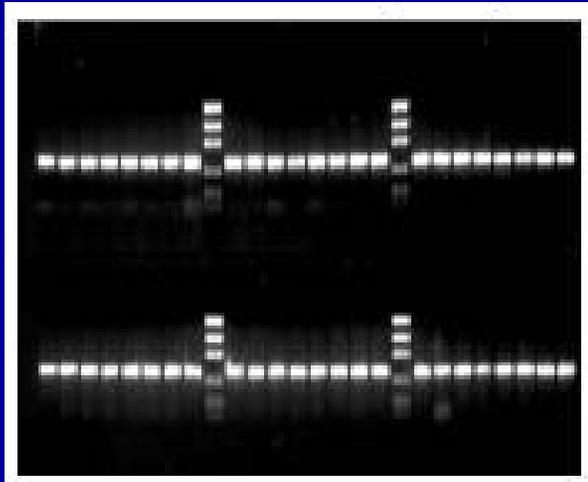
Termocilador



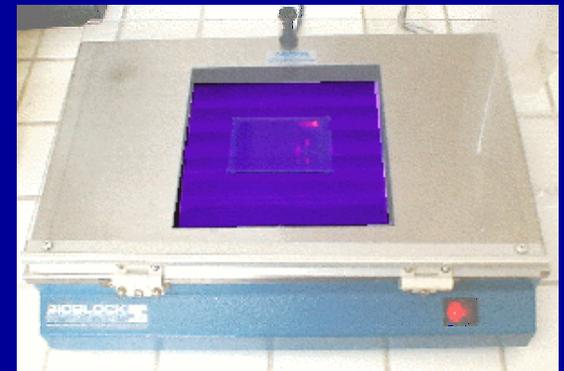
Eletroforese em gel de agarose



3-4 horas



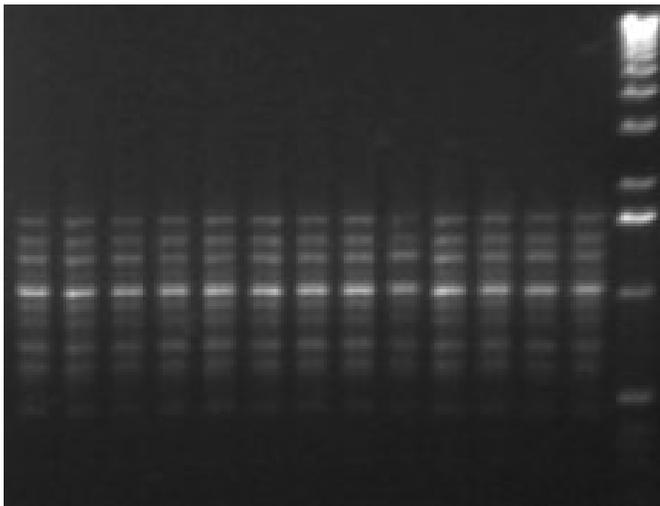
Produto final



Visualização com luz UV



- A técnica de PCR é muito sensível.
- Contaminação é um problema frequente
- Fazer sempre controles positivo e negativo



- Otimizar a reação para cada par de primers

A enzima Taq polimerase deixa A na extremidade do produto de PCR: Estratégia para clonagem do produto de PCR

