

# Sequenciamento de DNA e PCR

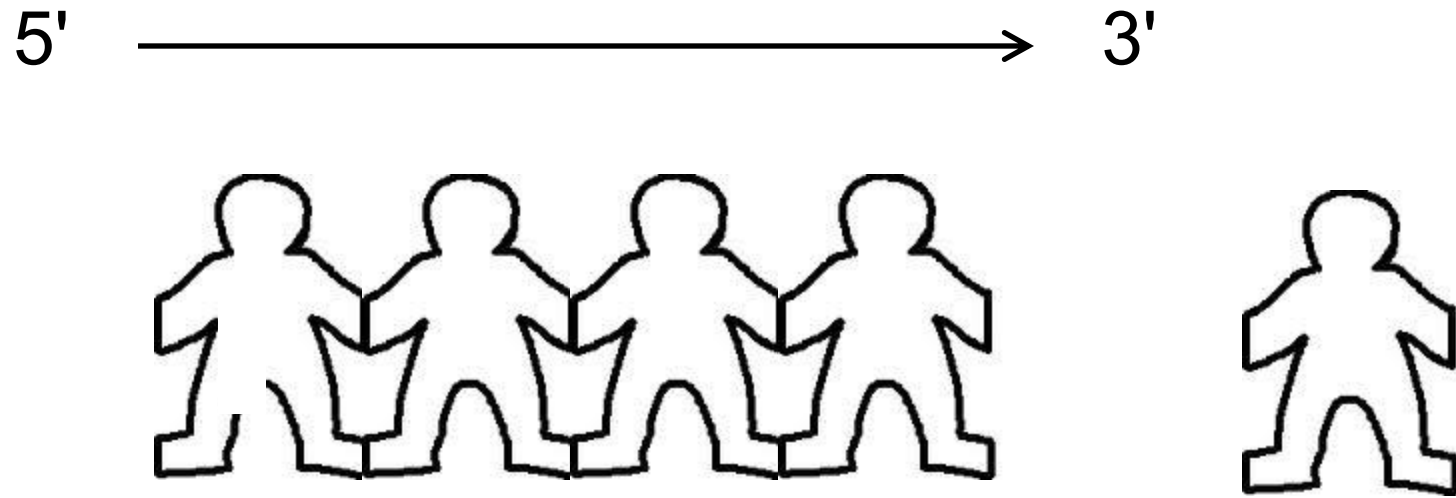
QBQ 102 – Aula 6 (biomol)

*Prof. João Carlos Setubal*

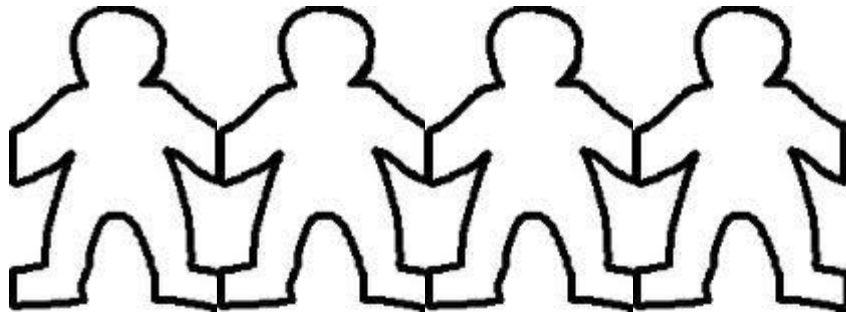


Universidade de São Paulo  
**Instituto de Química**

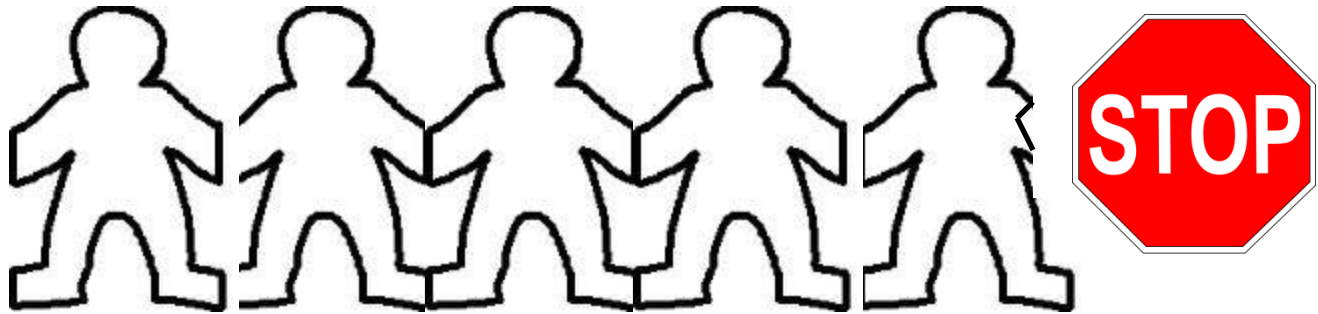
# Replicação de DNA

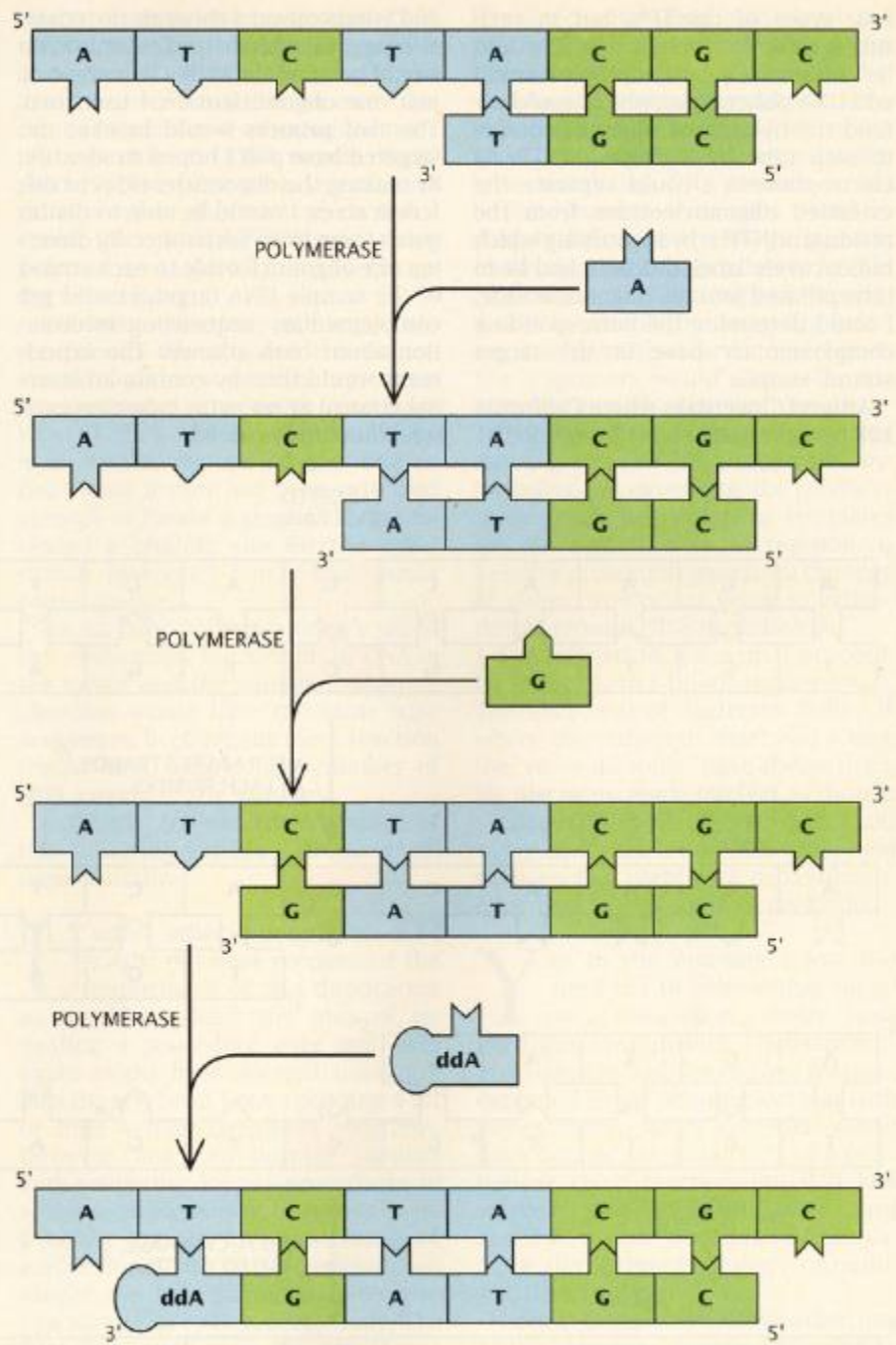


Se um dos nucleotídeos for  
“defeituoso” ...



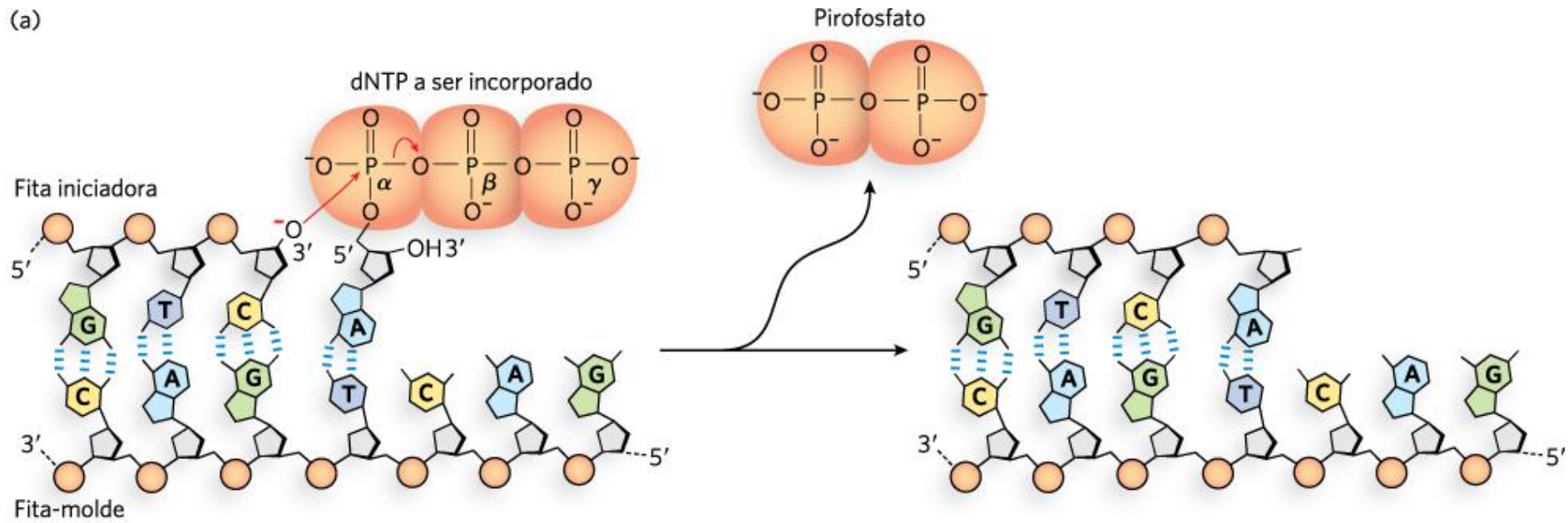
# A replicação pára



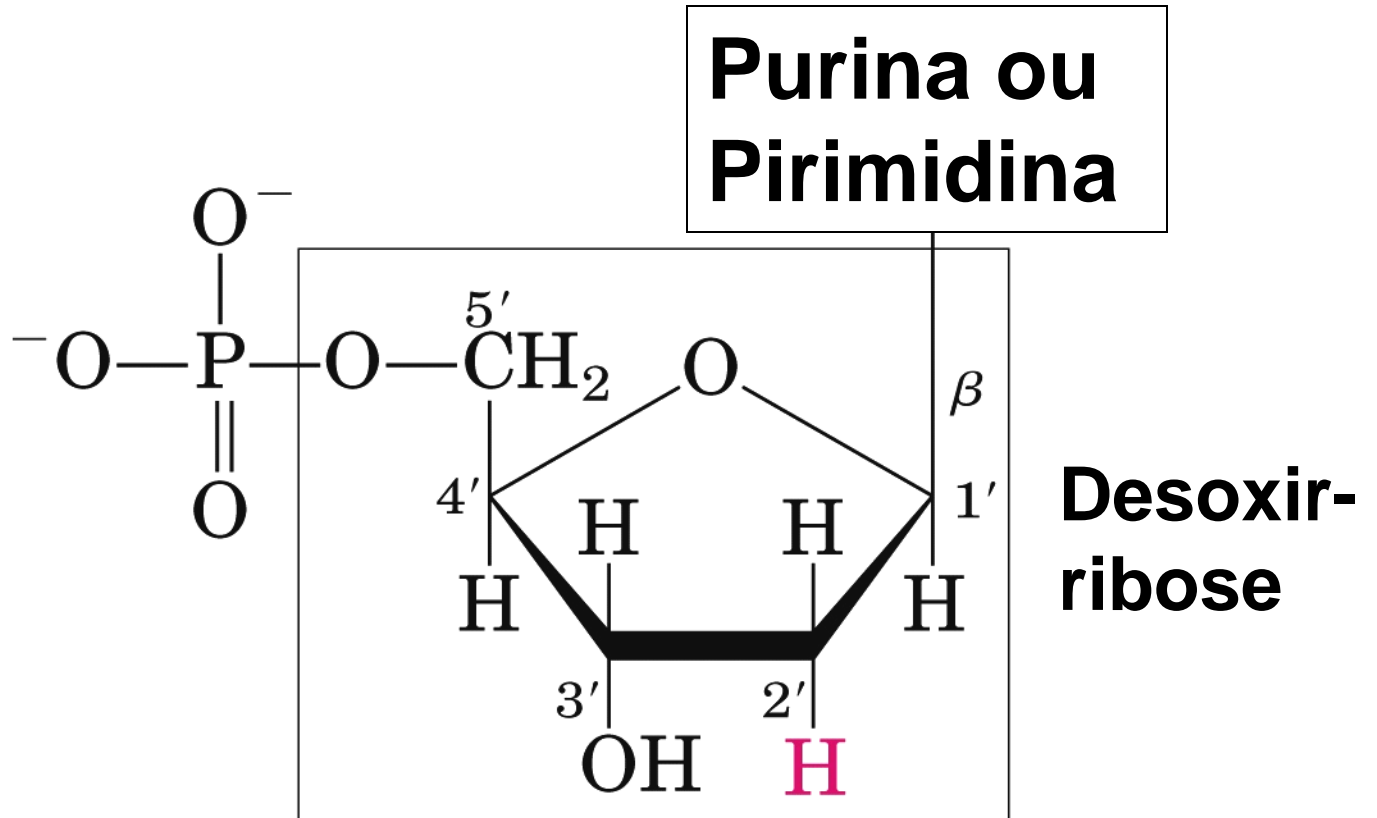


# Reação da DNA Polimerase com dNTPs → síntese de DNA

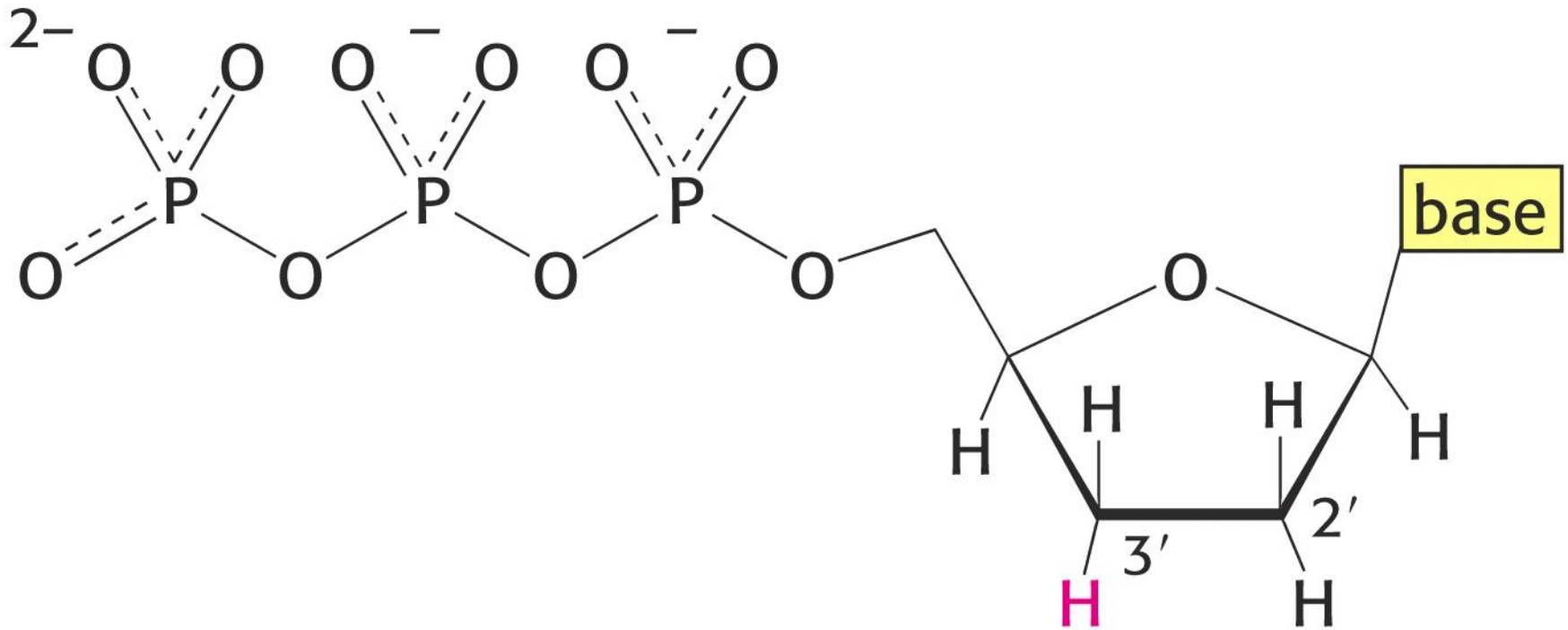
(a)



**Fosfato**



**Desoxirribonucleotídeo**

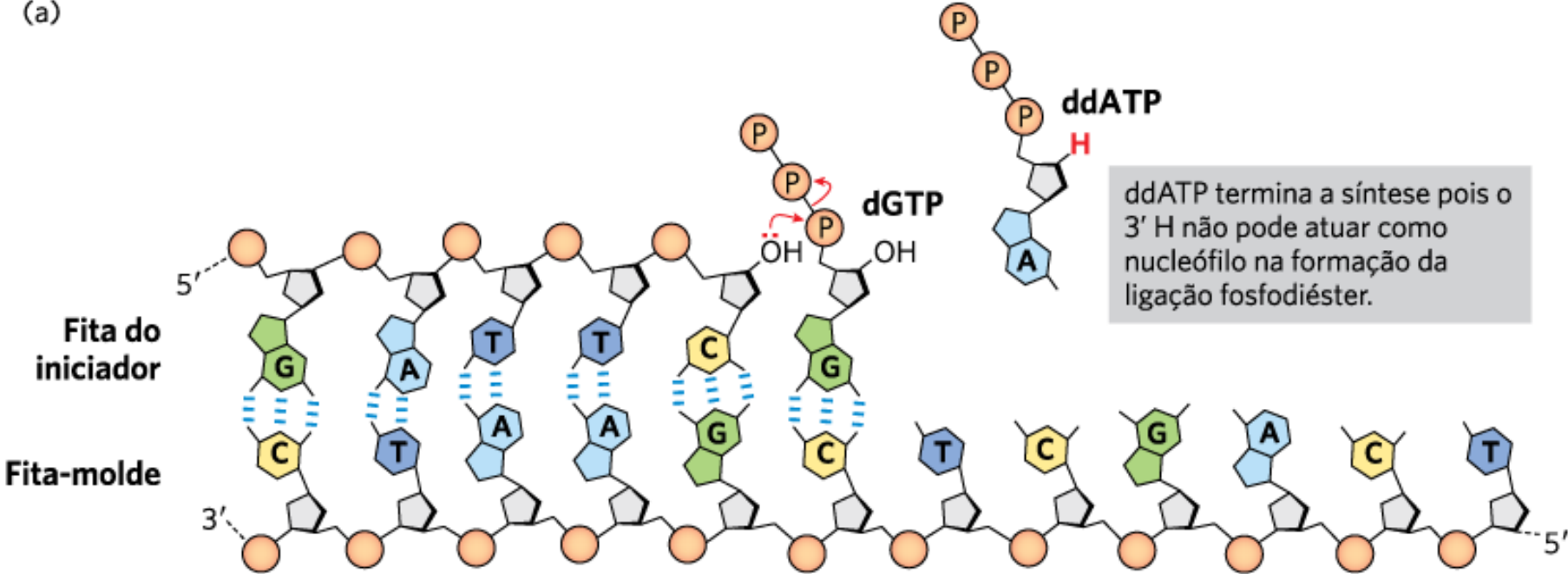


**2', 3' dideoxirribonucleotídeo  
trifosfato (ddNTP)**



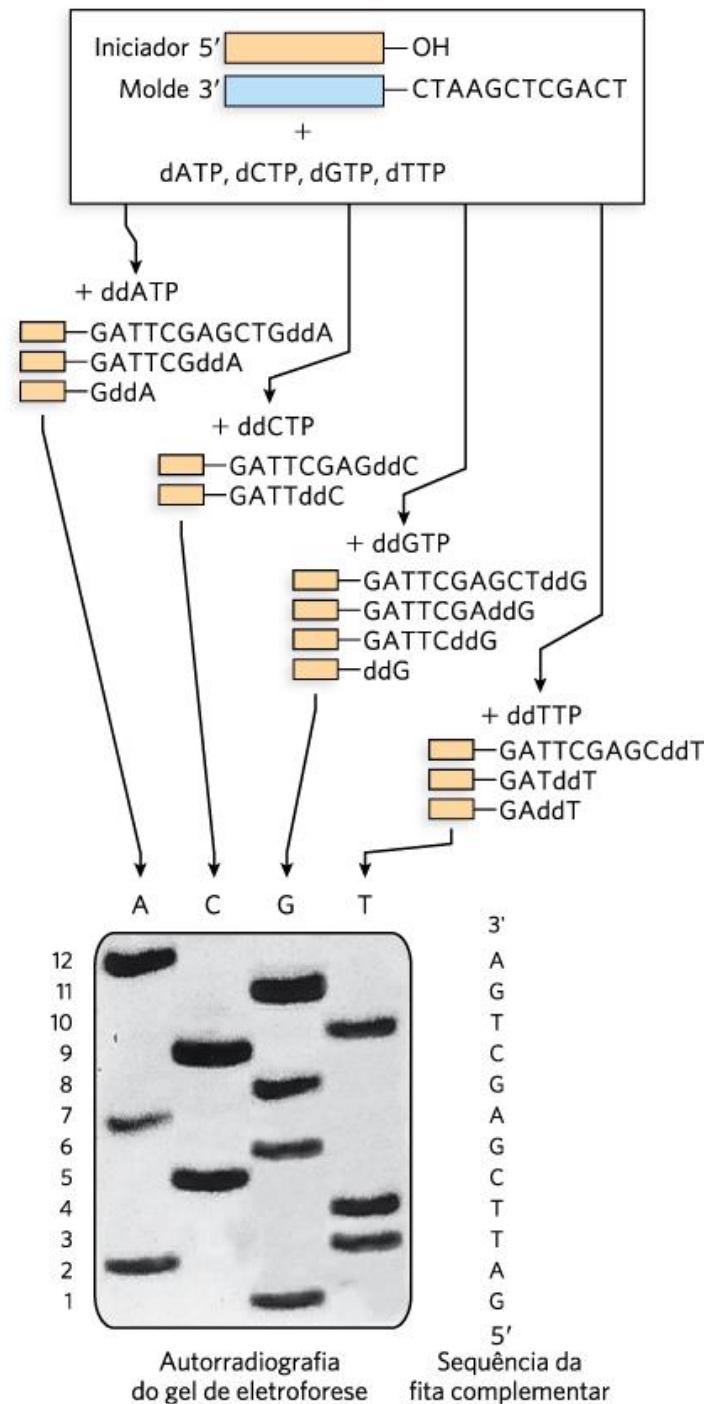
# Reação da DNA Polimerase com dNTPs + ddNTPs → interrupção da síntese de DNA

(a)



# Método de Sanger:

terminação controlada da síntese de DNA com didesoxirribonucleotídeos



## DNA a ser sequenciado

3' — GAATTCGCTAATGC —  
5' — CTTAA

## primer radioativo

DNA polymerase I  
Labeled dATP, dTTP,  
dCTP, dGTP  
Dideoxy analog of dATP **ddATP**

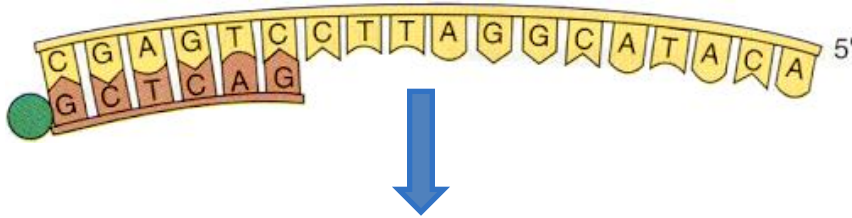
3' — GAATTCGCTAATGC —  
5' — CTTAAGCGATTA

+

3' — GAATTCGCTAATGC —  
5' — CTTAAGCGA

Novas cadeias de DNA serão separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com resolução para separar fragmentos de DNA com 1 nucleotídeo de diferença

# Método de Sanger

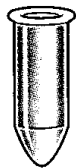


**Desnaturação da dupla fita  
Anelamento do "primer radioativo"**

dNTP's and DNA polymerase

**Adição da enzima e dNTPs**

+ddA



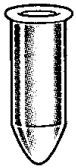
+ddG



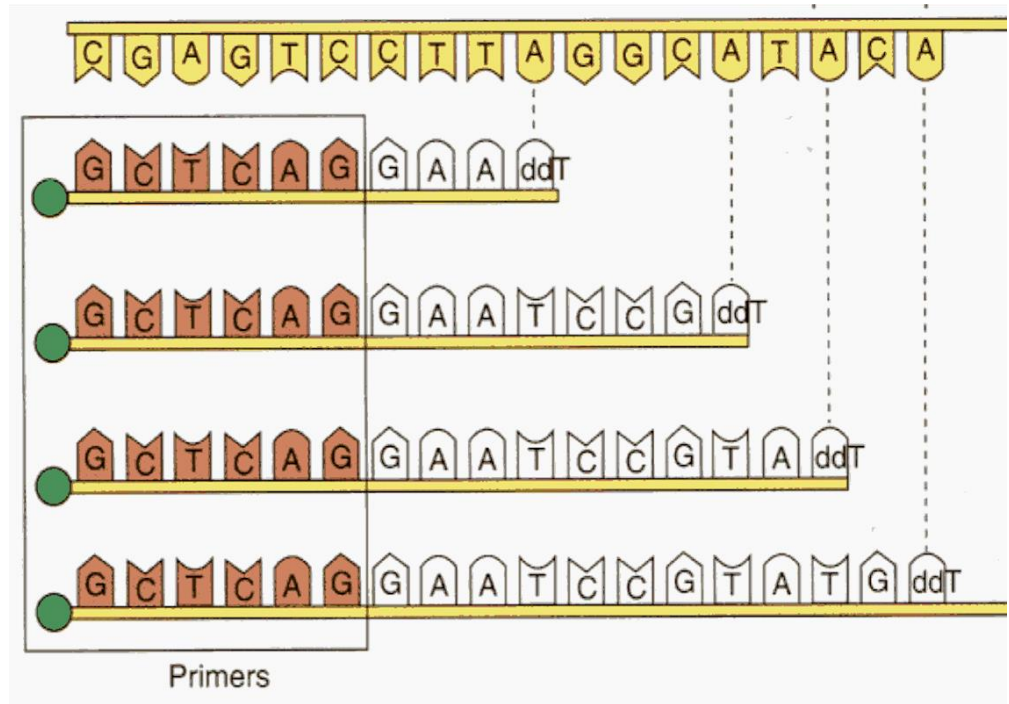
+ddC



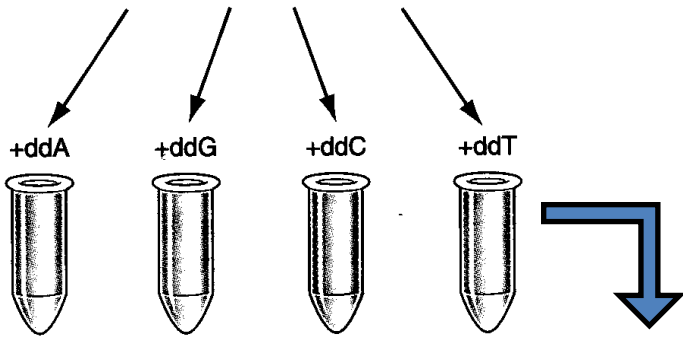
+ddT



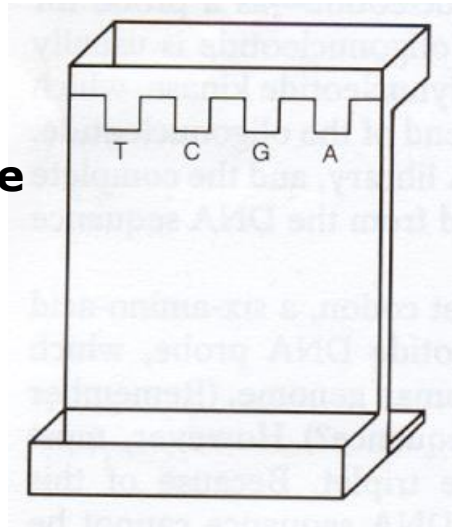
**Terminação da síntese: adição dos  
ddNTPs**



dNTP's and DNA polymerase

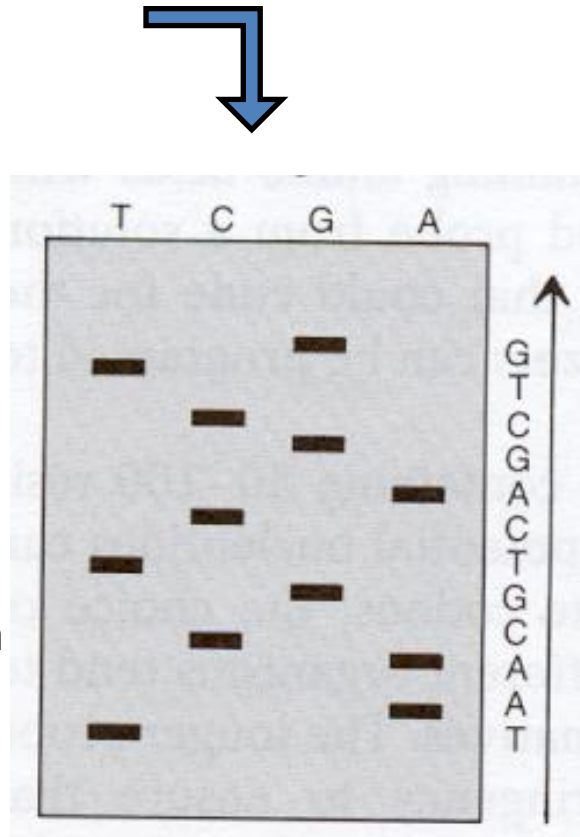


**Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante**



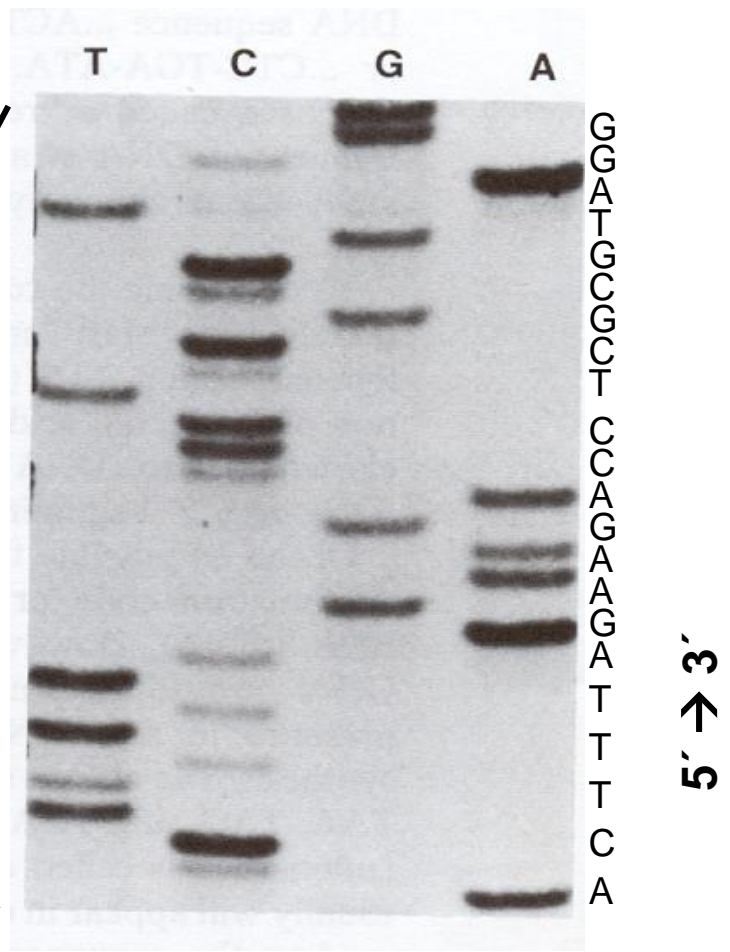
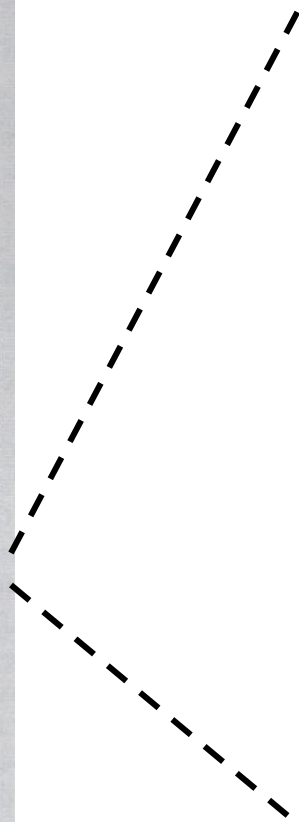
**Autorradiografia**

Eletroforese em gel de poliacrilamida: separação de fragmentos de DNA diferindo por 1 nucleotídeo no tamanho

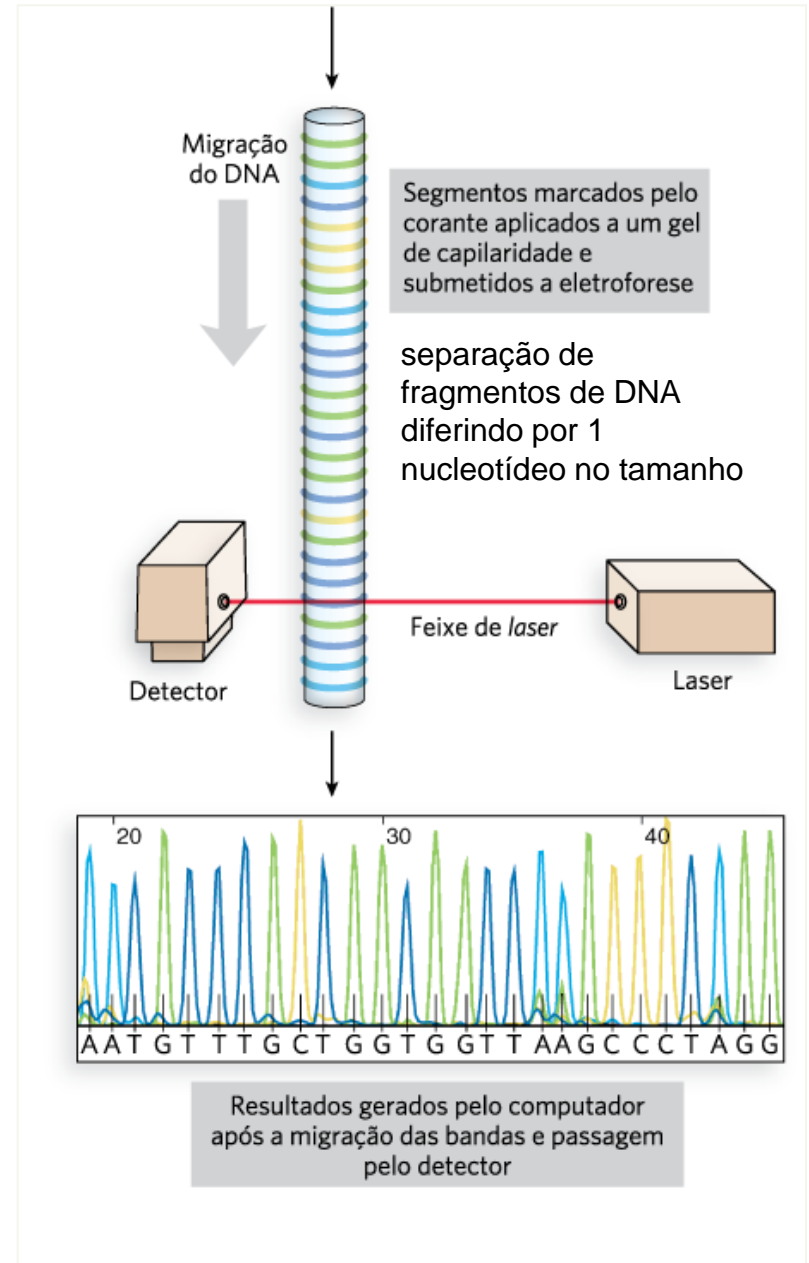
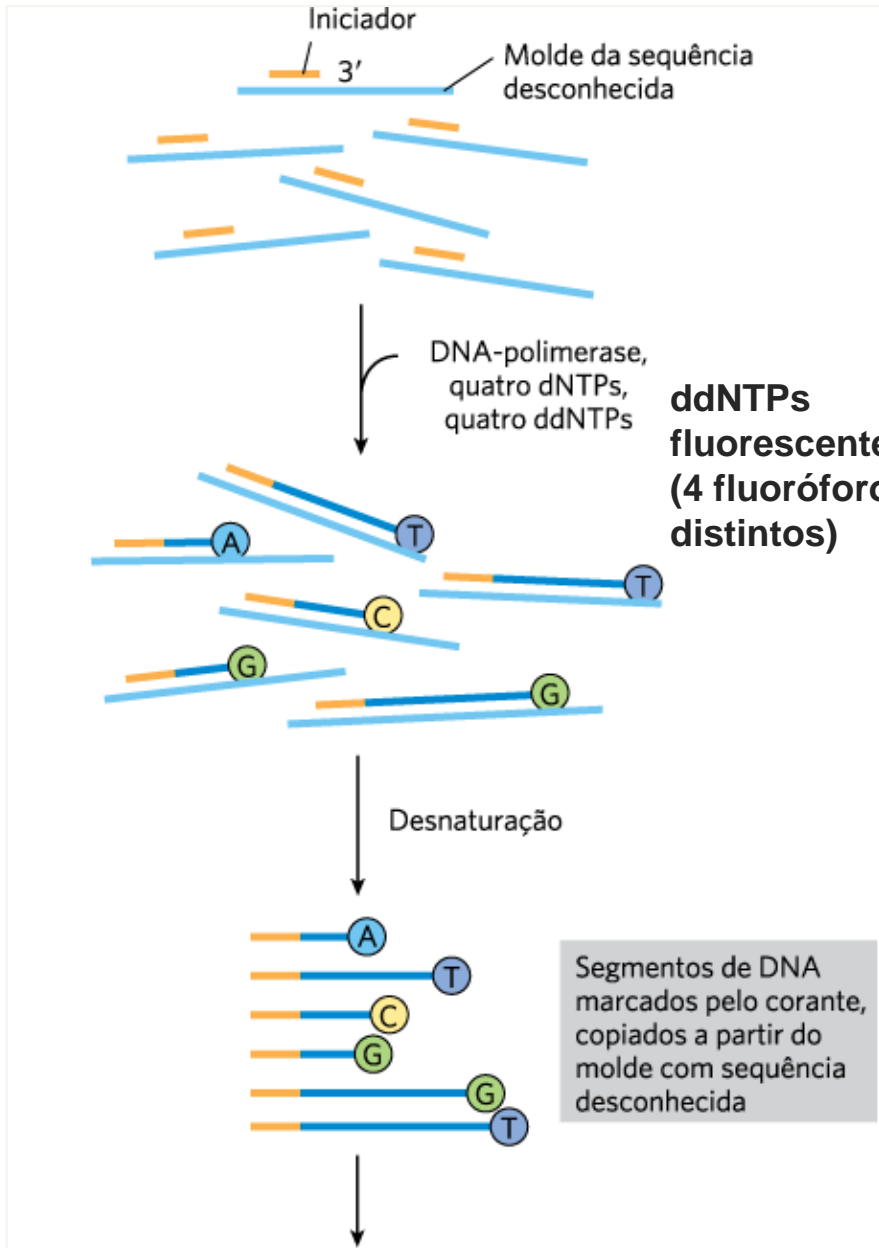


**Sequência complementar ao DNA molde**

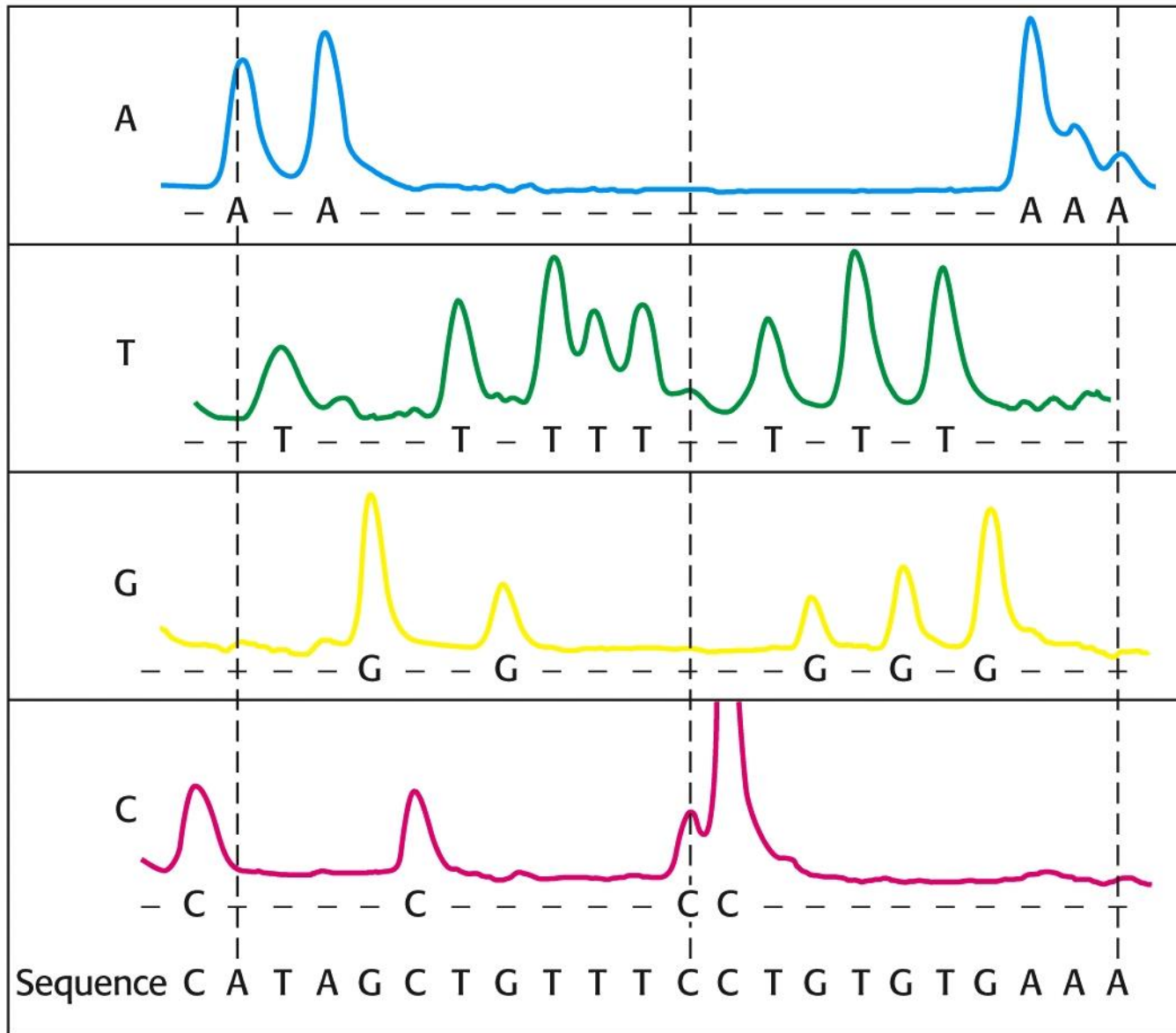
# Autorradiograma de um gel de sequenciamento de DNA



# Automação do Sequenciamento pelo Método de Sanger



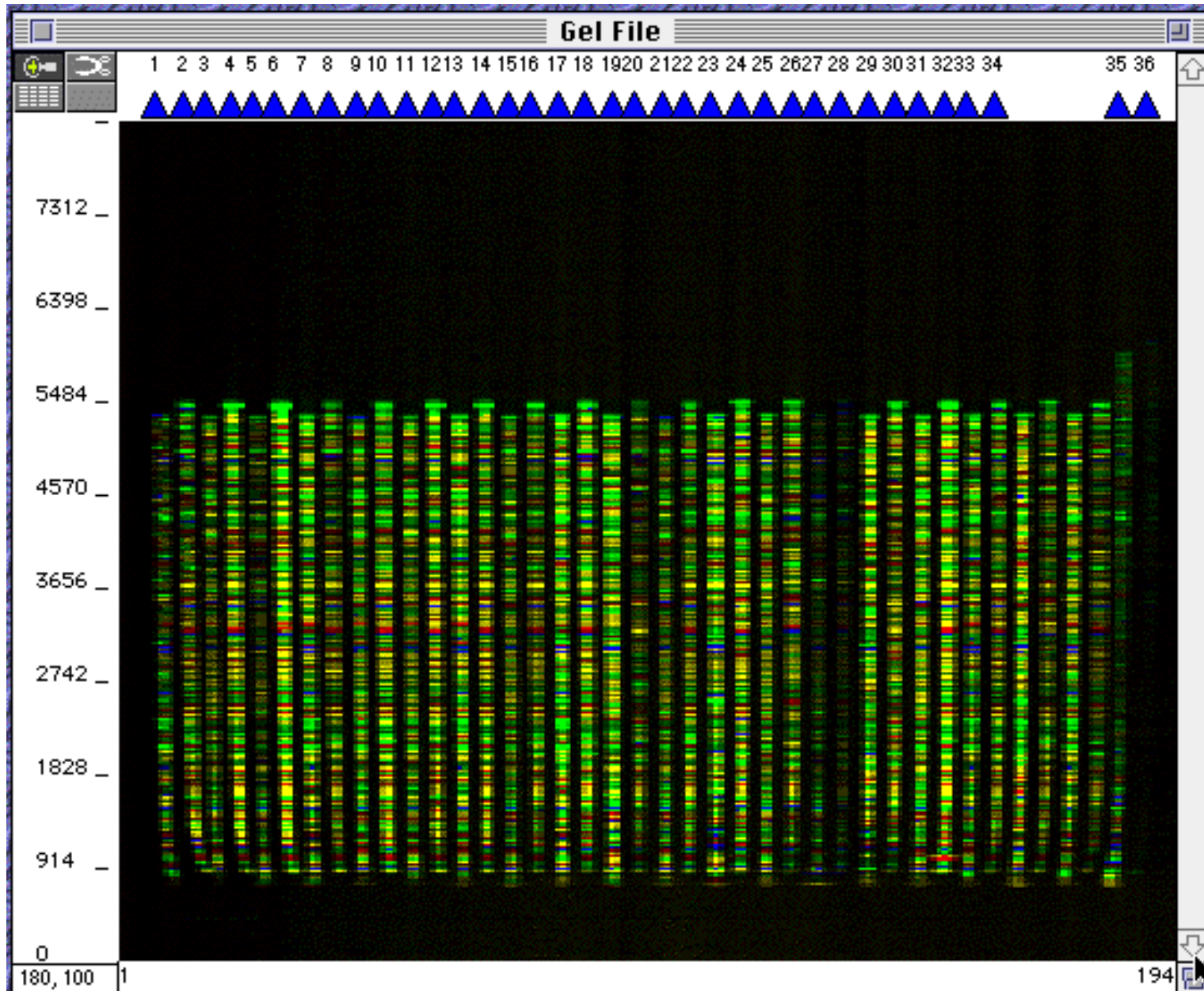
**Intensidade de fluorescência**



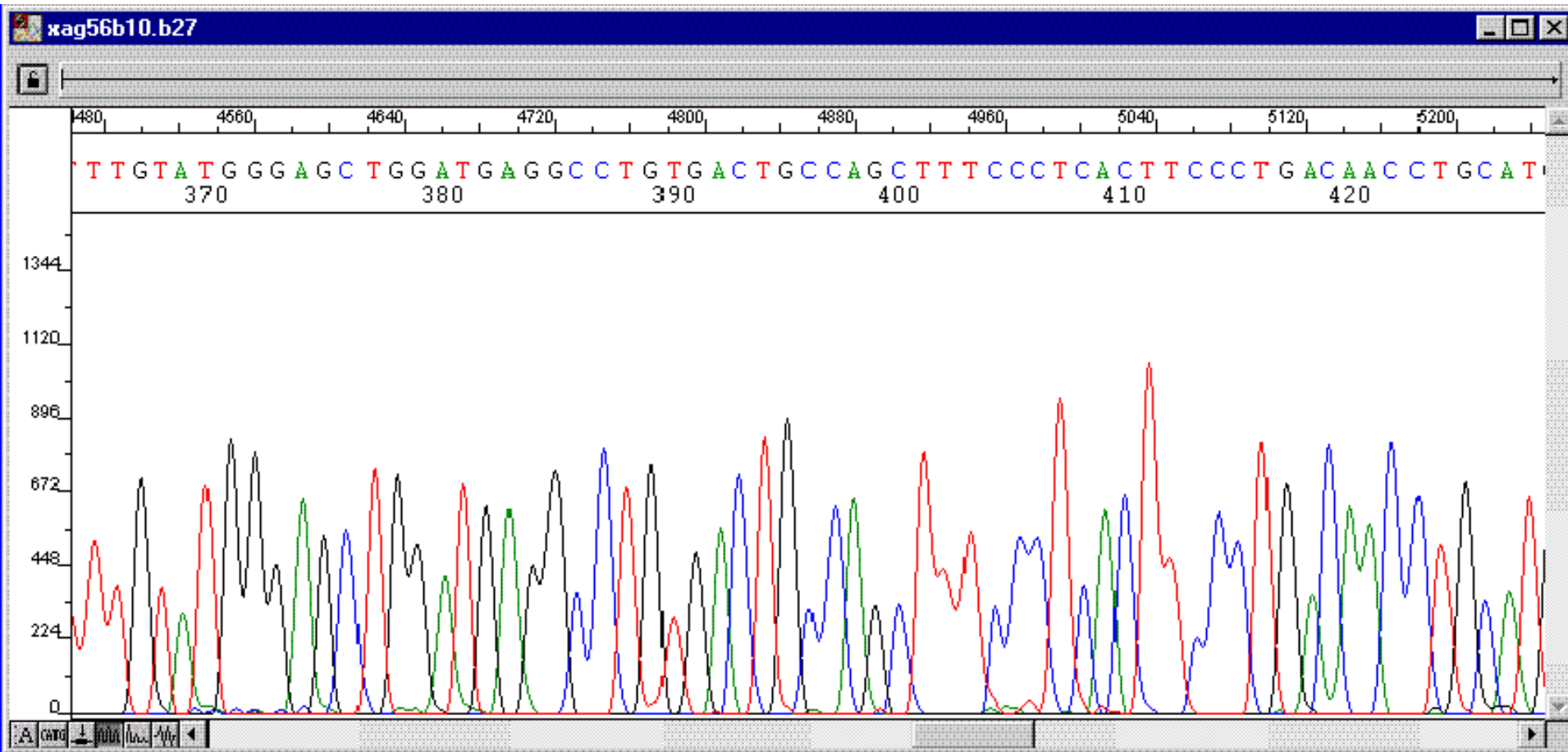
**Tamanho em nucleotídeos (bases)**



# Imagem da detecção por fluorescência no sequenciamento automatizado: cada amostra em um capilar



# Cromatograma do sequenciamento automatizado pelo método de Sanger



Tamanho médio das seqüências geradas → 700 – 1000 pb

## Novas Tecnologias de Sequenciamento

<b>Tecnologia</b>	<b>Química de sequenciamento</b>	<b>Tipo de preparação do molde</b>	<b>Tamanho médio da sequência (pb)</b>
Roche/454	Pirosequenciamento	cPCR em emulsão	400
Illumina/Solexa	Por síntese com DNA-polimerase; terminadores reversíveis	Amplificação por ponte	35-150
Applied Biosystems/SOLiD	Com base em ligação/sonda removível	Amplificação por PCR em emulsão	50
Helicos/ HeliScope	Terminadores reversíveis	Moléculas únicas de DNA imobilizadas	32
Pacific Biosciences	DNA polimerase imobilizada; fluoróforo ligado no grupamento fosfato do nucleotídeo	Moléculas únicas de DNA	1000
Ion Torrent Ion Proton	Por síntese com DNA polimerase/ detecção de protons liberados na síntese		35-400

# Aplicações do sequenciamento de DNA

- ❖ Obter a sequência completa de fragmentos de DNA (clonados em plasmídeos, produtos de PCR)
- ❖ Obter a sequência completa de cromossomos/genomas
- ❖ Obter a sequência de transcritos (RNA)/transcritoma

# Como os genomas são sequenciados

**DNA genômico**

↓  
**Fragmentação e clonagem**

**Biblioteca de clones (BAC)**

↓

**Ordenamento dos clones da biblioteca**

↓

**Seleção dos clones de BAC para sequenciamento**

↓  
**Fragmentação e clonagem**

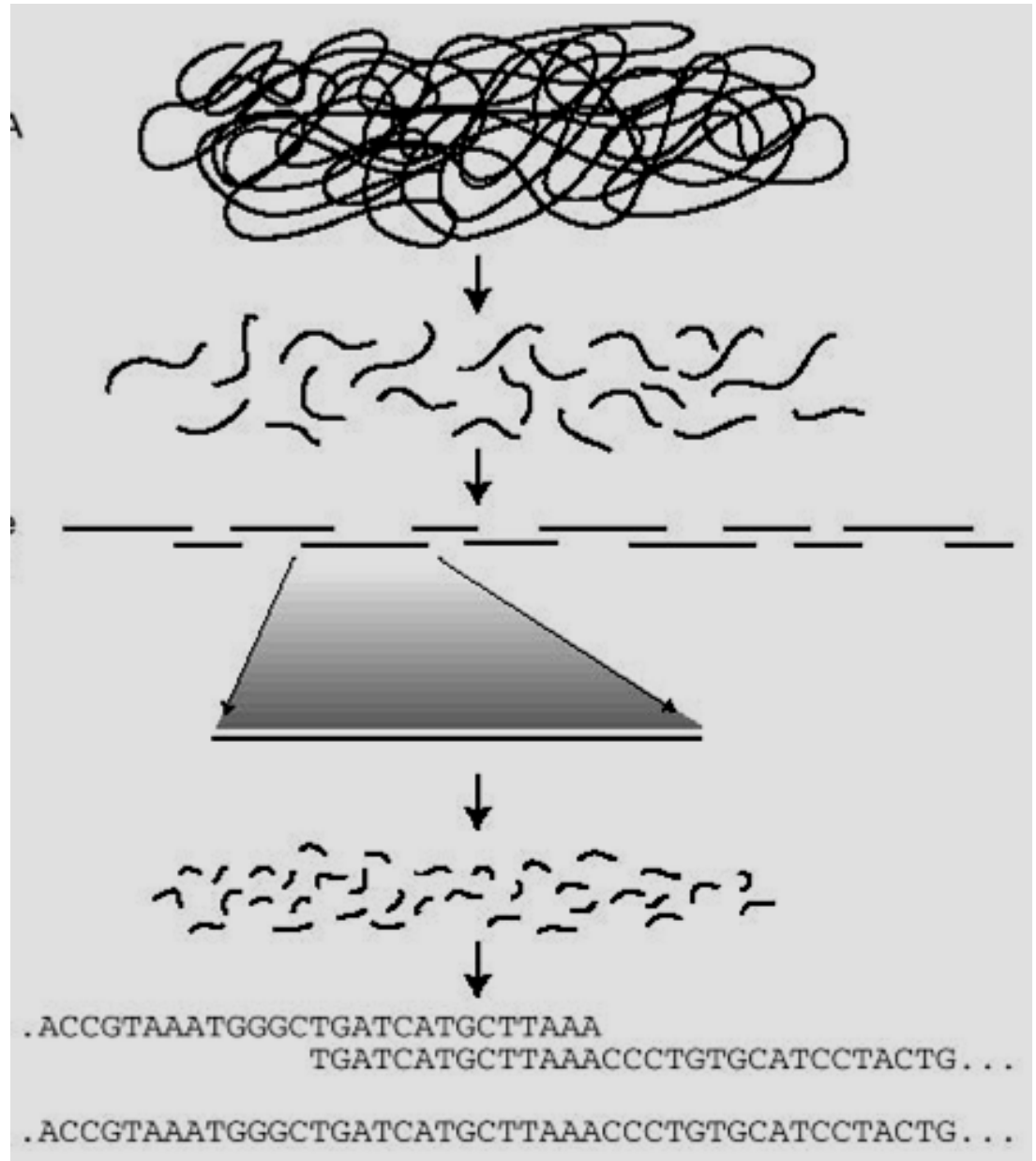
**Geração de sub-bibliotecas dos clones de BAC em plasmídeos**

↓

**Sequenciamento dos clones (sequenciamento shotgun)**

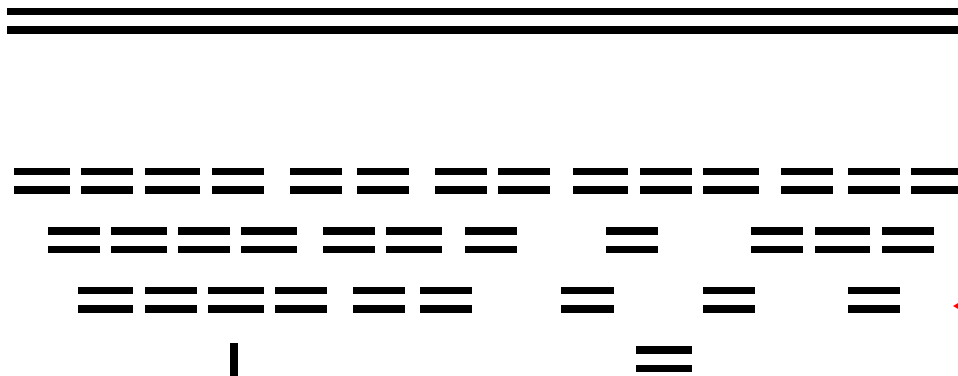
↓

**Montagem (*in silico*)**



**DNA genômico**

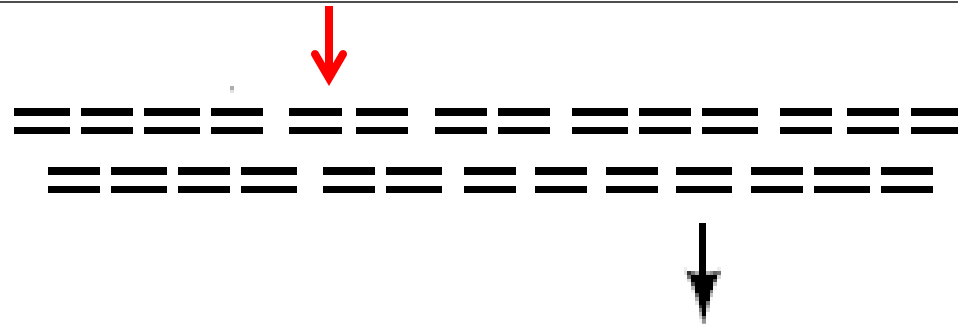
**Fragmentar aleatoriamente e clonar os fragmentos em vetores do tipo BAC: biblioteca de BAC**



**Sequenciar extremidades dos clones de BAC e ordenar**

**Seleção dos clones de BAC para sequenciamento completo**

**Geração de sub-bibliotecas *shotgun* e sequenciamento de ambas as fitas de DNA de cada clone**



**Montagem das sequências obtidas (*in silico*)**

BAC: cromossomo artificial de leveduras

**Como os genomas são sequenciados utilizando as metodologias de última geração?**

A etapa laboriosa de clonagem e seleção de clones recombinantes dos fragmentos do DNA genômico **foi eliminada**

# Como os genomas são sequenciados atualmente

**DNA genômico ou bibliotecas de BAC**



**Fragmentação**



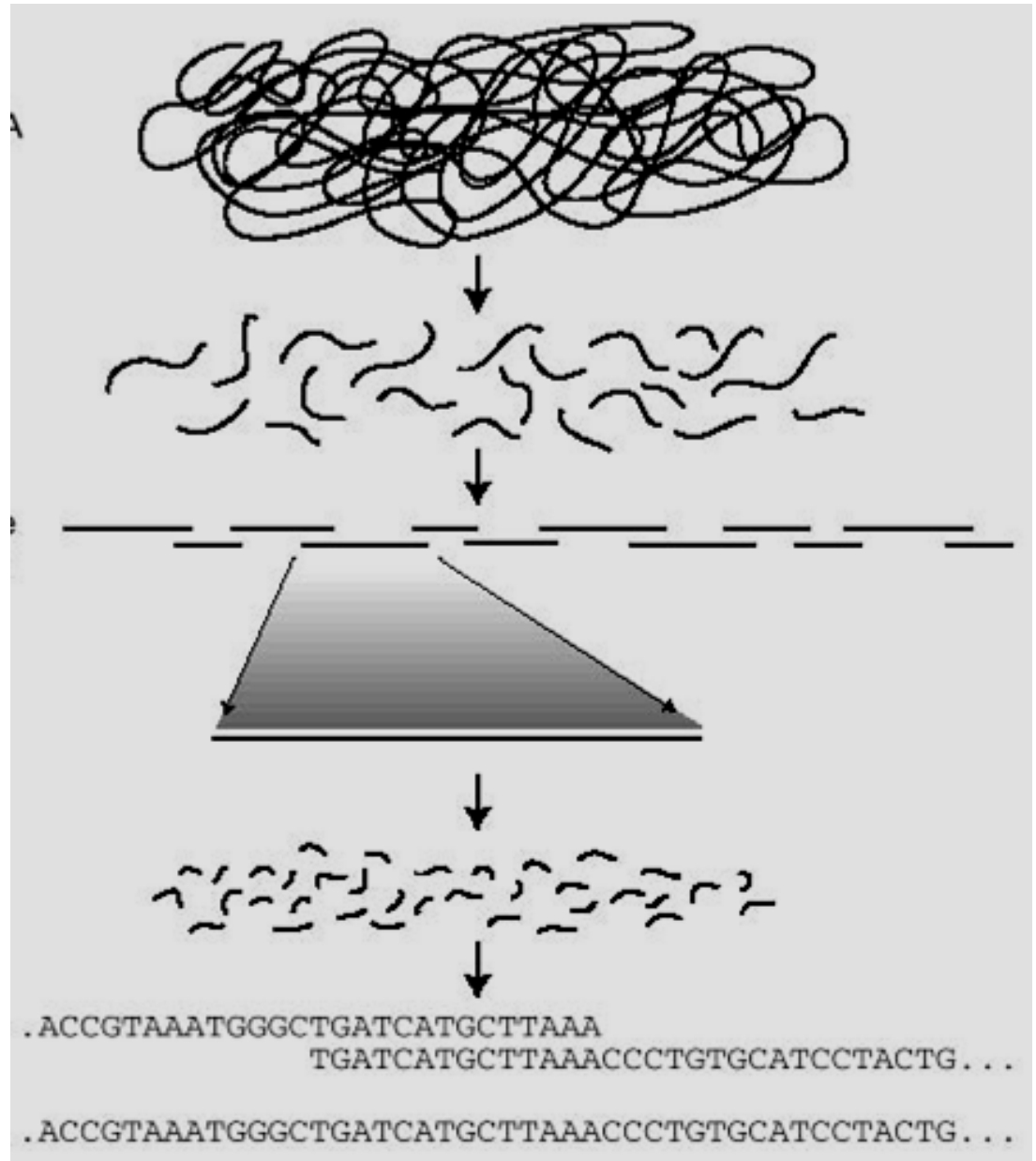
**Amplificação dos fragmentos**



**Sequenciamento**

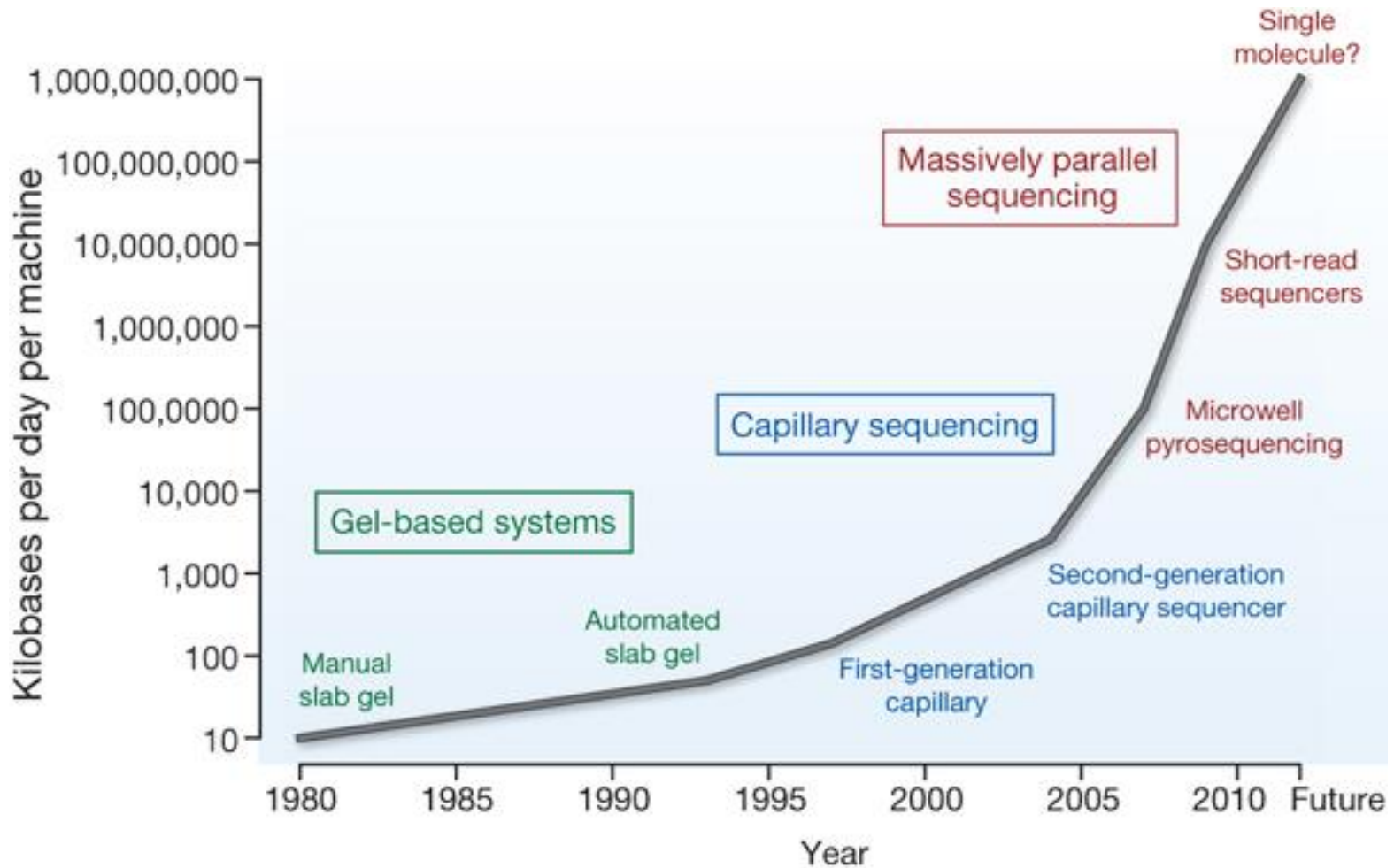


**Montagem (*in silico*)**





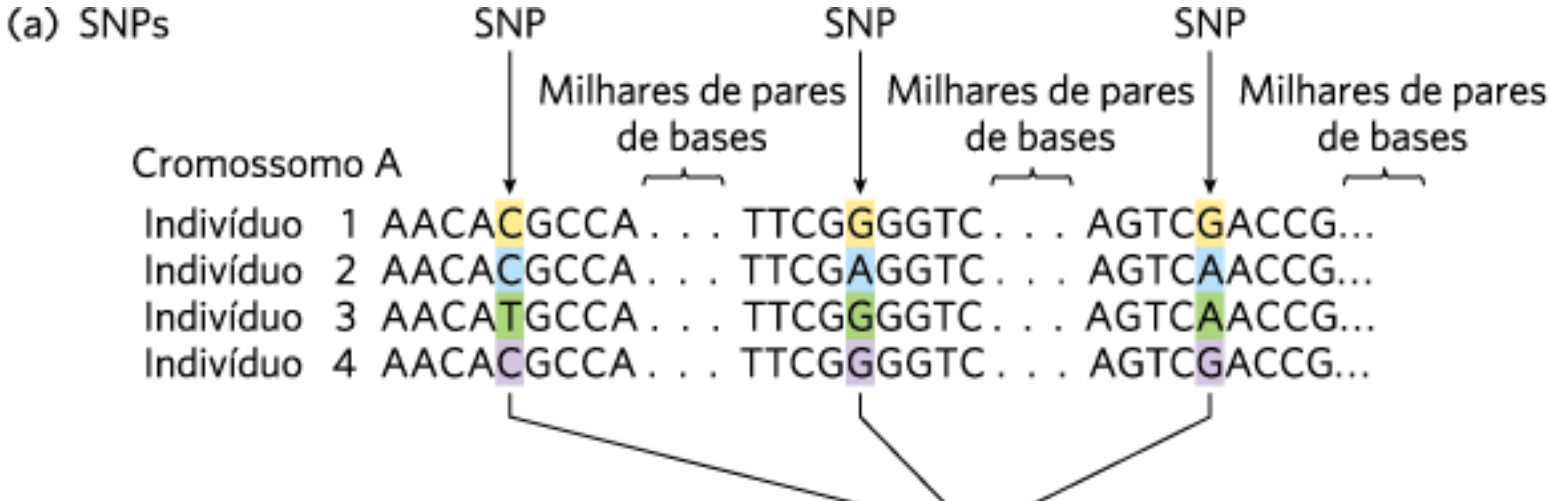
# Evolução da tecnologia de sequenciamento de DNA



# Aplicações de sequenciamento

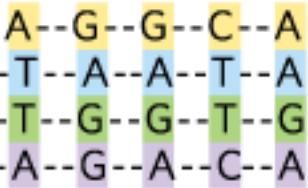
- Medicina
  - Genoma humano
    - Primeiro sequenciamento
      - ano 2000, a um custo de centenas de milhões de dólares
    - Hoje
      - Centenas de milhares de genomas foram sequenciados
      - Custo em torno de 30 mil dólares
  - Transcritoma humano
  - Medicina personalizada
  - Diagnóstico de doenças infecciosas

# Sequenciamento e comparação de seqüências genômicas de indivíduos



**FIGURA 8-7 Identificação de haplótipos.** (a) SNPs são identificados em amostras genômicas, e (b) grupos de SNPs são compilados em um haplótipo. Os SNPs irão variar na população humana geral, assim como nos quatro indivíduos fictícios mostrados aqui. Contudo, os SNPs escolhidos para definir um haplótipo frequentemente serão os mesmos na maior parte dos indivíduos de uma população em particular. (c) SNPs que definem haplótipos (SNPs marcadores) podem ser utilizados para simplificar o processo de

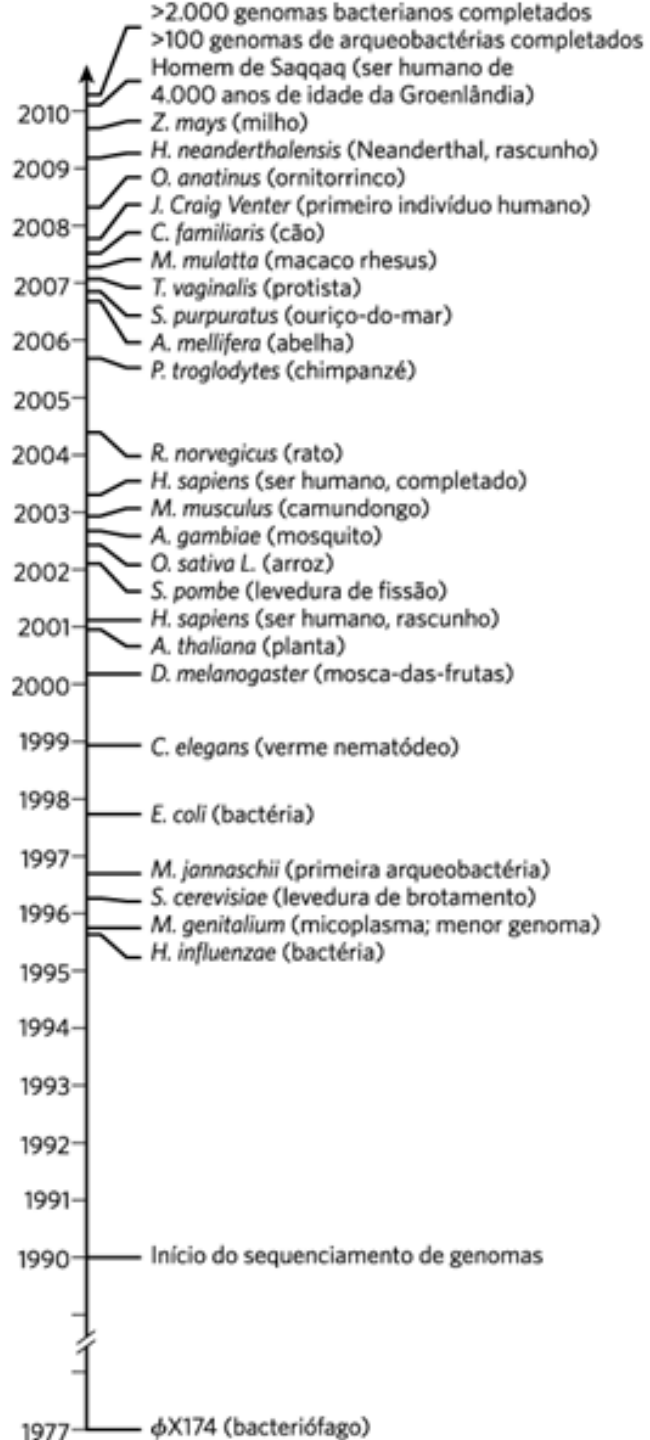
identificação do haplótipo de um indivíduo (sequenciando 3 em vez de 20 *loci*). Se as posições mostradas forem sequenciadas, uma seqüência ATC pode ser característica de uma população nativa de um local do nordeste da Europa, enquanto GTC pode ser encontrado em uma população na Ásia. Múltiplos haplótipos deste tipo são utilizados para traçar populações humanas pré-históricas. Ver texto para detalhes. [Fonte: Adaptada de International HapMap Consortium, *Nature* 426:789-796, 2003.]



(c) SNPs marcadores



Identificação de **SNP** (polimorfismo de único nucleotídeo) em genomas. Grupos de SNPs marcadores são compilados em um haplótipo e podem ser utilizados para identificação de indivíduos pelo sequenciamento de regiões definidas de seus genomas.



# PCR

- Polymerase chain reaction
- Reação em cadeia da polimerase

Quem é a polimerase?

# Polimerases de DNA: As enzimas que sintetizam DNA

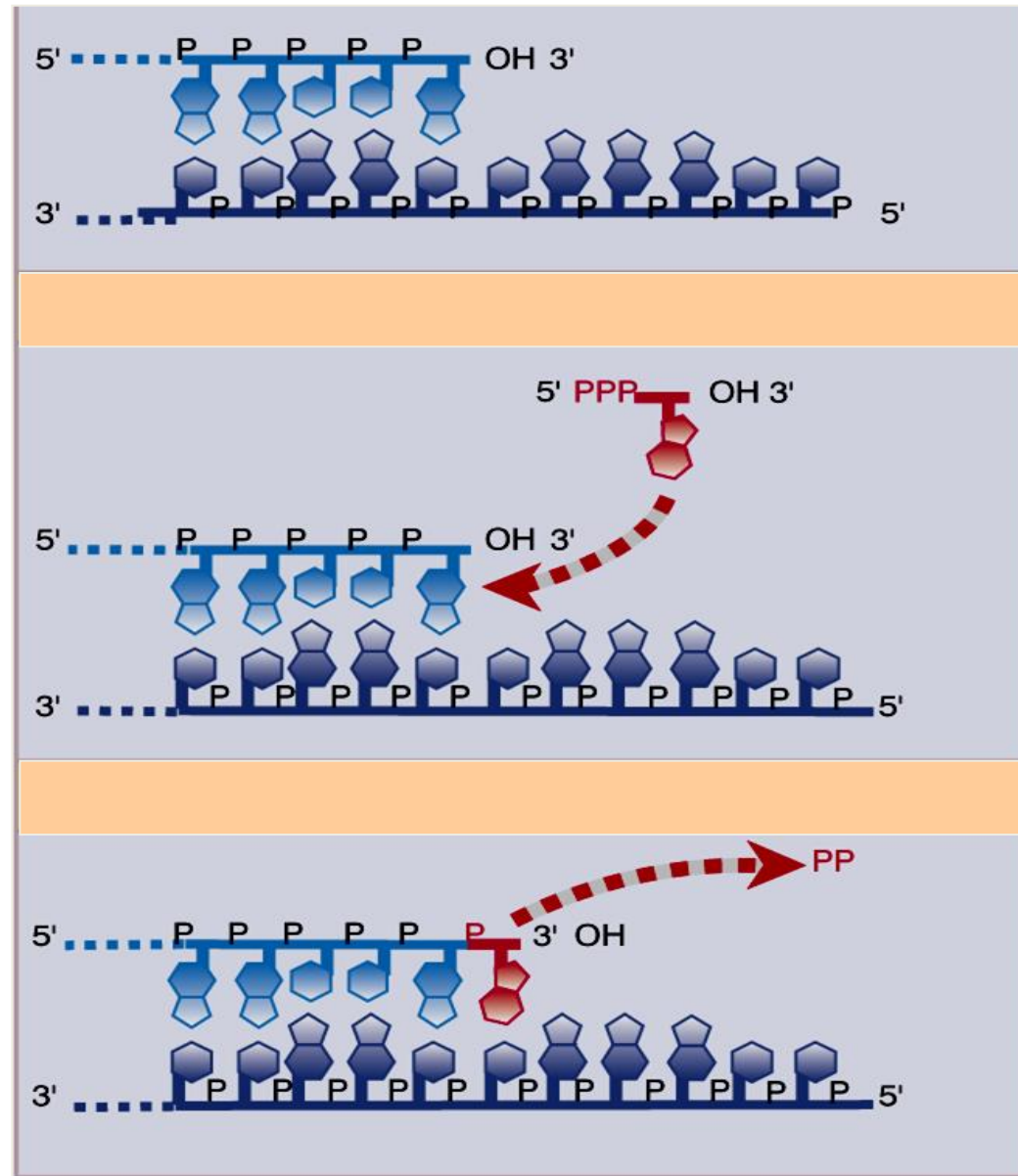
- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos a extremidade 3'OH da cadeia em crescimento.

- A DNA polimerase requer um *primer* (iniciador) e um molde

- O precursor da síntese é desoxirribonucleosídeo 5' trifosfato

- Sentido da síntese sempre é 5' → 3'

- A replicação é um processo extremamente fiel. As DNA-polimerases tem atividade revisora



# O processo de PCR

- Procura imitar o processo de replicação de DNA (o que explica o uso da polimerase)
- Objetivo é aumentar (“**amplificar**”) a quantidade de uma certa sequência de DNA de interesse
  - com mais DNA, é possível fazer mais coisas com esse DNA
- Inventada na década de 80
- Seu inventor ganhou o prêmio Nobel em 1993 (Kary Mullis)



# É um processo de **crescimento exponencial**

- Como na lenda do jogo de xadrez...



- 1 grão na primeira casa
- 2 grãos na segunda casa
- 4 grãos na terceira casa
- ...etc
- Quantos grãos na última casa?

$$2^{n-1}$$

$$2^{63}$$

$$\sim 10^{19}$$

$$1 \text{ trilhão} = 10^{12}$$

10 milhões x 1 trilhão

# Ingredientes para PCR

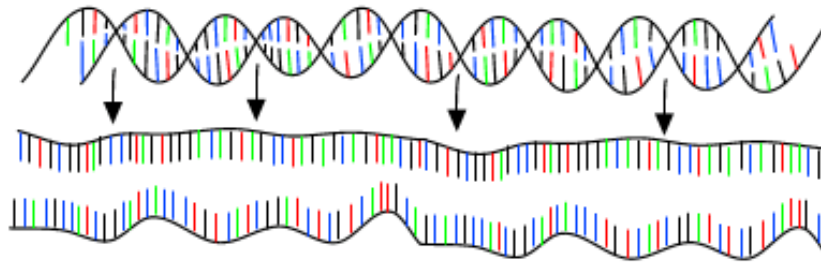
- O DNA **molde** que contém a região do DNA que se deseja amplificar (o alvo)
- Dois **primers** que são complementares às pontas 3' da fita senso e da fita anti-senso do DNA alvo
- Polimerase Taq que funcione a 70 °C
- *Deoxinucleosídeos trifosfato* (dNTPs) ou seja, nucleotídeos contendo grupos trifosfato
- Tampão (um ambiente químico adequado para ação da polimerase)
- Cations e ions de magnésio e potássio

# Ciclos do PCR

- A ideia é fazer o DNA (e os ingredientes) passarem várias vezes por 3 passos
  - Passo de **desnaturação**, em que DNA fita dupla passa a ser de fita simples
  - Passo de **anelamento**, em que os DNAs de fita simples se tornam fita dupla
  - Passo de **extensão** do DNA, para que a polimerase consiga chegar ao fim do alvo

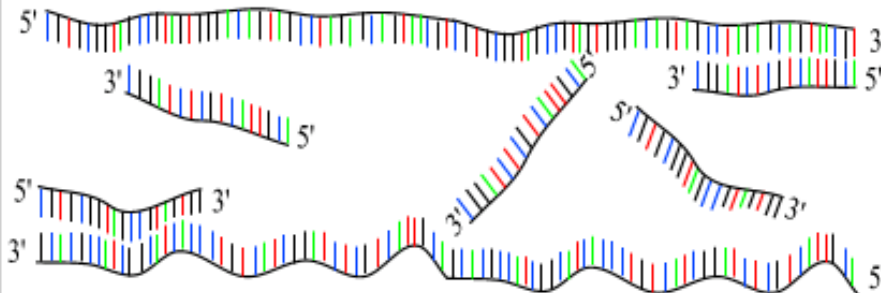
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



**Step 1 : denaturation**

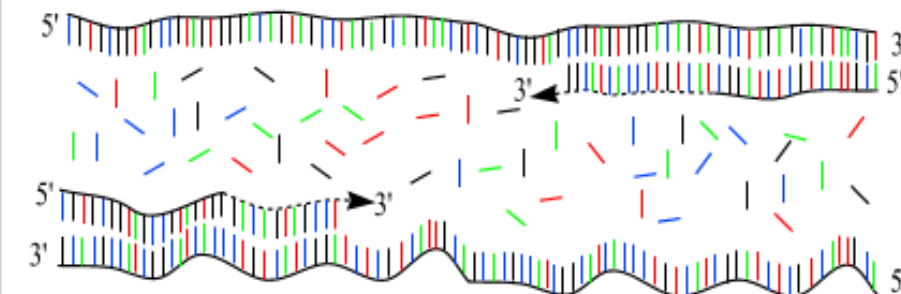
1 minut 94 °C



**Step 2 : annealing**

45 seconds 54 °C

**forward and reverse primers !!!**



**Step 3 : extension**

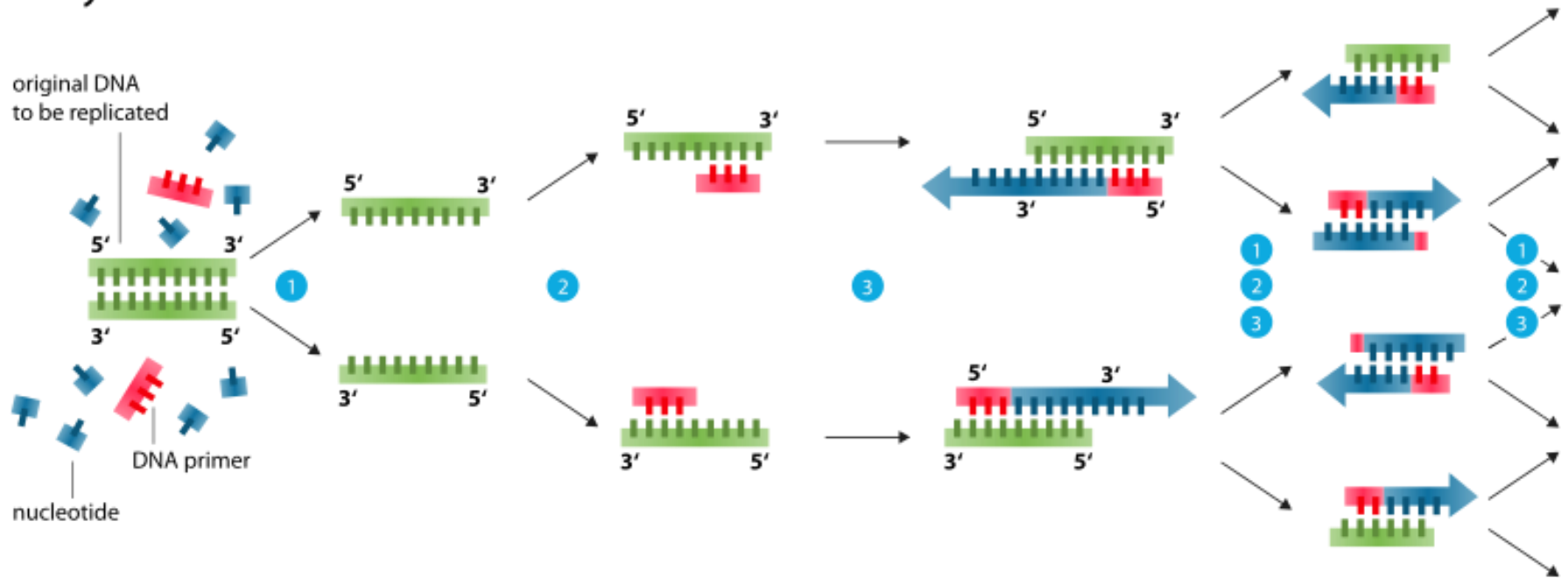
2 minutes 72 °C

**only dNTP's**

(Andy Vierstraete 1999)

- Matematicamente, se começássemos com **uma única molécula**, teríamos no final
  - Entre  $2^{30}$  e  $2^{40}$  moléculas

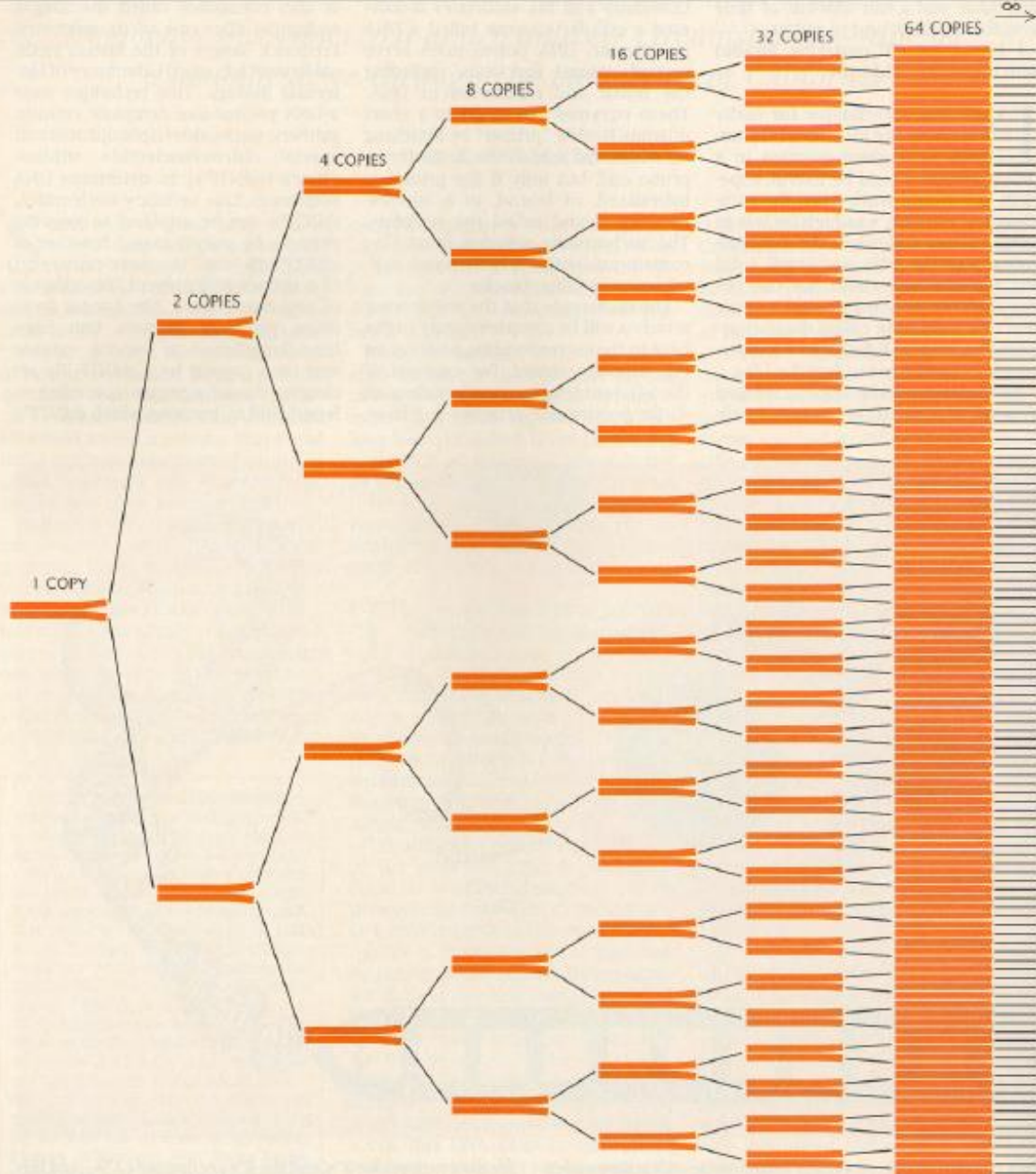
# Polymerase chain reaction - PCR



- 1 Denaturation** at 94-96°C
- 2 Annealing** at ~68°C
- 3 Elongation** at ca. 72 °C

Fonte: wikipedia





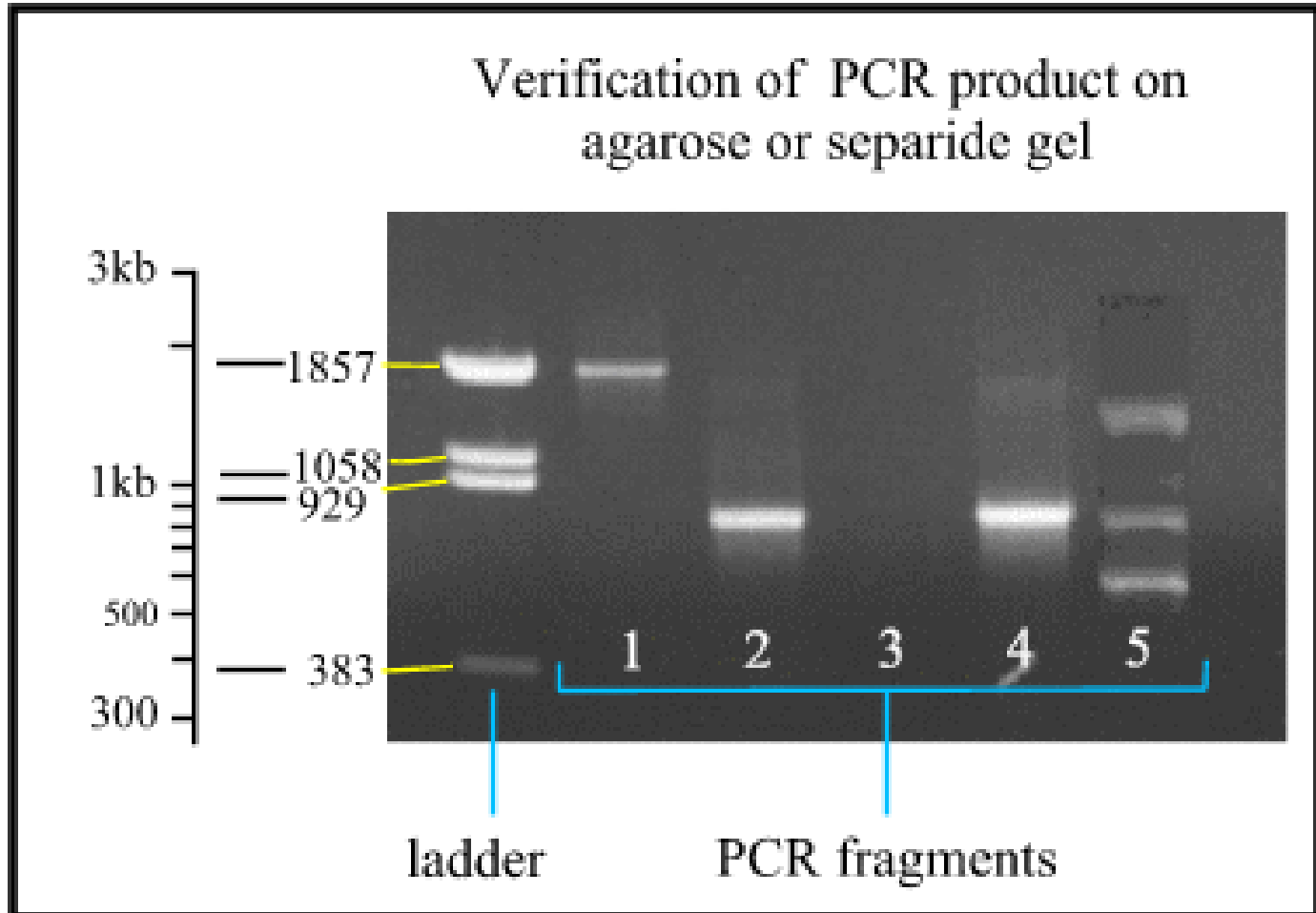
**POLYMERASE CHAIN REACTION** is a simple technique for copying a piece of DNA in the laboratory with readily available reagents. Because the number of copies increases exponentially, more than 100 billion can be made in only a few hours.

# PCR se faz por máquinas



termocicladores

# Nem sempre PCR dá certo



# Aplicações

- Aumentar a quantidade de DNA para sequenciamento
- Diagnóstico de **doenças genéticas**
- Diagnóstico de **doenças infecciosas**
- Identificação de assinaturas genéticas, como em **testes de paternidade**
- **Filogenia de espécies** por pequenos trechos de DNA

# PCR e sequenciamento

- PCR depende de molécula alvo, previamente conhecida
- É muito mais barato do que sequenciamento
- Sequenciamento fornece muito mais informação