

Sequenciamento de DNA e PCR

2018 s1

Prof. João Carlos Setubal

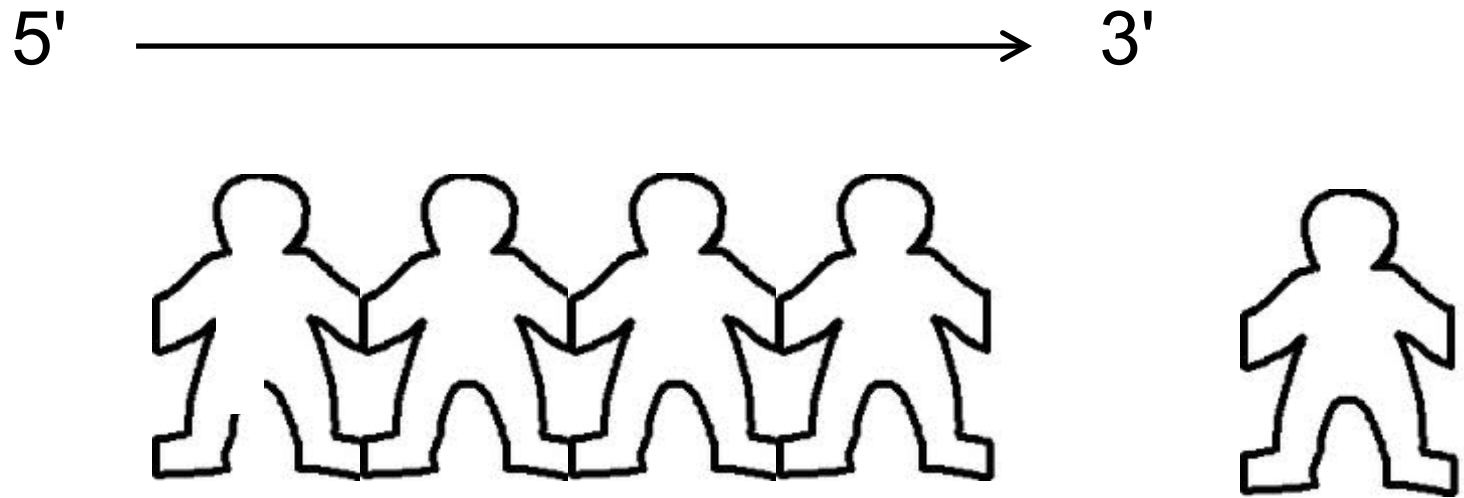


Universidade de São Paulo
Instituto de Química

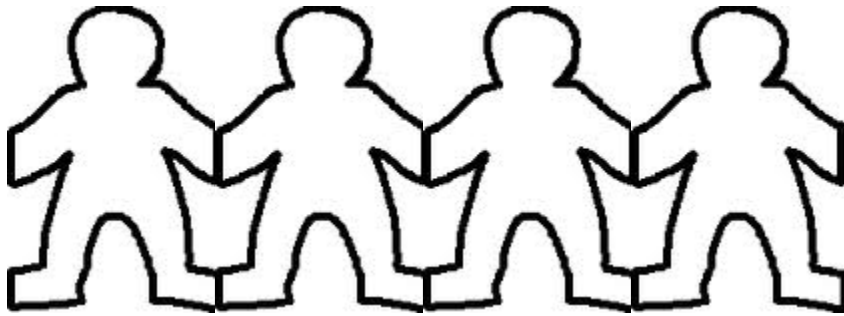
DNA é microscópico

- como saber a composição de DNA?
- não existe microscópio suficientemente poderoso que permita simplesmente “ler” a molécula, percorrendo-a de uma ponta à outra
- métodos indiretos são necessários
- todos eles tem que fragmentar o DNA para obter resultados

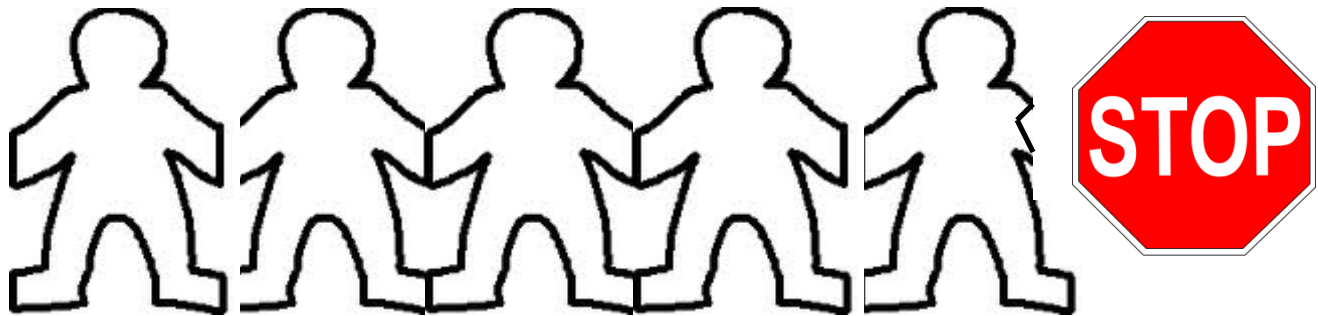
Replicação de DNA

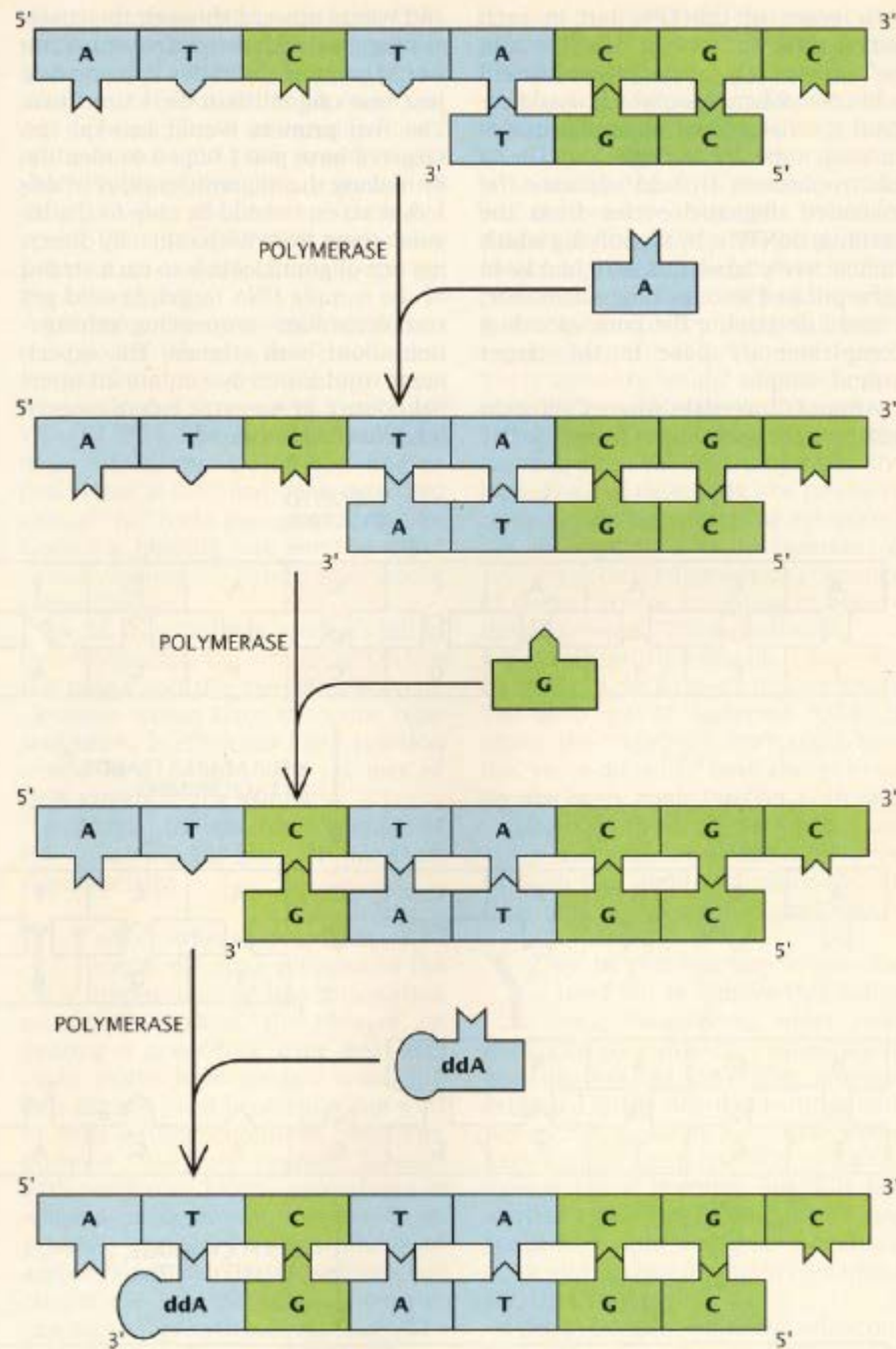


Se um dos nucleotídeos for
“defeituoso”...



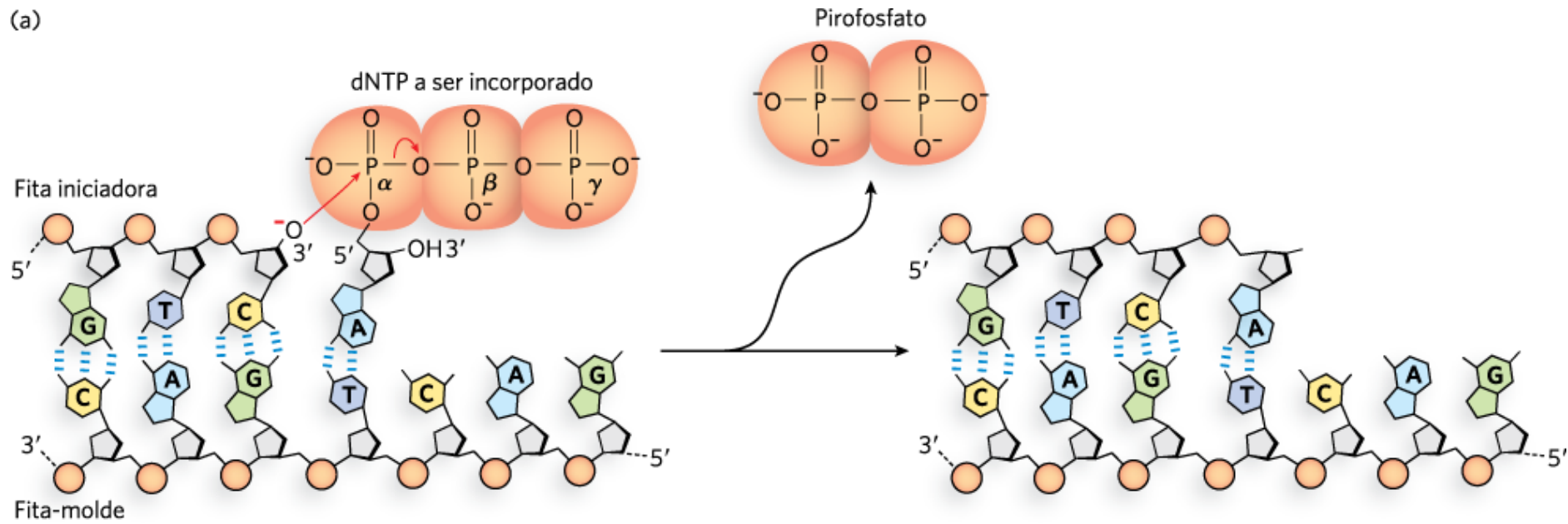
A replicação pára



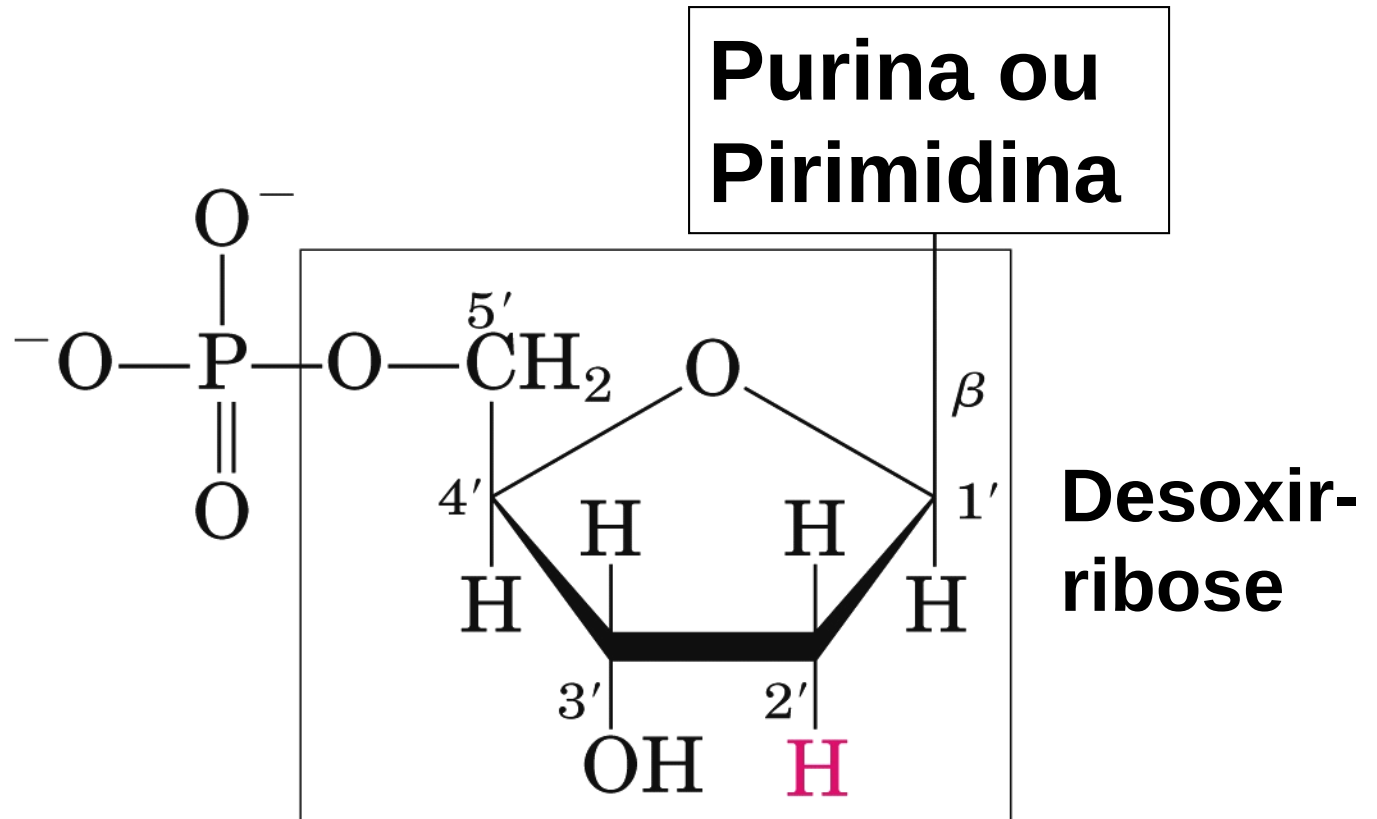


Reação da DNA Polimerase com dNTPs → síntese de DNA

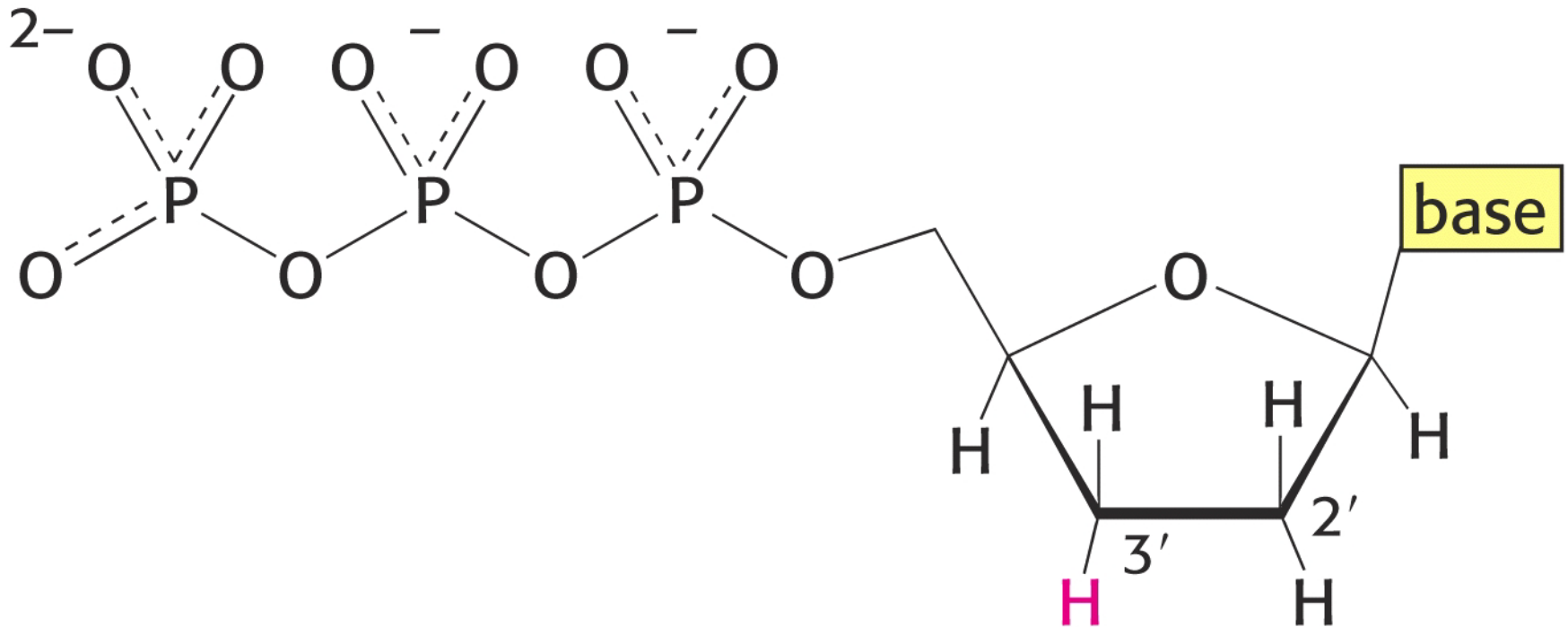
(a)



Fosfato



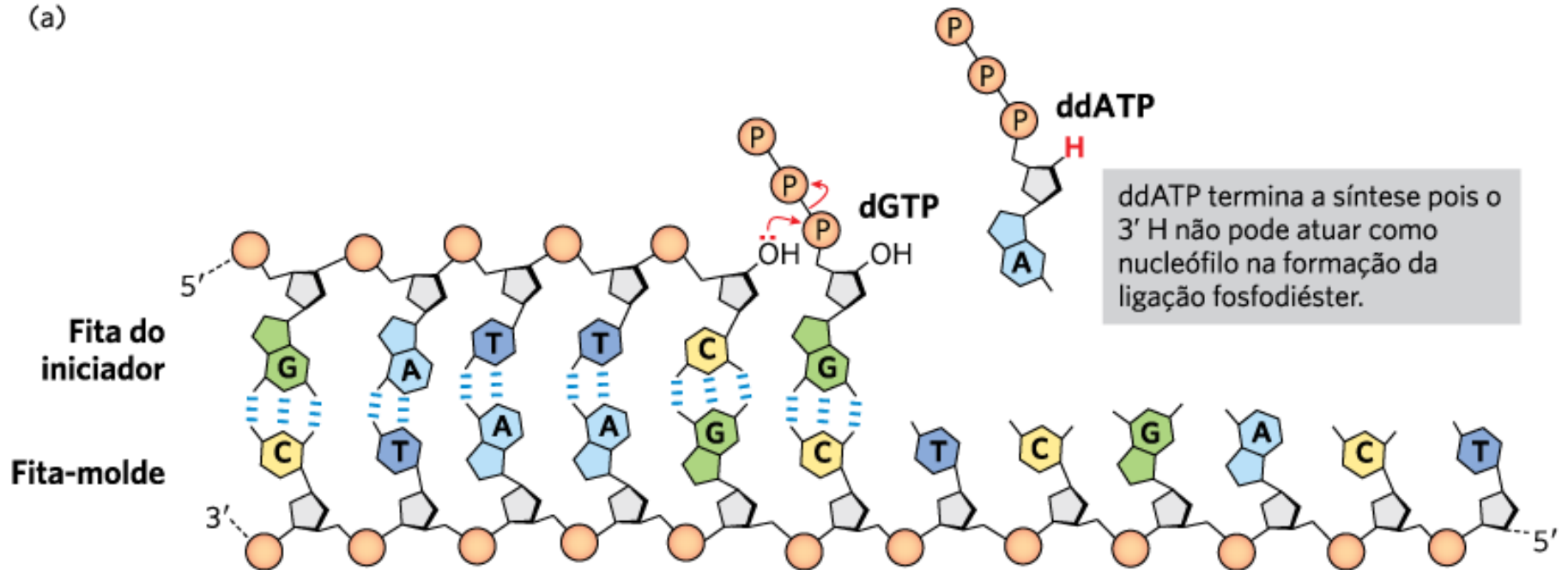
Desoxirribonucleotídeo



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

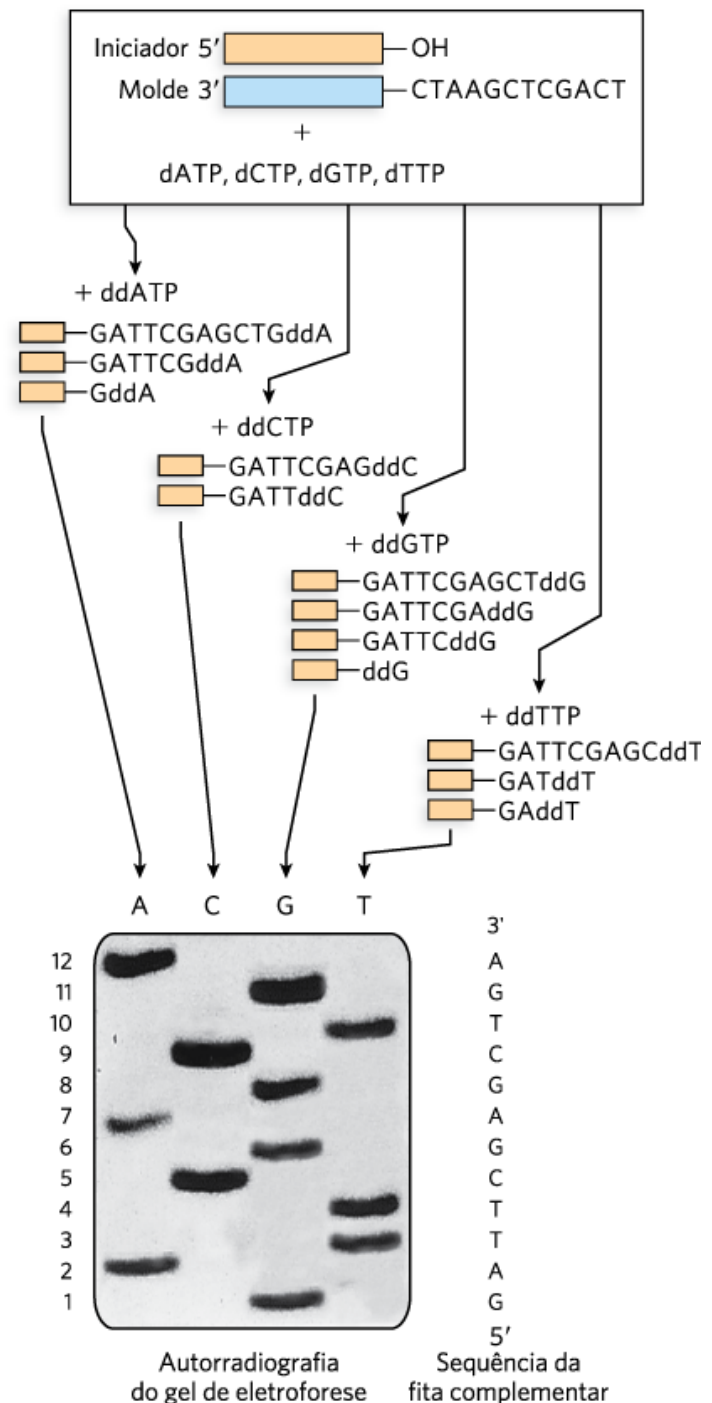
Reação da DNA Polimerase com dNTPs + ddNTPs → interrupção da síntese de DNA

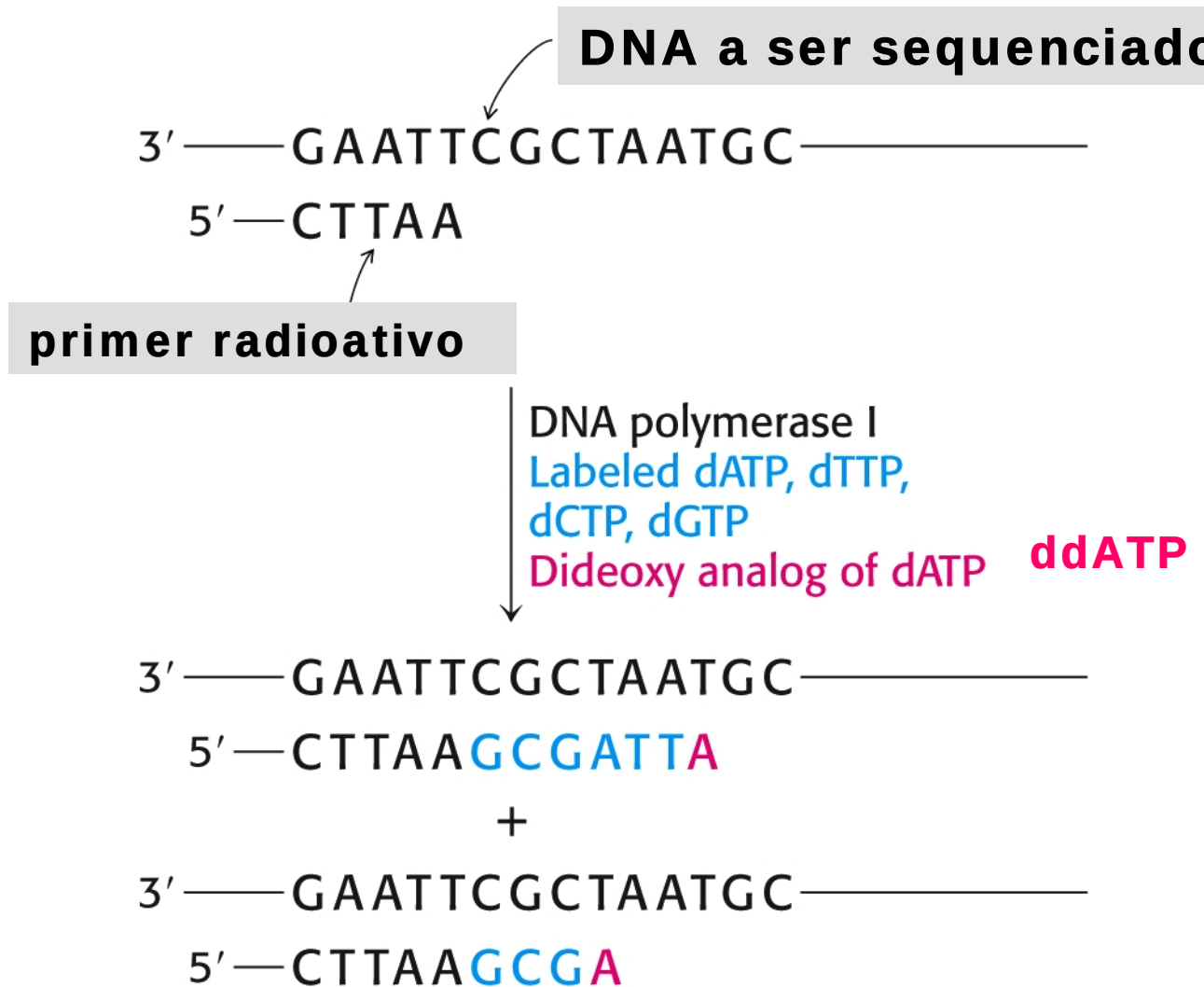
(a)



Método de Sanger:

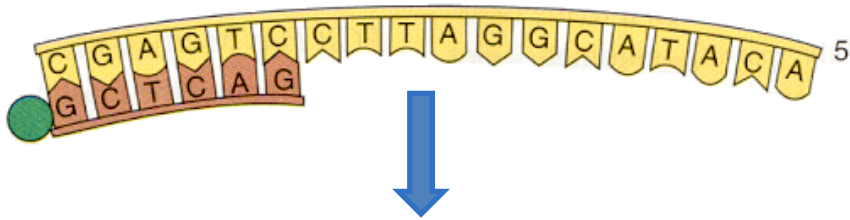
terminação controlada da síntese de DNA com didesoxirribonucleotídeos



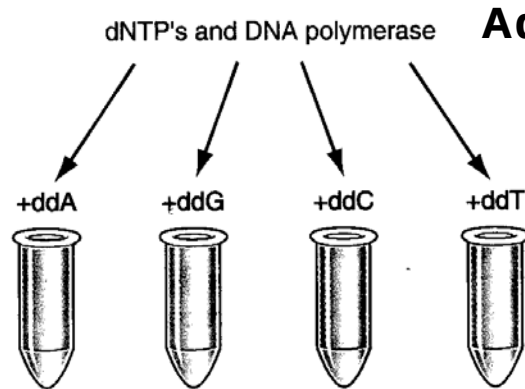


Novas cadeias de DNA serão separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com resolução para separar fragmentos de DNA com 1 nucleotídeo de diferença

Método de Sanger

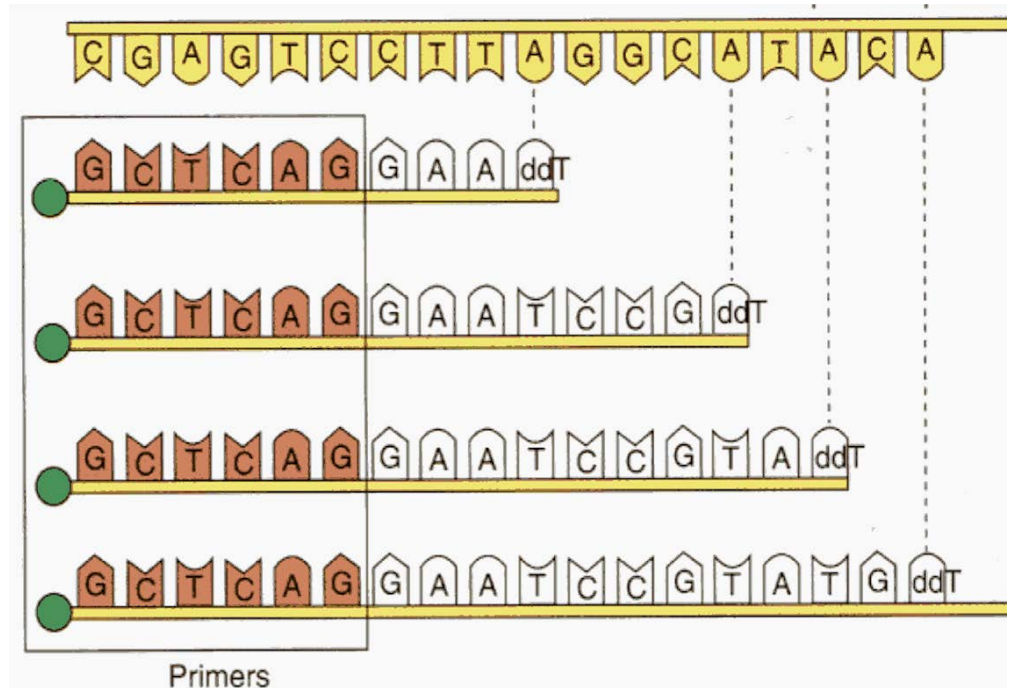


Desnaturação da dupla fita
Anelamento do “primer radioativo”



Adição da enzima e dNTPs

Terminação da síntese: adição dos ddNTPs



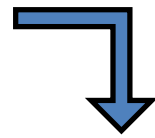
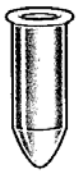
dNTP's and DNA polymerase

+ddA

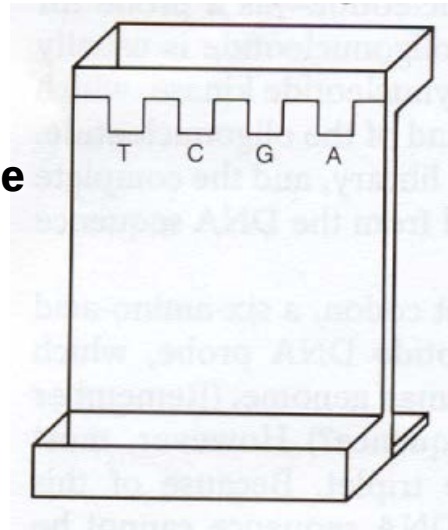
+ddG

+ddC

+ddT

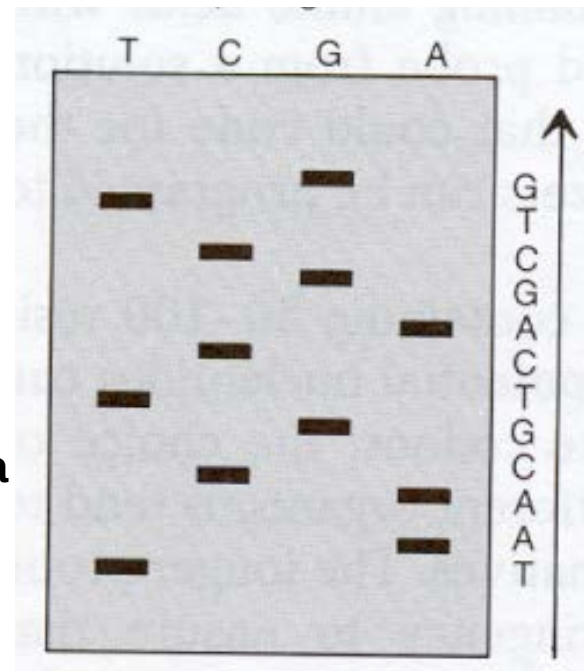
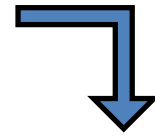


**Eletroforese em gel de
poliacrilamida
desnaturante**



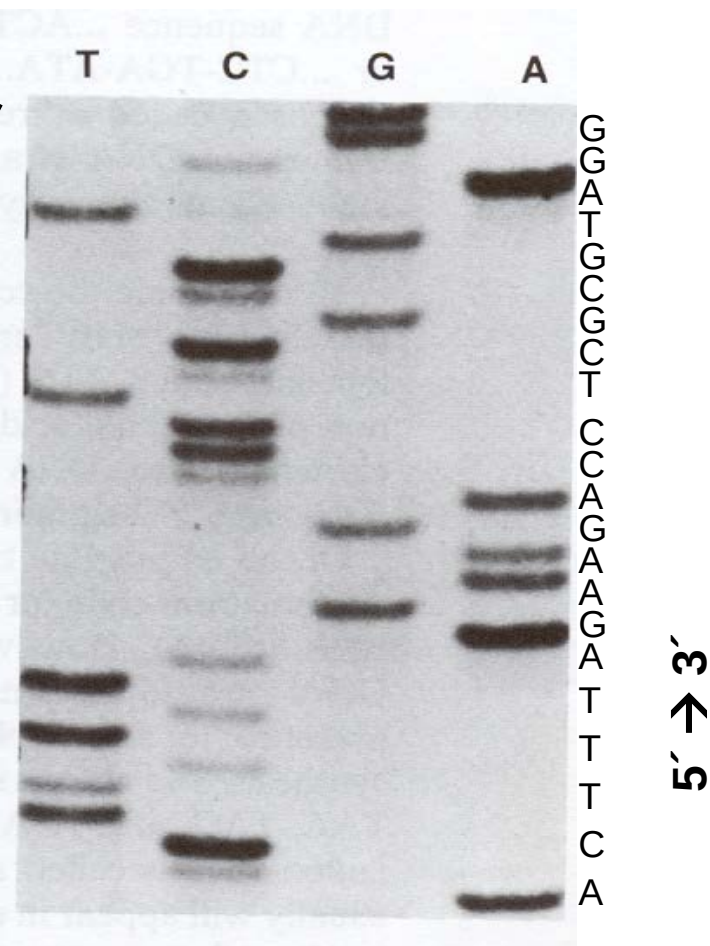
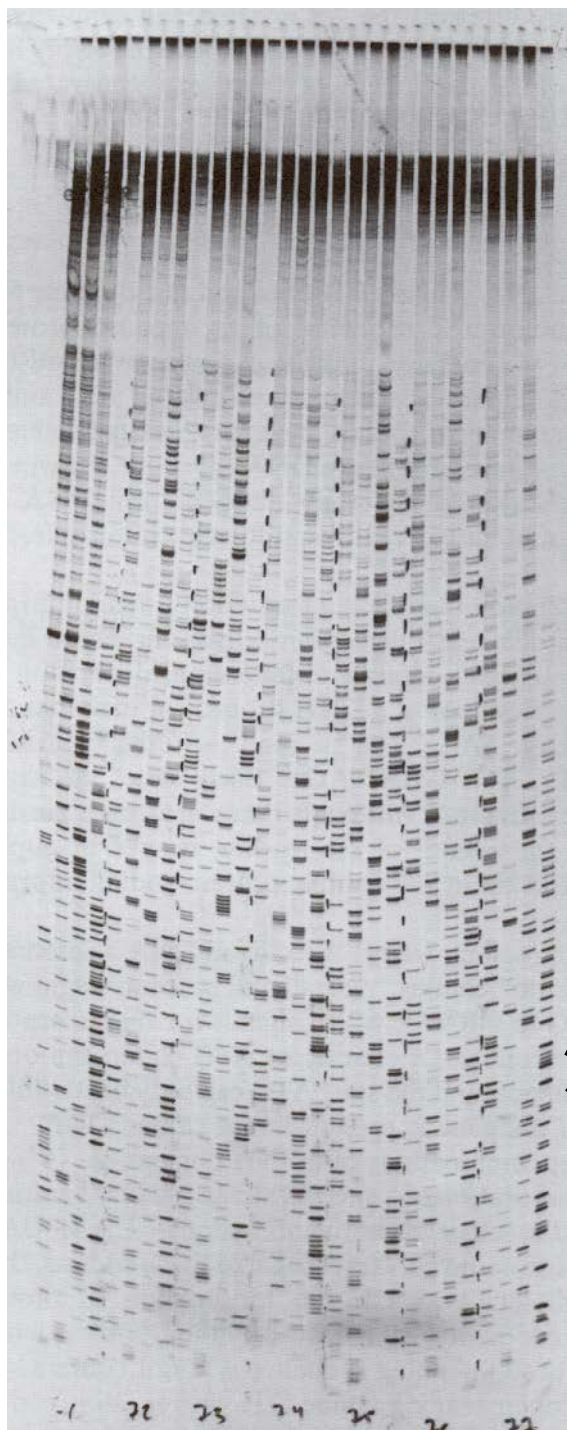
Autorradiografia

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

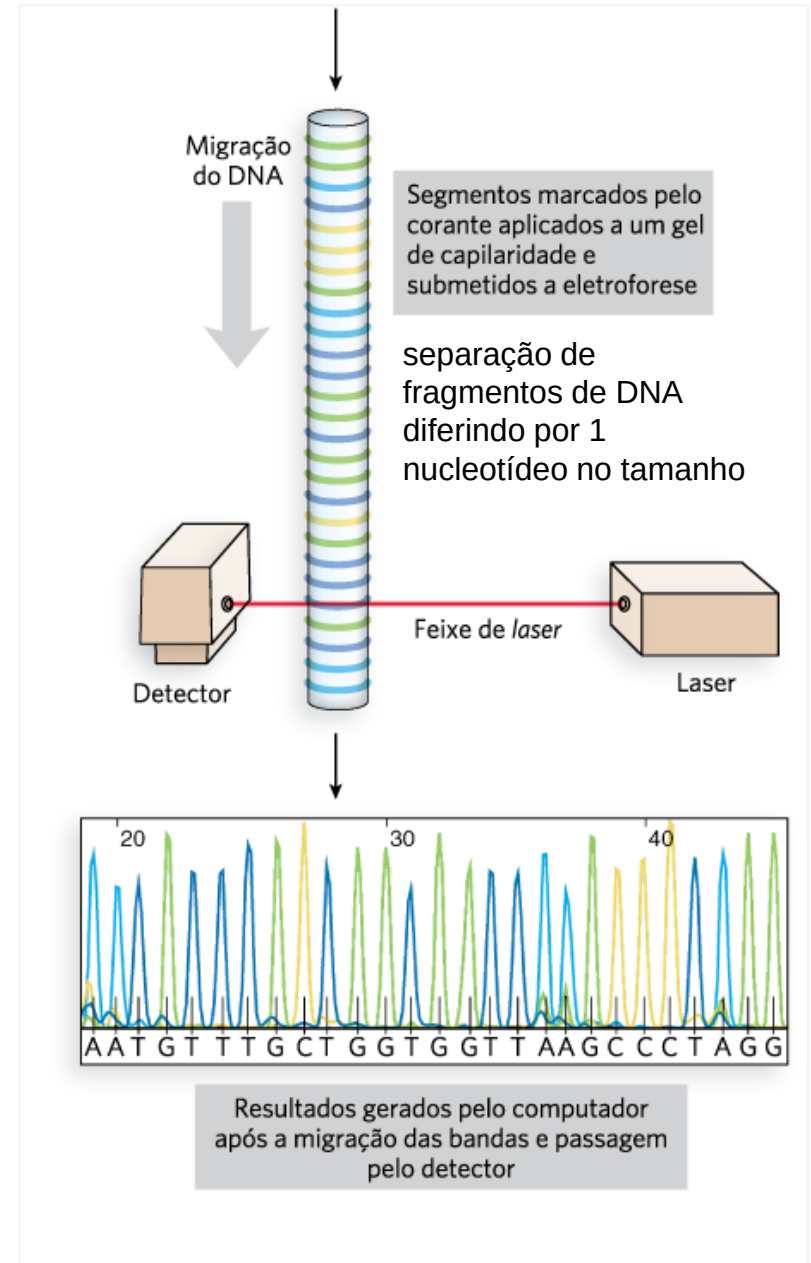
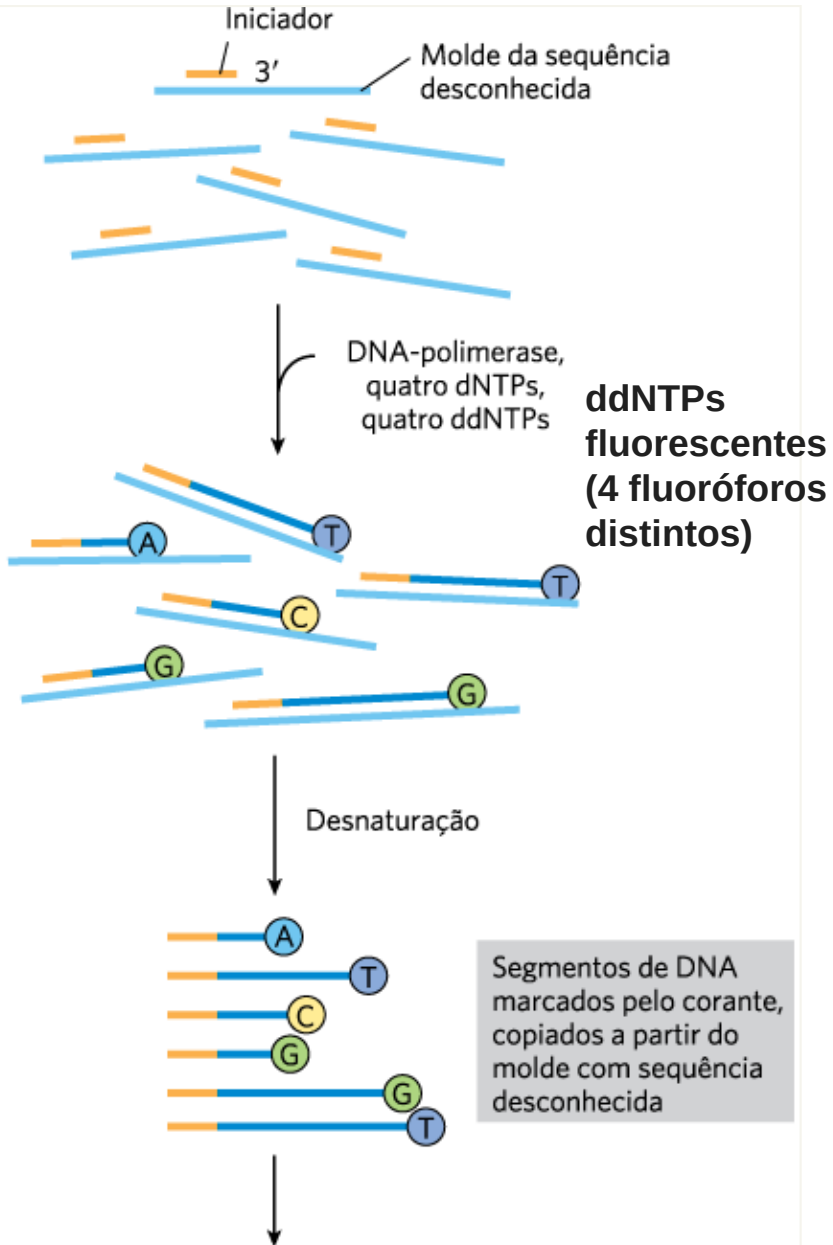


**Sequência complementar
ao DNA molde**

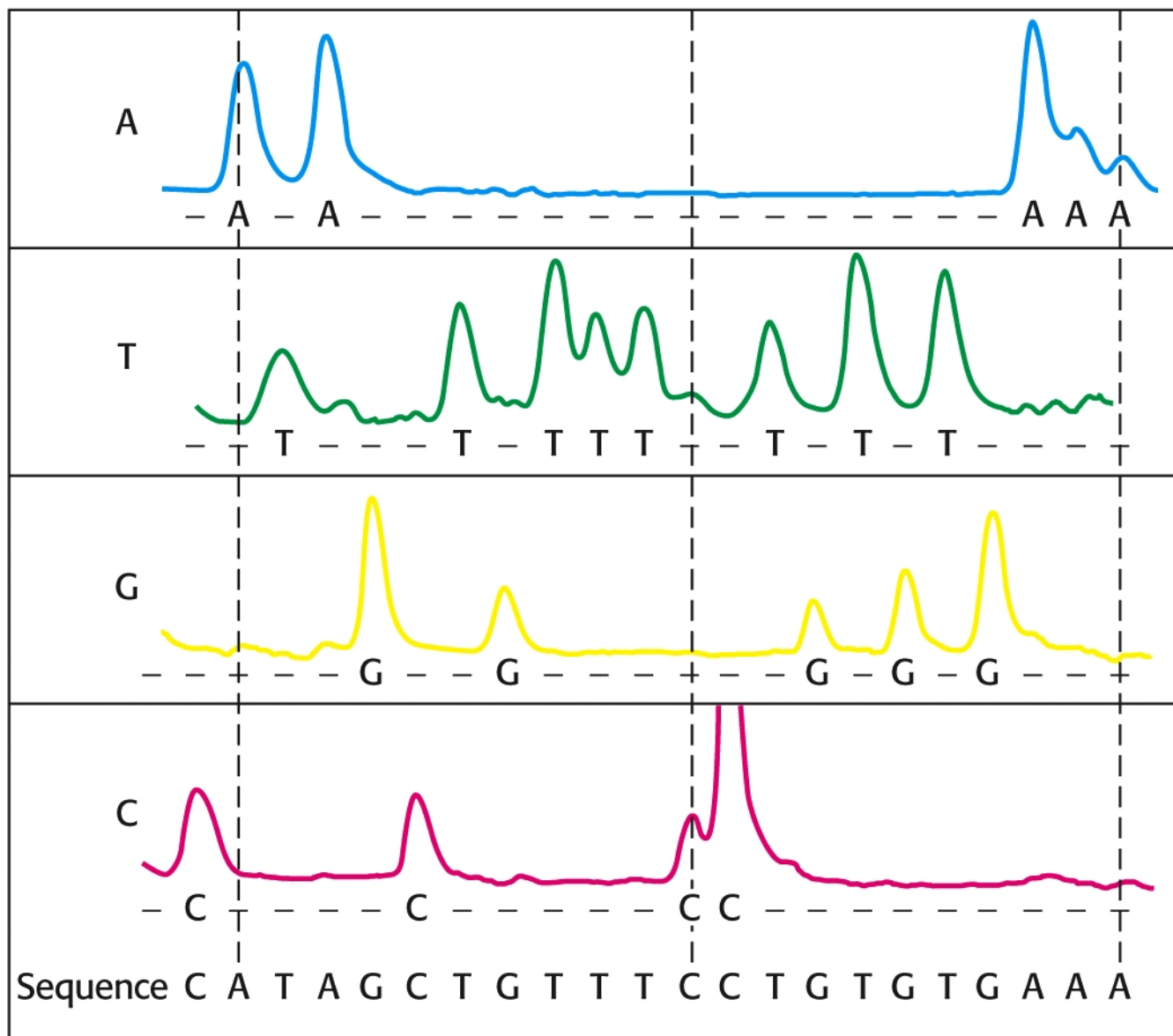
Autorradiograma de um gel de sequenciamento de DNA



Automação do Sequenciamento pelo Método de Sanger

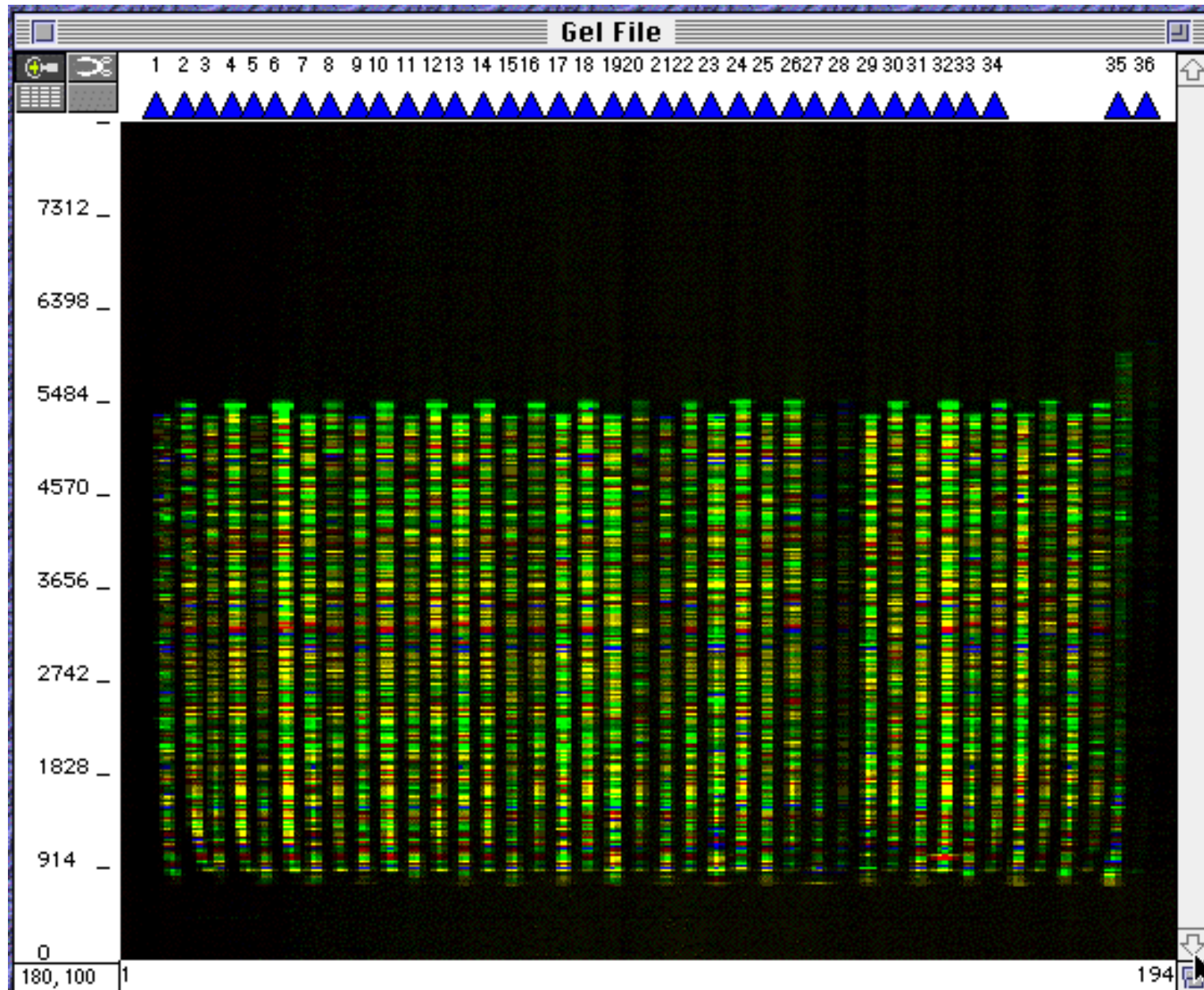


Intensidade de fluorescência

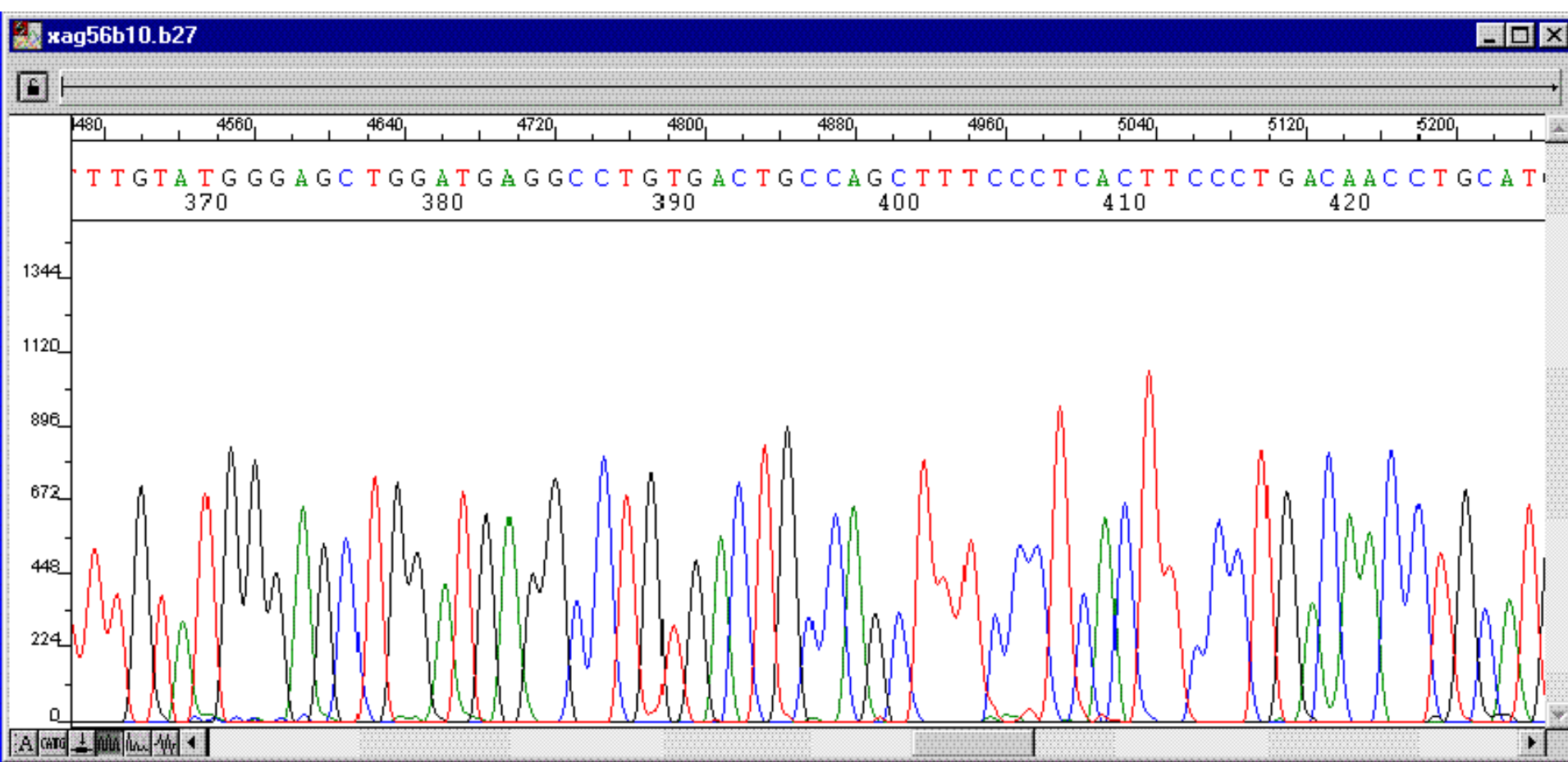


Tamanho em nucleotídeos (bases)

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



Cromatograma do sequenciamento automatizado pelo método de Sanger



Tamanho médio das sequências geradas → 700 – 1000 pb

Novas Tecnologias de Sequenciamento

Tecnologia	Química de sequenciamento	Tipo de preparação do molde	Tamanho médio da sequência (pb)
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

1997

The ABI Prism 3700 /3730



2017

oxford nanopore minION





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

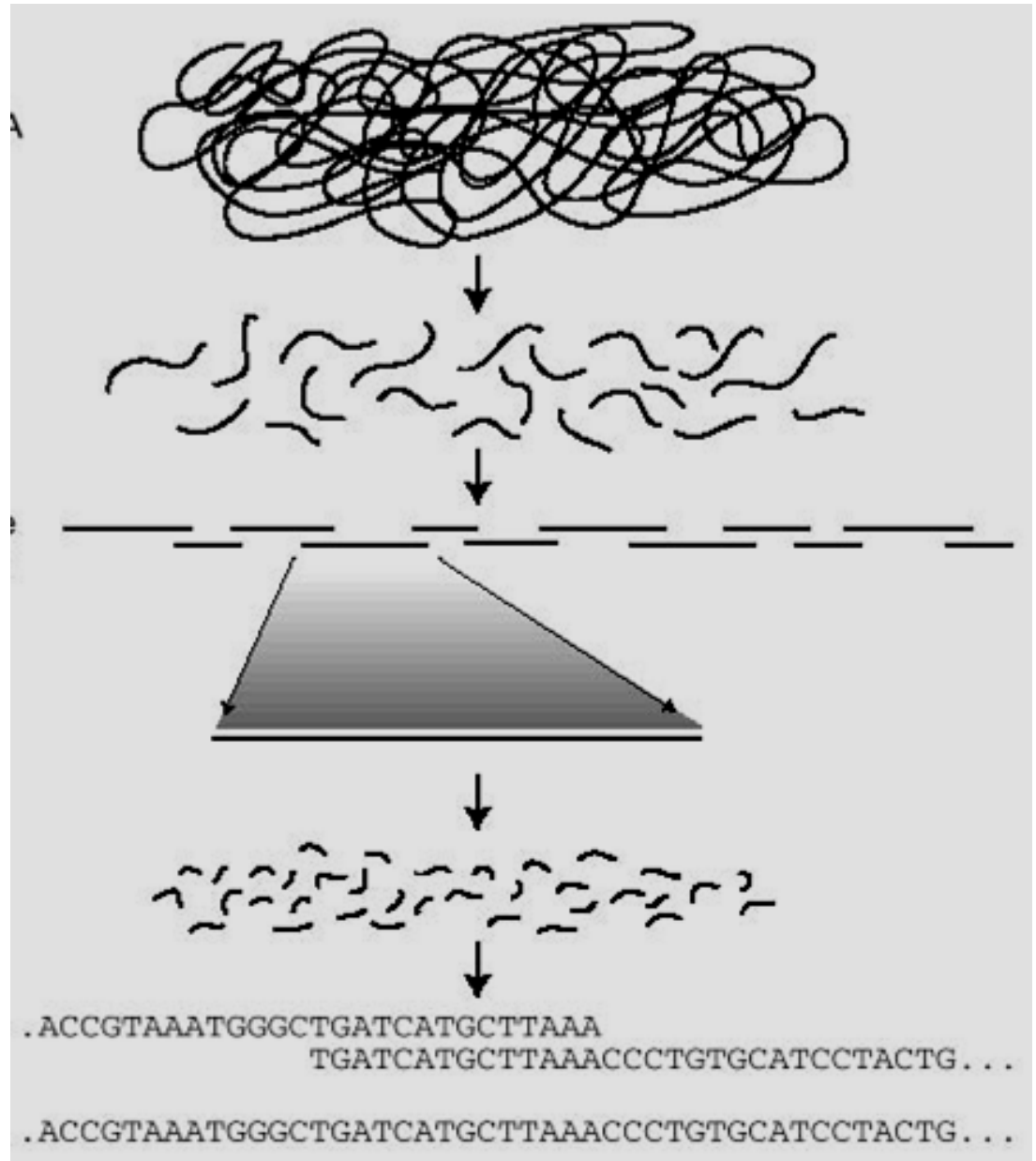
Seleção dos clones de BAC
para sequenciamento

Fragmentação e
clonagem

Geração de sub-bibliotecas dos
clones de BAC em plasmídeos

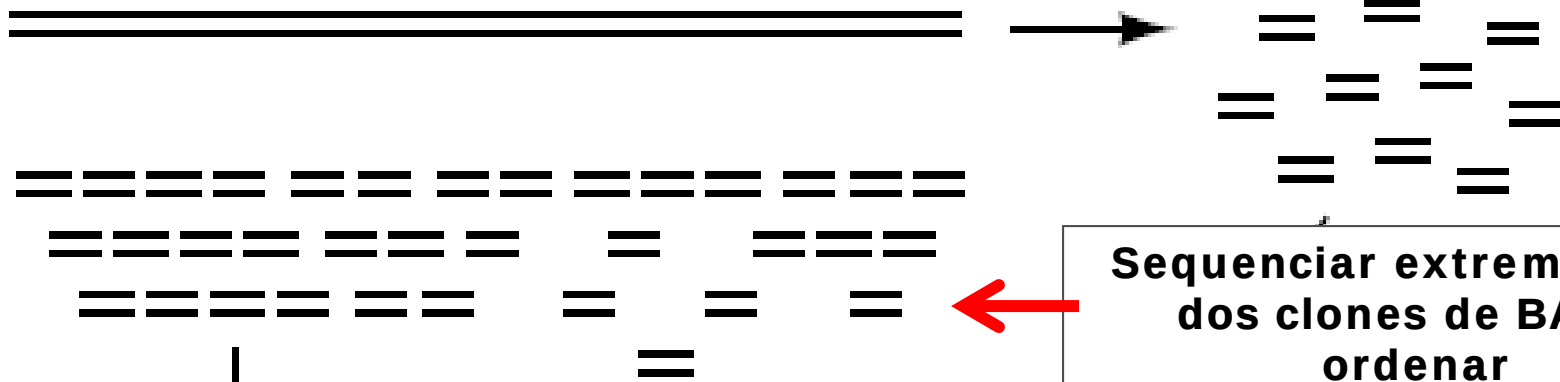
Sequenciamento dos clones
(sequenciamento shotgun)

Montagem (*in silico*)



DNA genômico

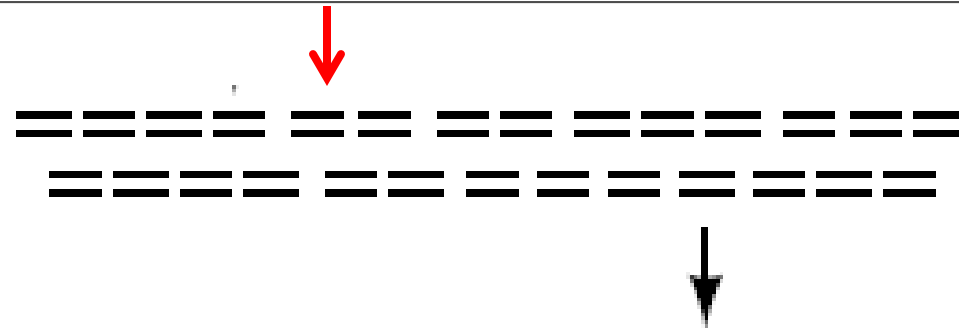
Fragmentar aleatoriamente e clonar os fragmentos em vetores do tipo BAC: biblioteca de BAC



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

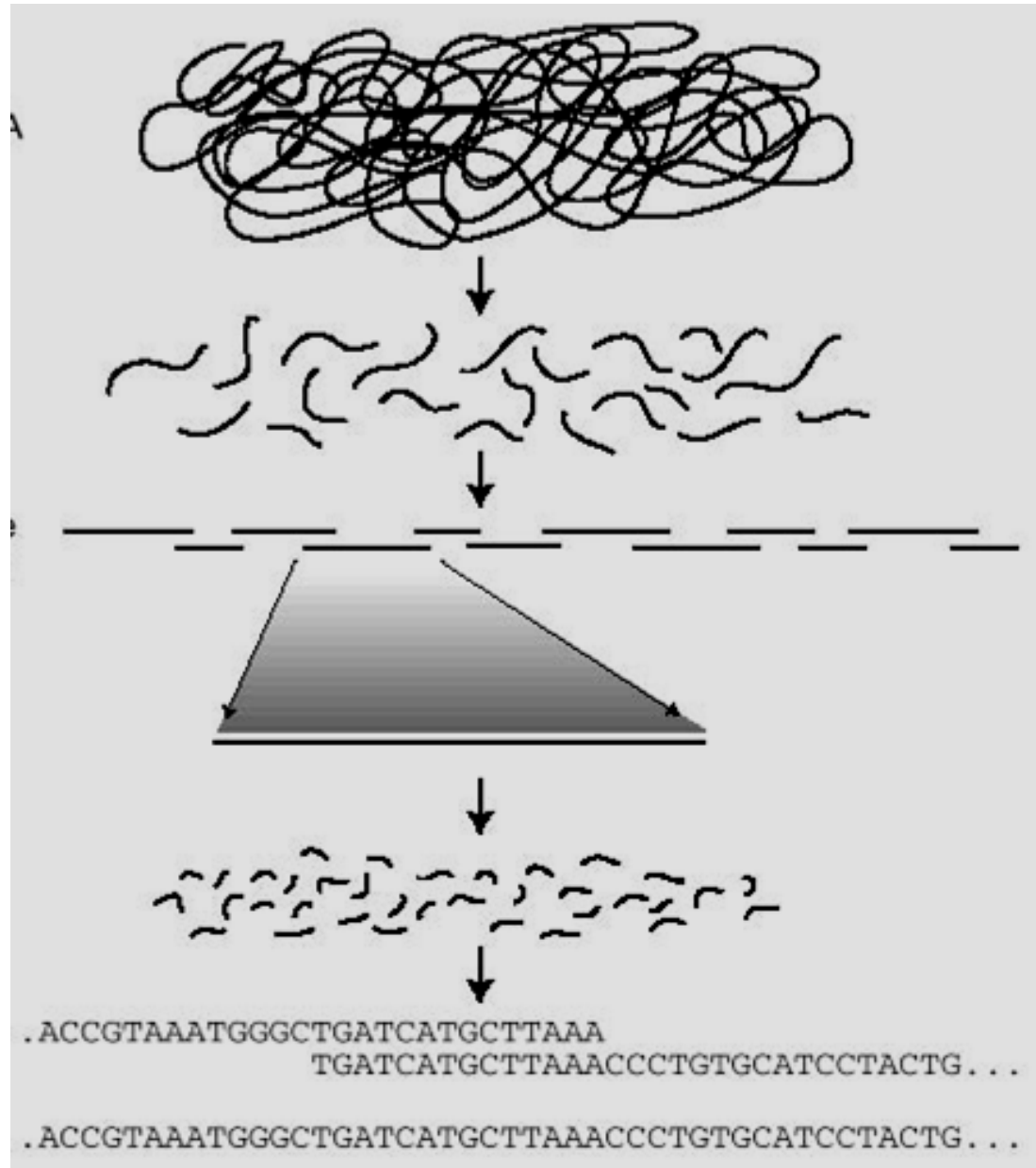
DNA genômico ou
bibliotecas de BAC

Fragmentação

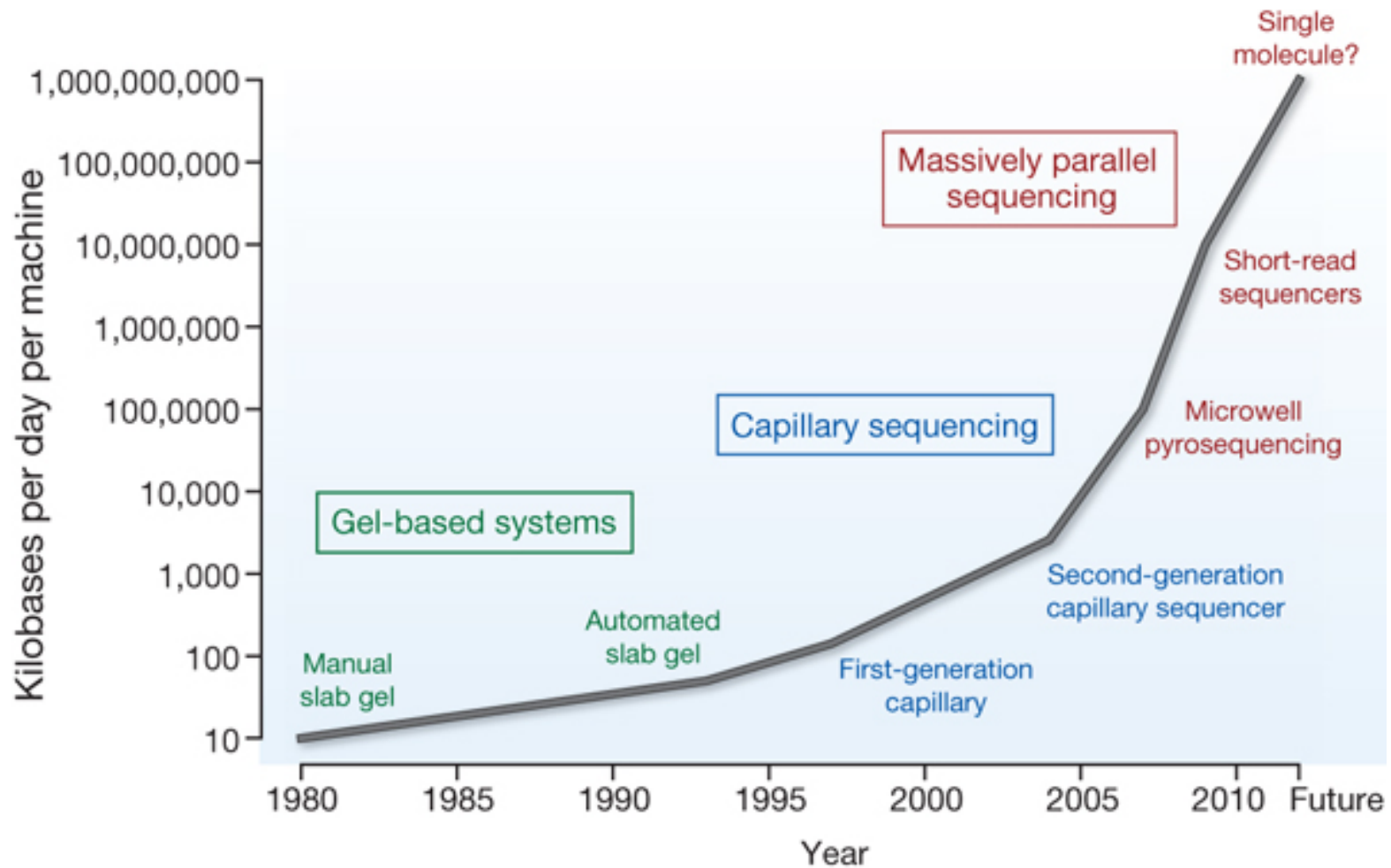
Amplificação
dos fragmentos

Sequenciamento

Montagem (*in silico*)



Evolução da tecnologia de sequenciamento de DNA



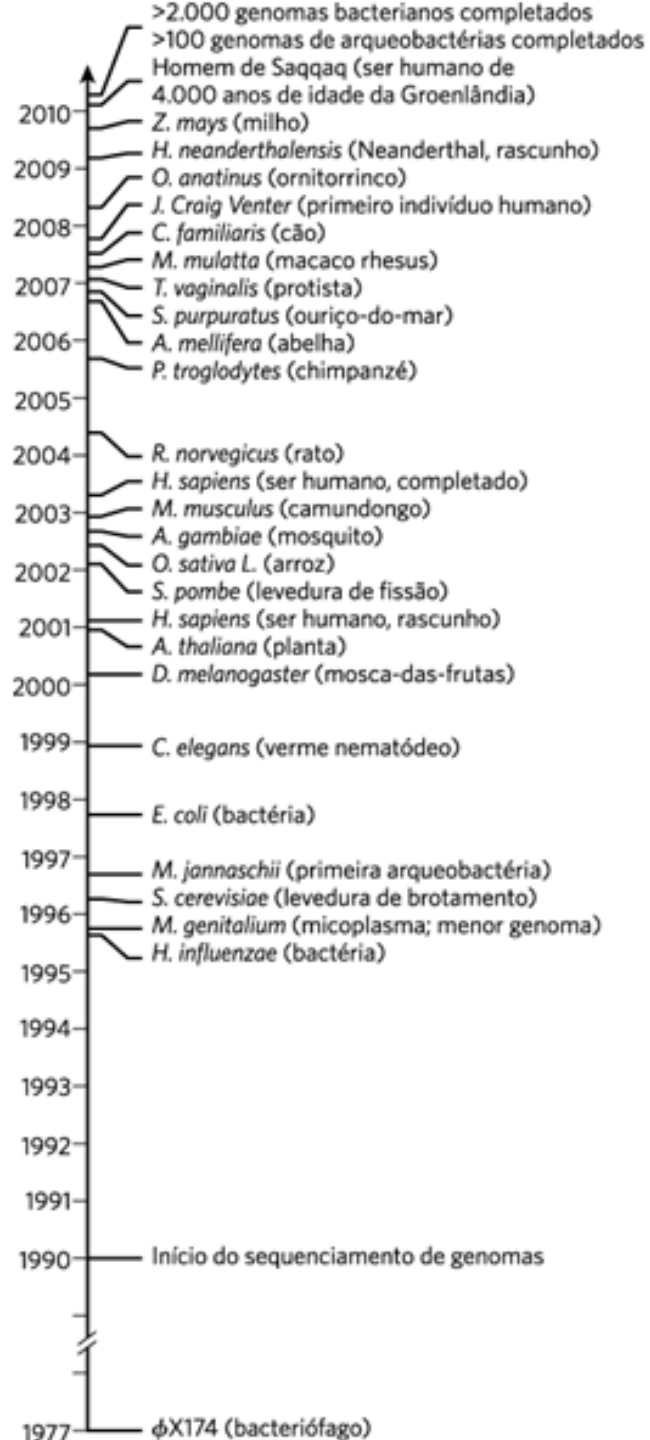
Aplicações de sequenciamento

- 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 mil dólares
 - Transcritoma humano
 - Medicina personalizada
 - Diagnóstico de doenças infecciosas

Sequenciamento e comparação de sequências genômicas de indivíduos



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

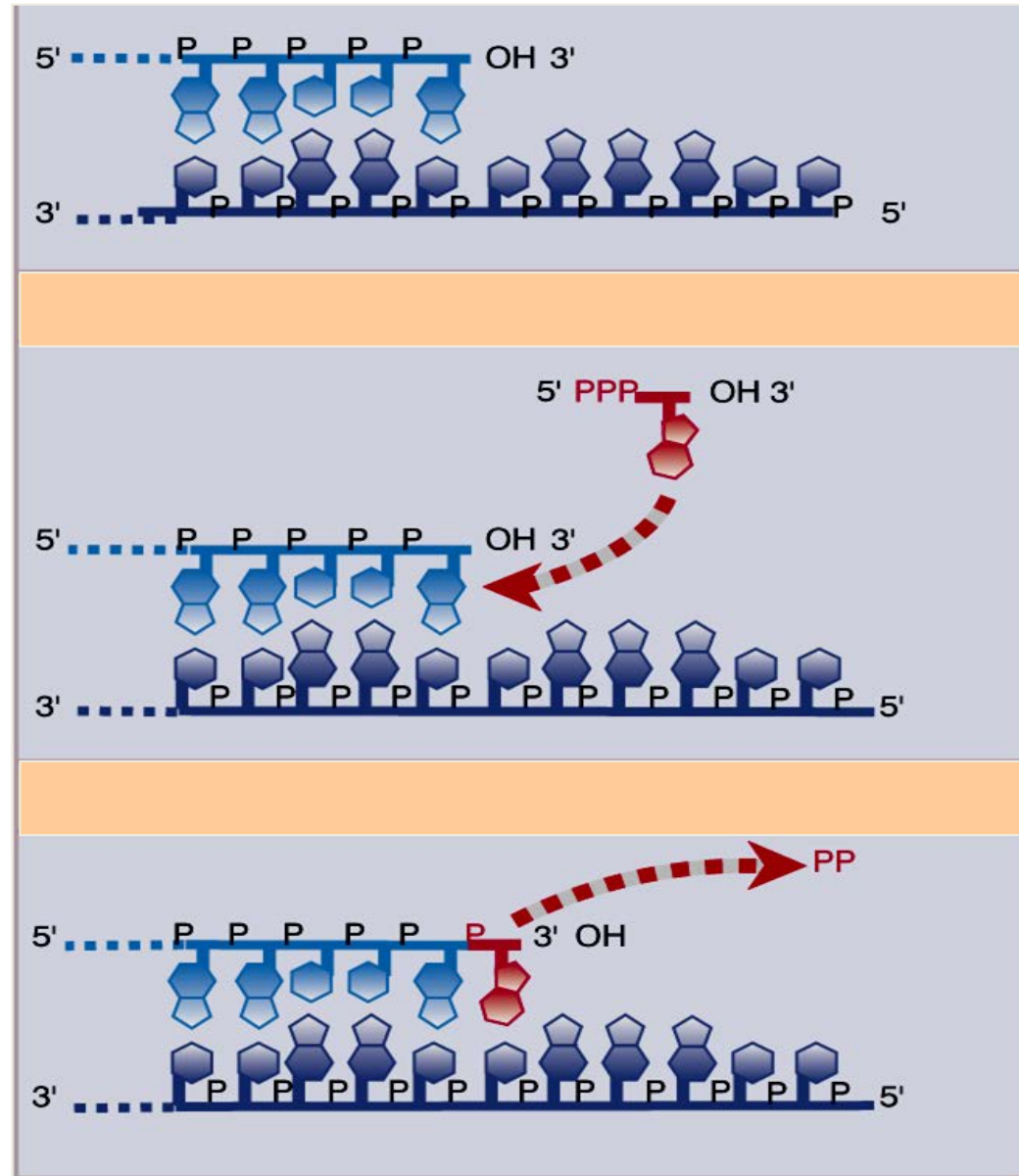
- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos a extremidade 3'OH da cadeia em crescimento.

- 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

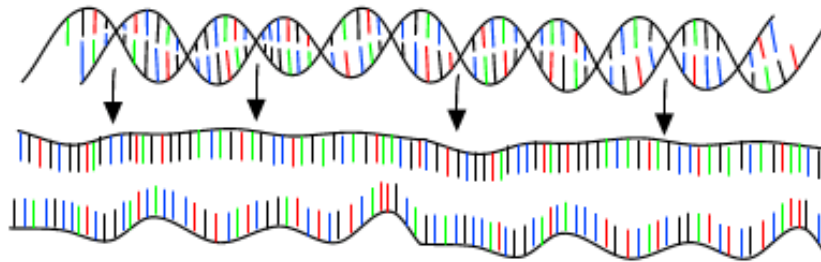
- O DNA **molde** que contém a região do DNA que se deseja amplificar (o alvo)
- Dois **primers** que são complementares às pontas 3' da fita senso e da fita anti-senso do DNA alvo
- Polimerase Taq que funcione a 70 °C
- *Deoxinucleosídeos trifosfato* (dNTPs) ou seja, nucleotídeos contendo grupos trifosfato
- 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

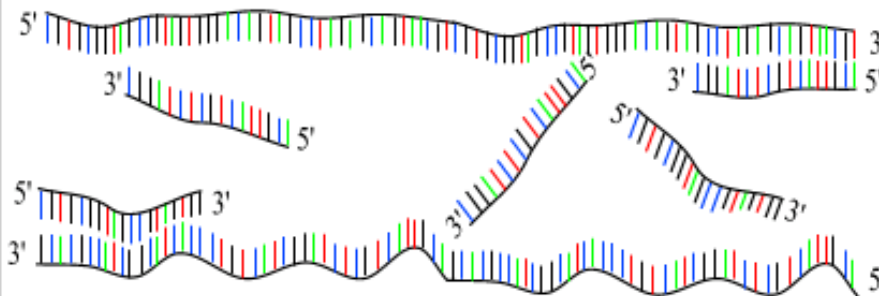
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

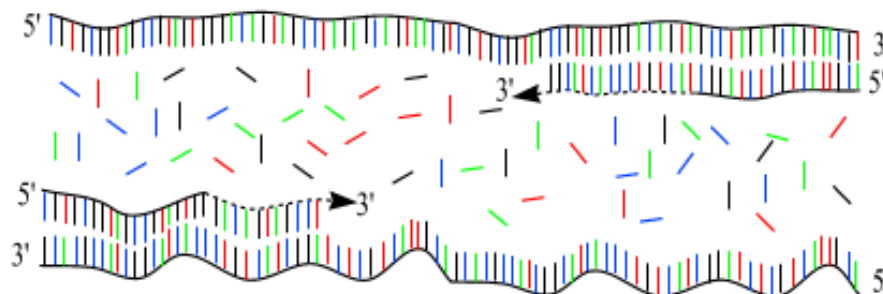
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse
primers !!!



Step 3 : extension

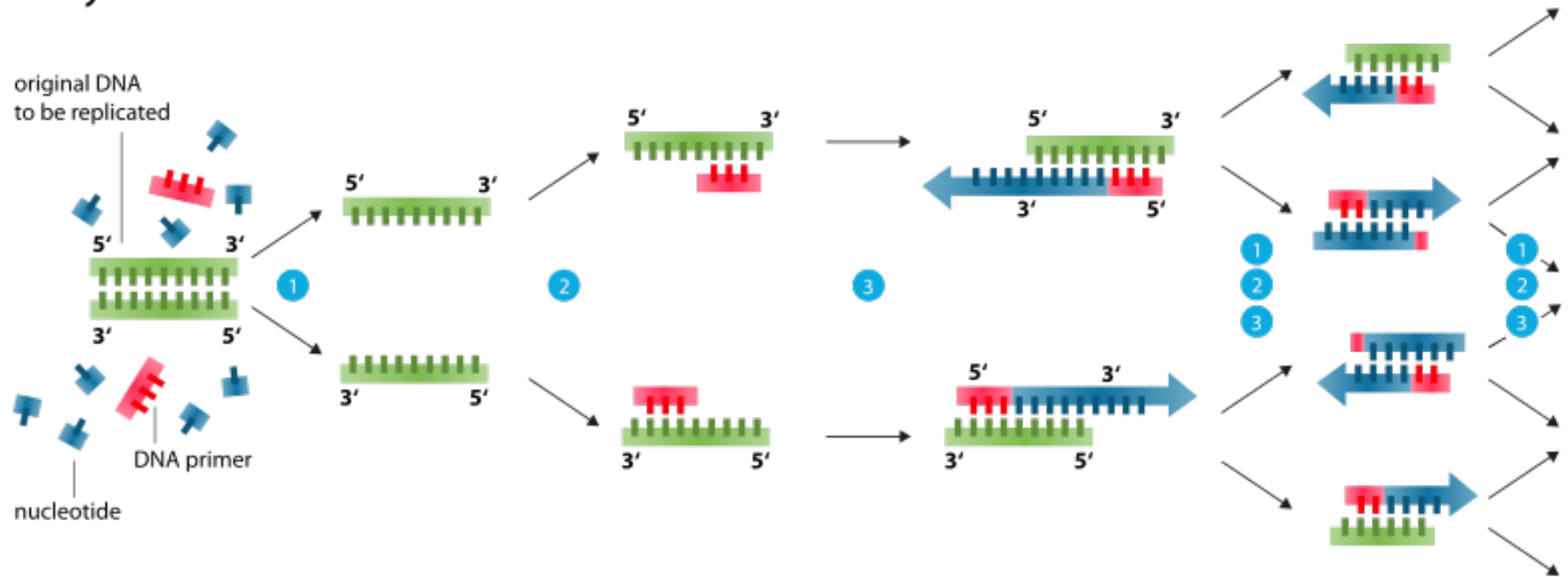
2 minutes 72 °C

only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

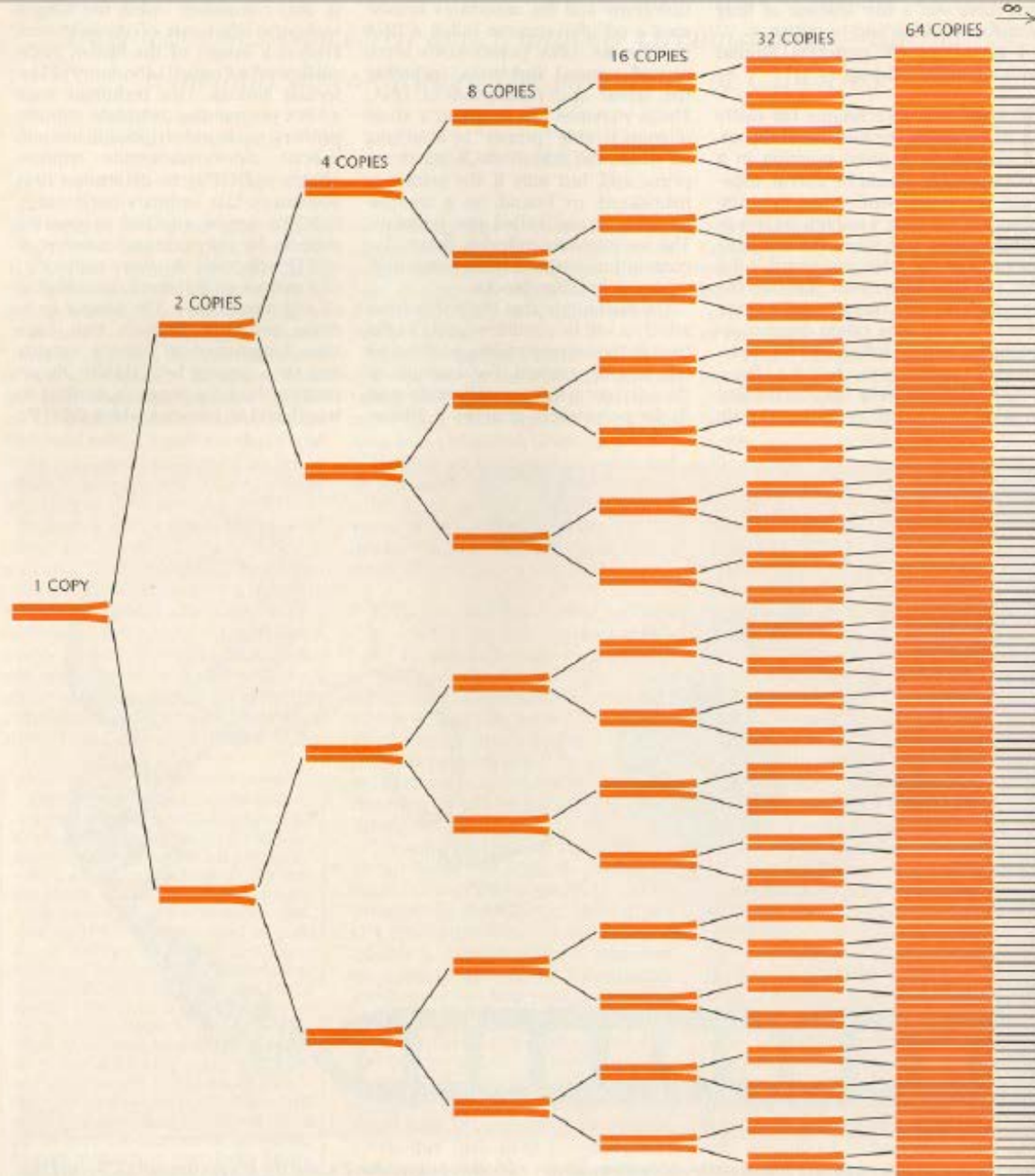
- Matematicamente, se começássemos com **uma única molécula**, teríamos no final
 - Entre 2^{30} e 2^{40} moléculas

Polymerase chain reaction - PCR



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

Fonte: wikipedia



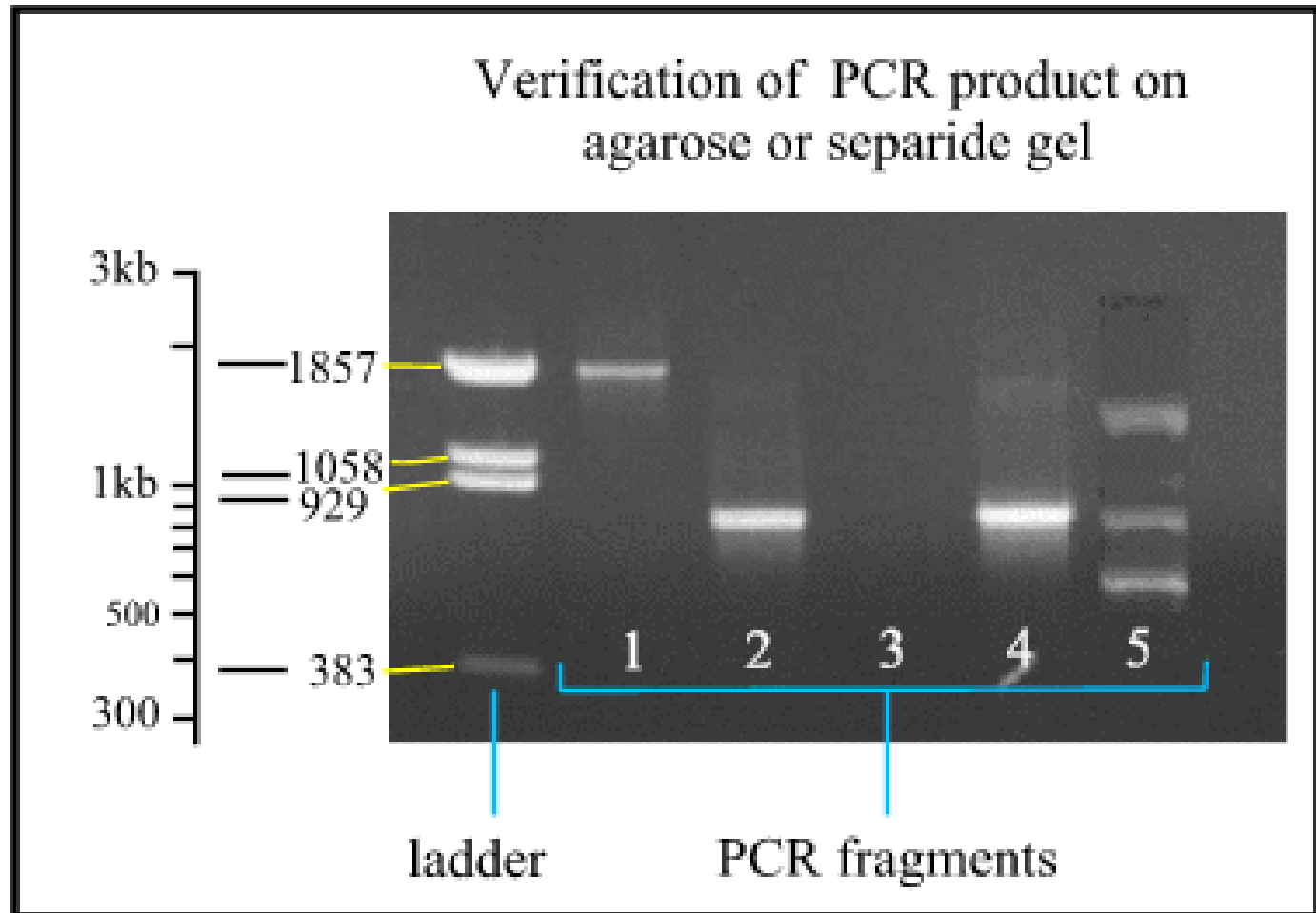
POLYMERASE CHAIN REACTION is a simple technique for copying a piece of DNA in the laboratory with readily available reagents. Because the number of copies increases exponentially, more than 100 billion can be made in only a few hours.

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