

Prof. João Carlos Setubal

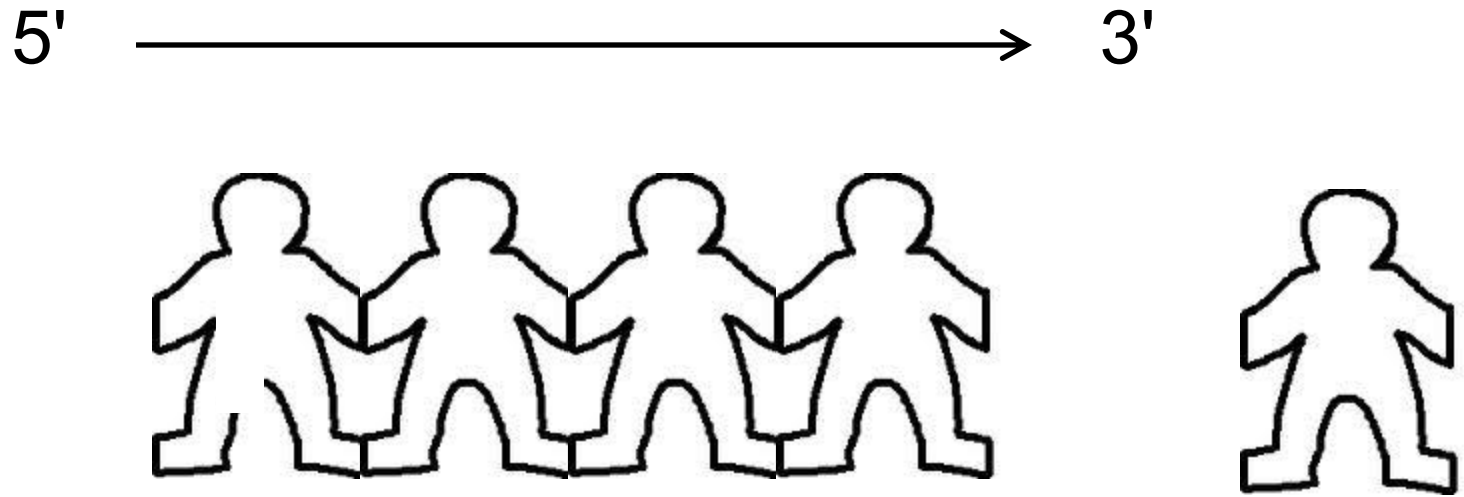
QBQ 204 – Aula 6 (biomol)

Sequenciamento de DNA e PCR

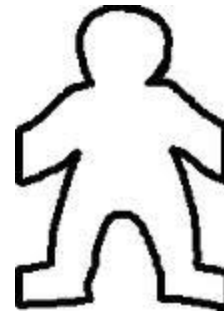
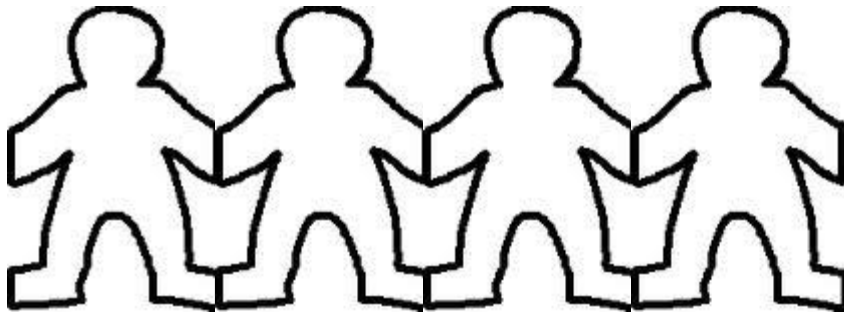


Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Replicação de DNA

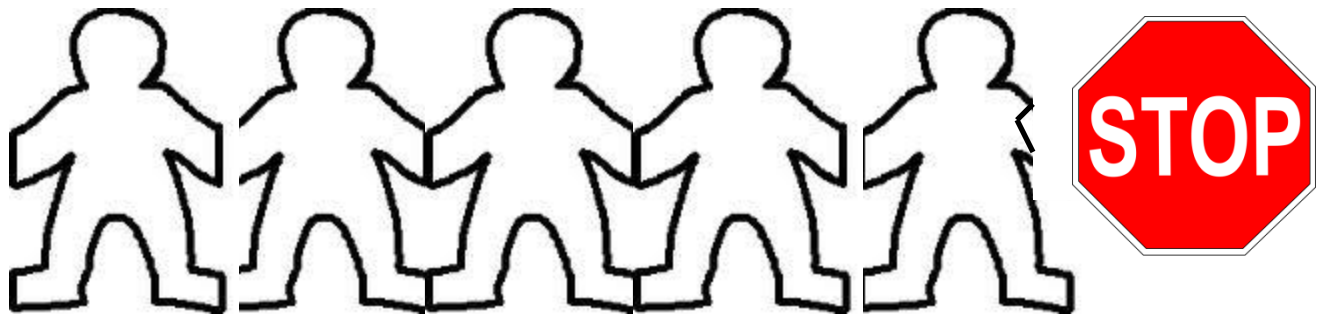


Se um dos nucleotídeos for
“defeituoso”...



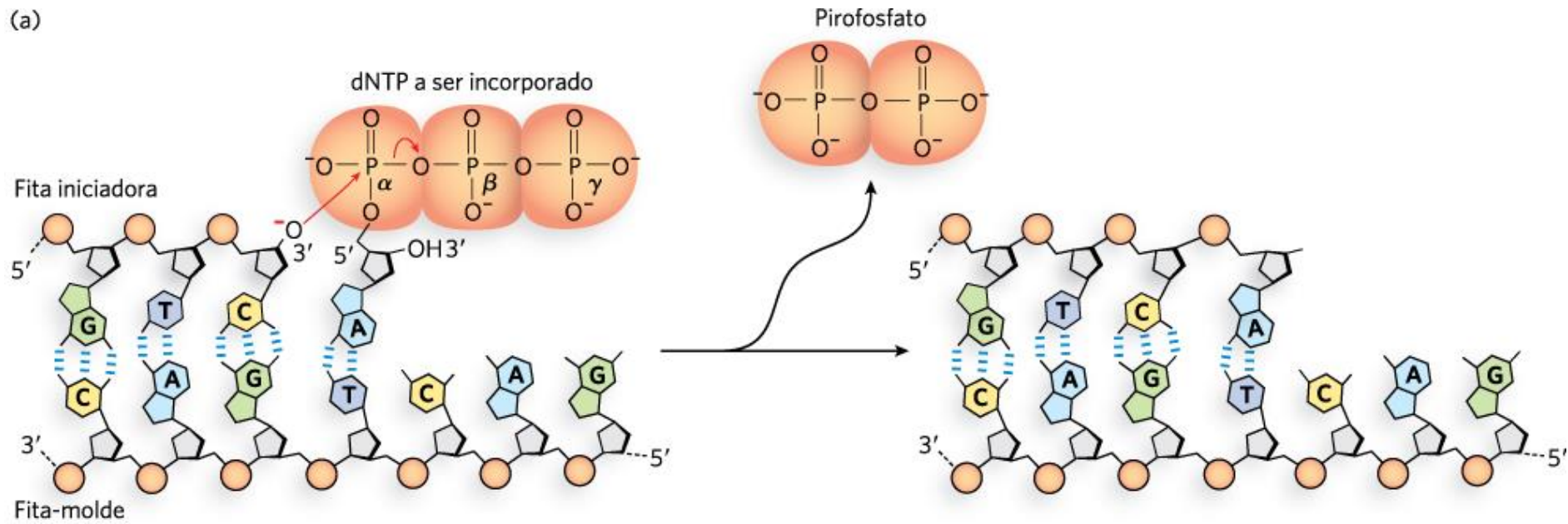
<

A replicação pára

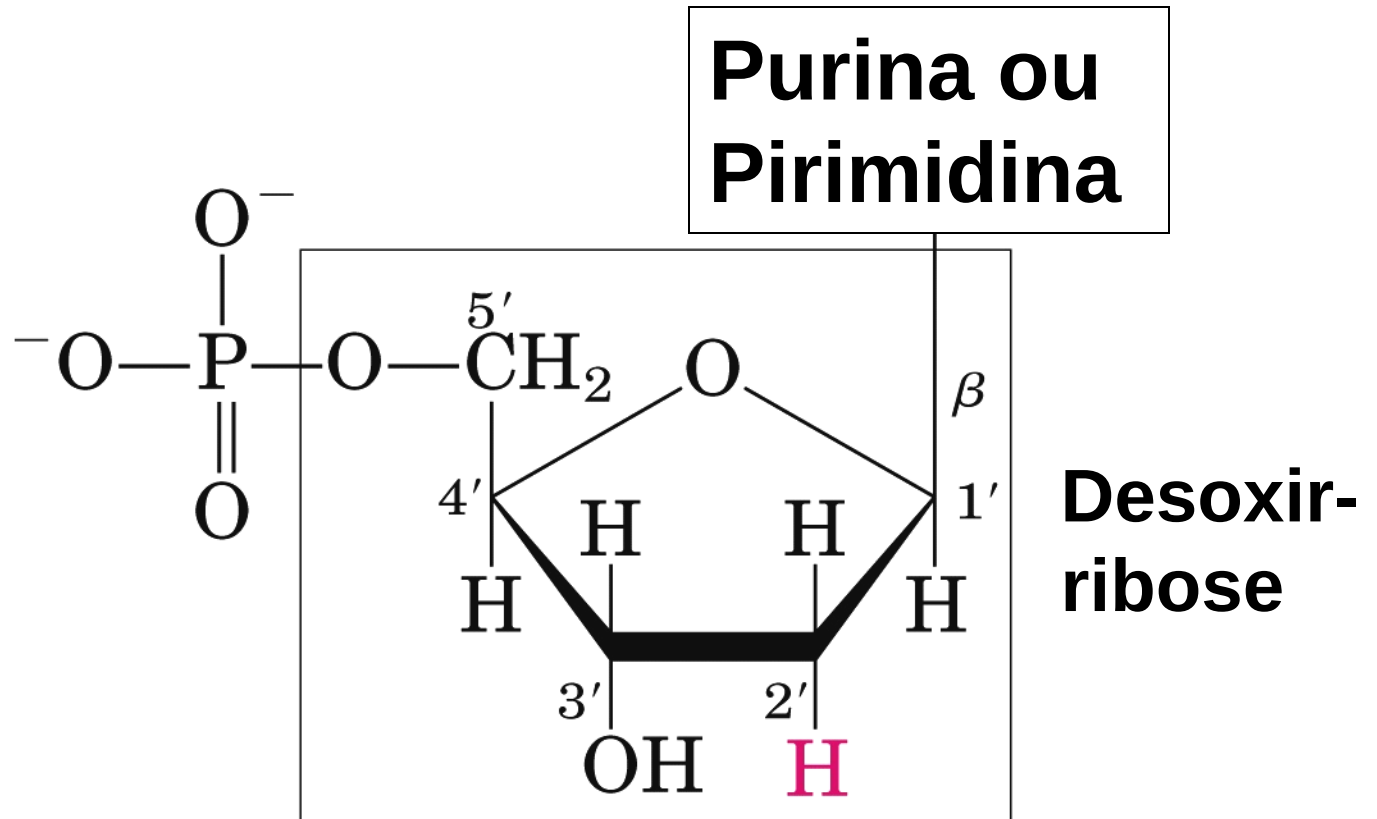


Reação da DNA Polimerase com dNTPs → síntese de DNA

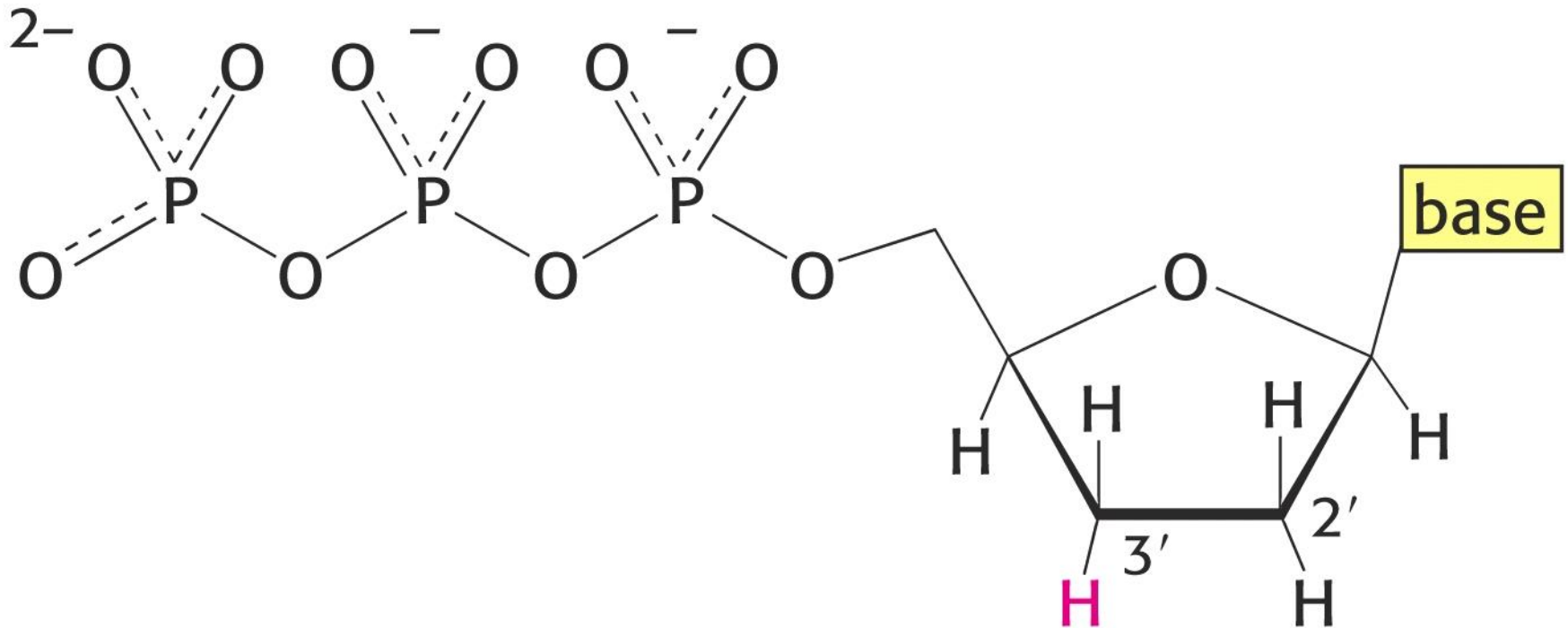
(a)



Fosfato



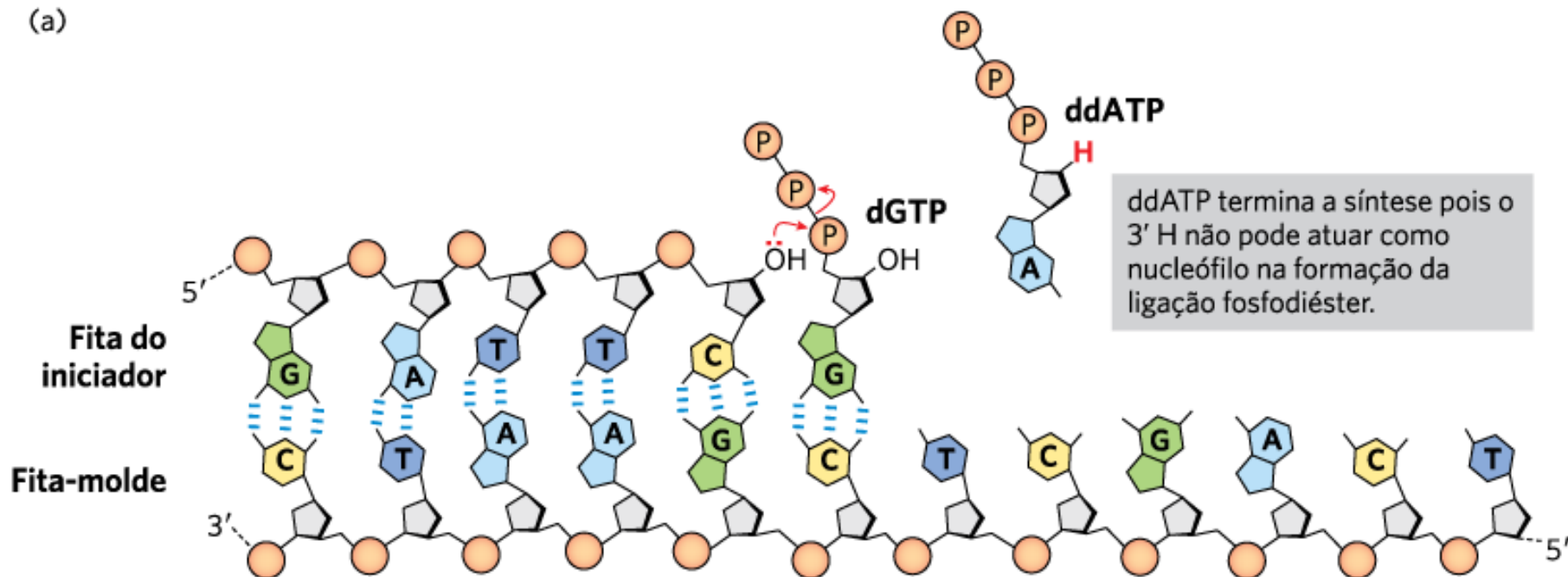
Desoxirribonucleotídeo



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

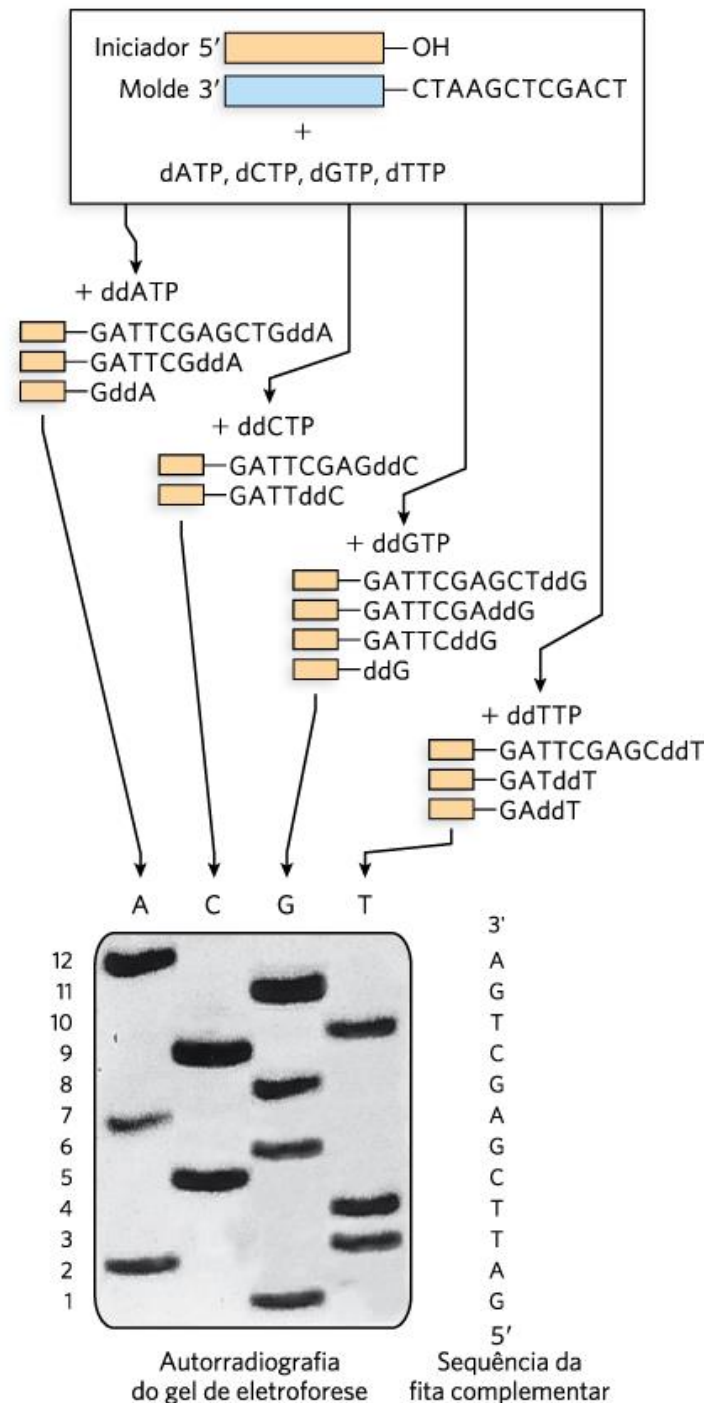
Reação da DNA Polimerase com dNTPs + ddNTPs → interrupção da síntese de DNA

(a)



Método de Sanger:

terminação controlada da síntese de DNA com dideoxirribonucleotídeos



DNA a ser sequenciado

3' — GAATTCGCTAATGC —
5' — CTTAA

primer radioativo

DNA polymerase I

Labeled dATP, dTTP,
dCTP, dGTP

Dideoxy analog of dATP **ddATP**

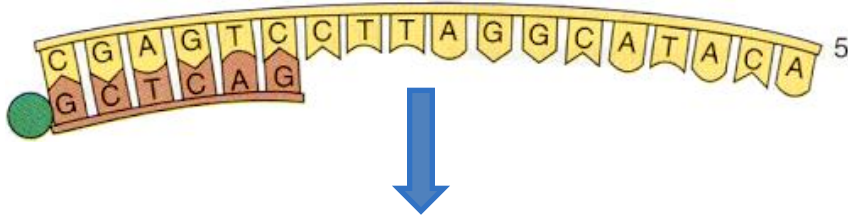
3' — GAATTCGCTAATGC —
5' — CTTAAGCGATT**A**

+

3' — GAATTCGCTAATGC —
5' — CTTAAGCG**A**

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

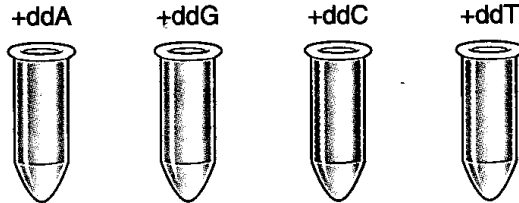
Método de Sanger



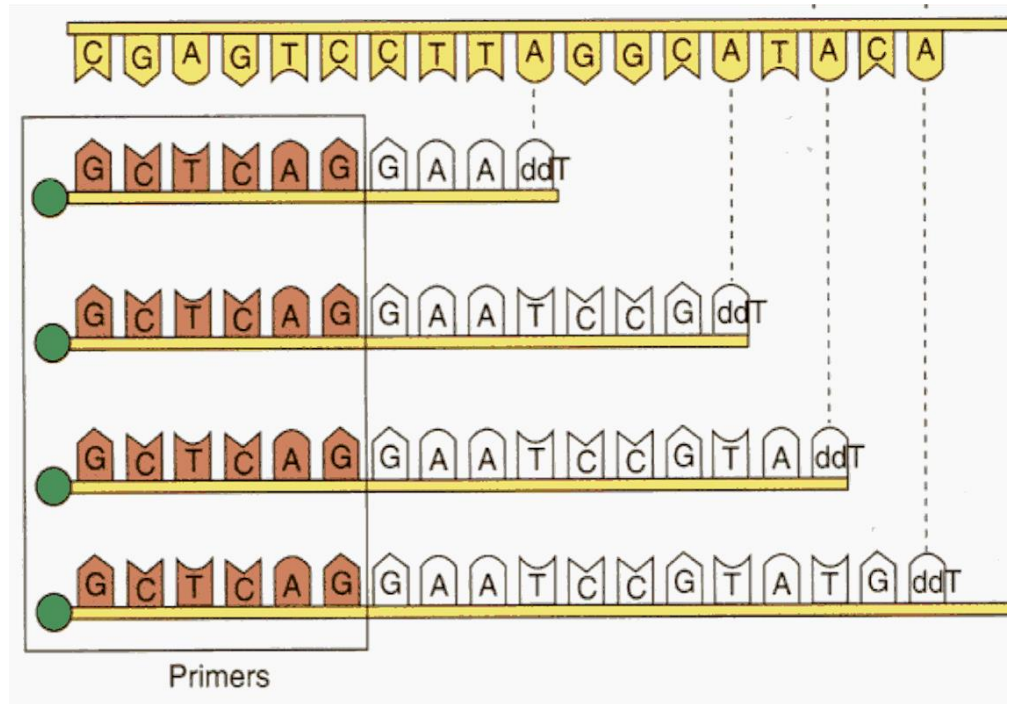
Desnaturação da dupla fita
Anelamento do "primer radioativo"

dNTP's and DNA polymerase

Adição da enzima e dNTPs



Terminação da síntese: adição dos ddNTPs



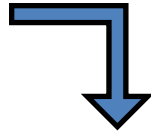
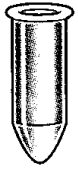
dNTP's and DNA polymerase

+ddA

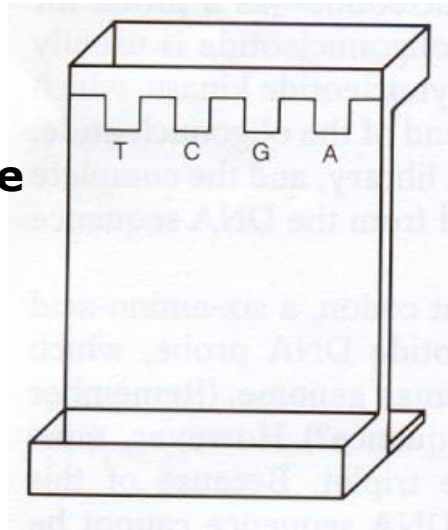
+ddG

+ddC

+ddT

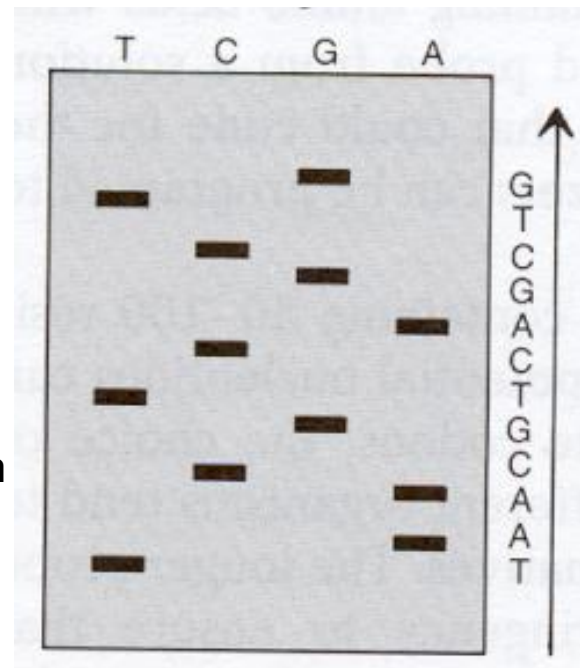
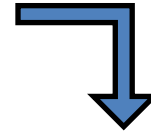


**Eletroforese em gel de
poliacrilamida
desnaturante**



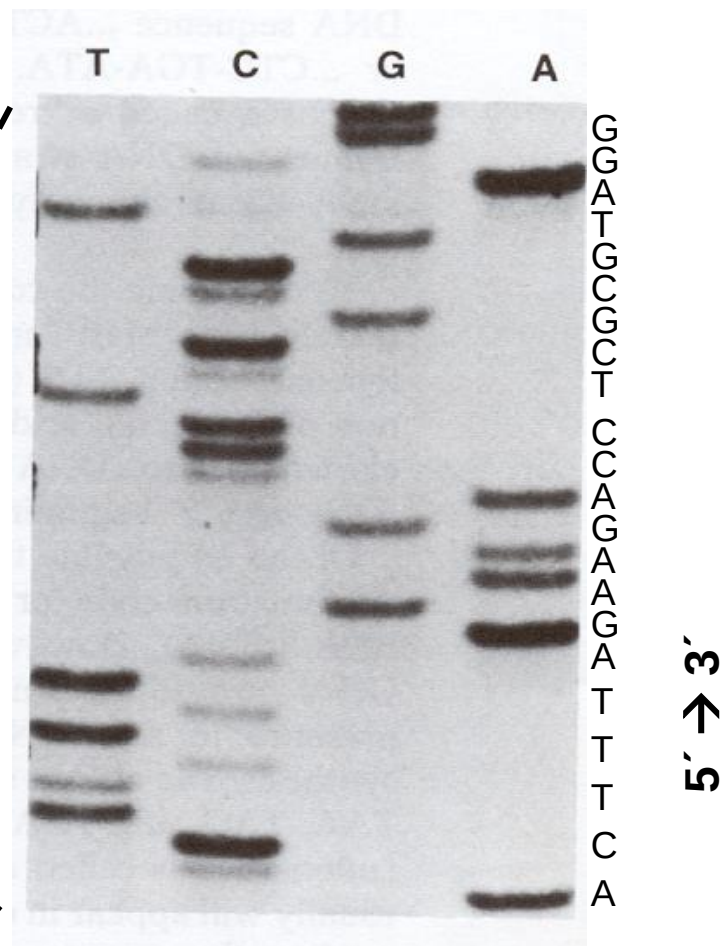
Autorradiografia

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

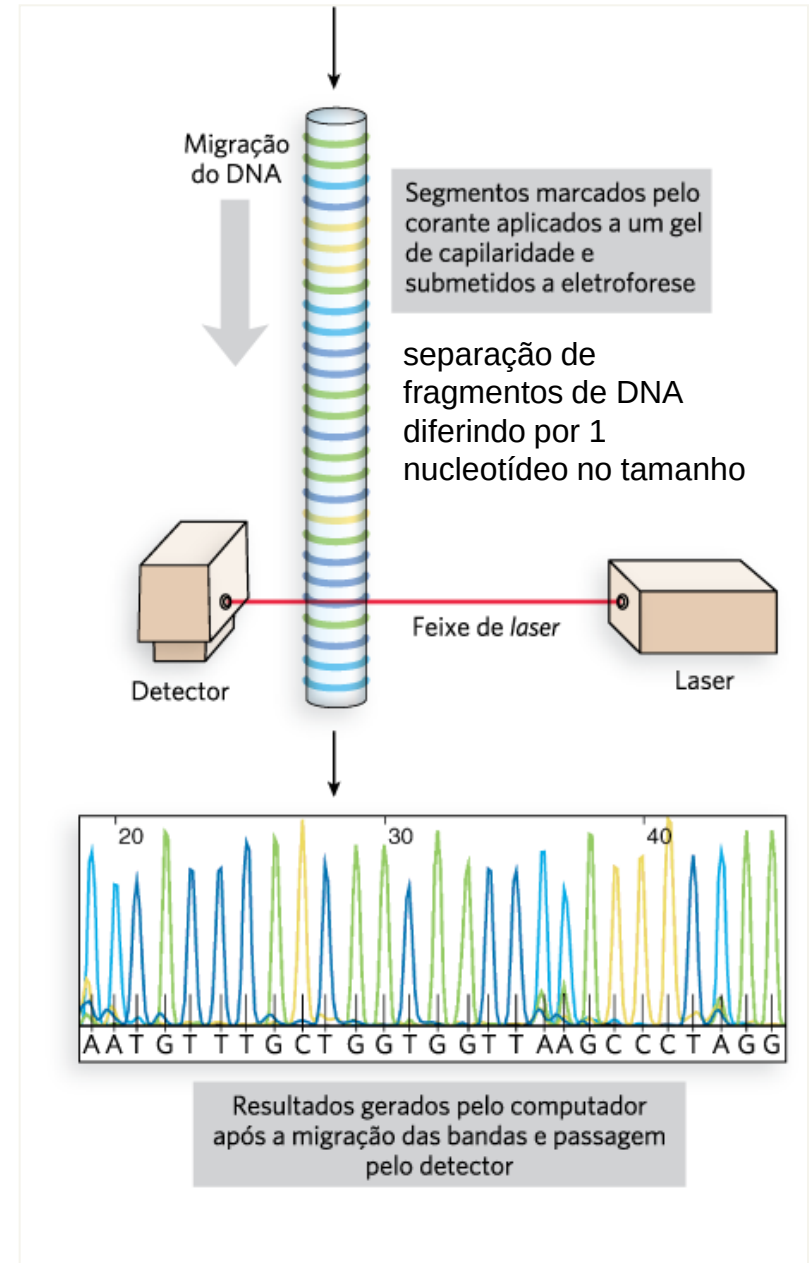
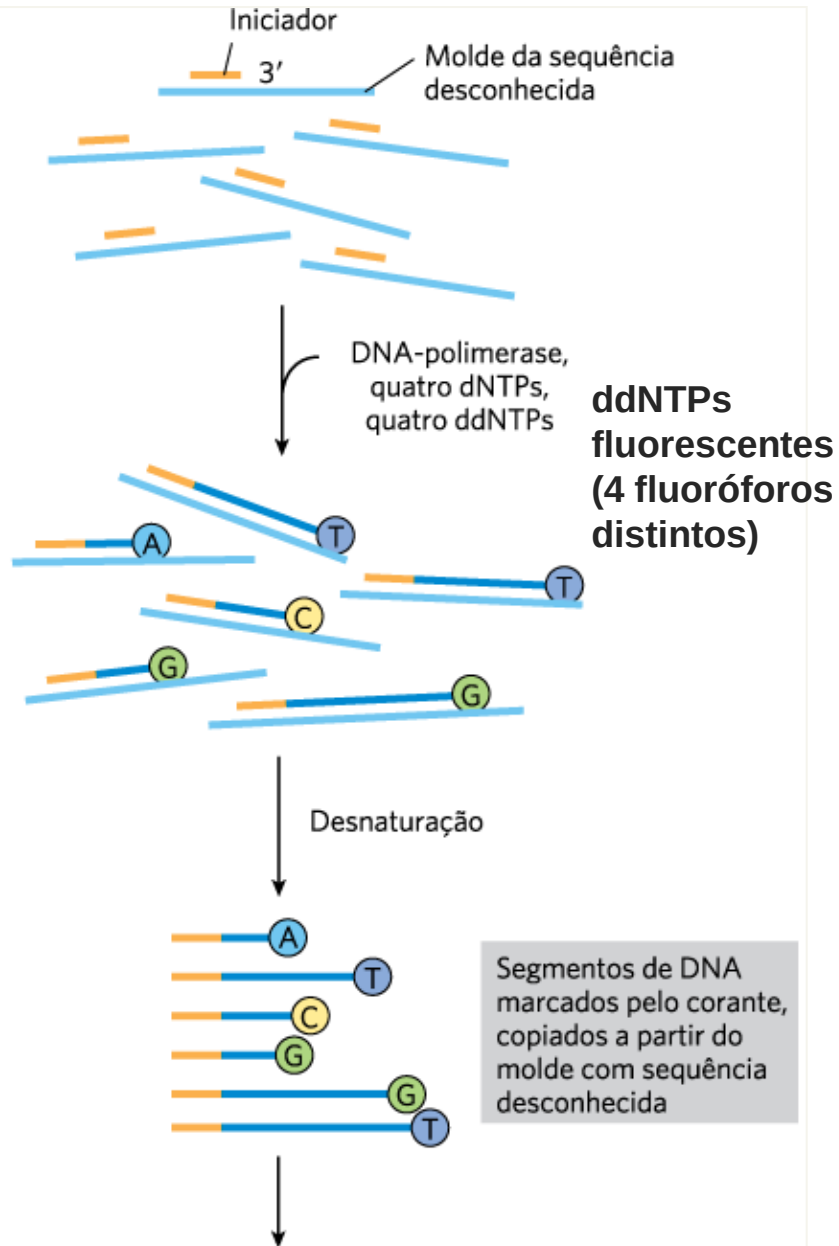


**Sequência complementar
ao DNA molde**

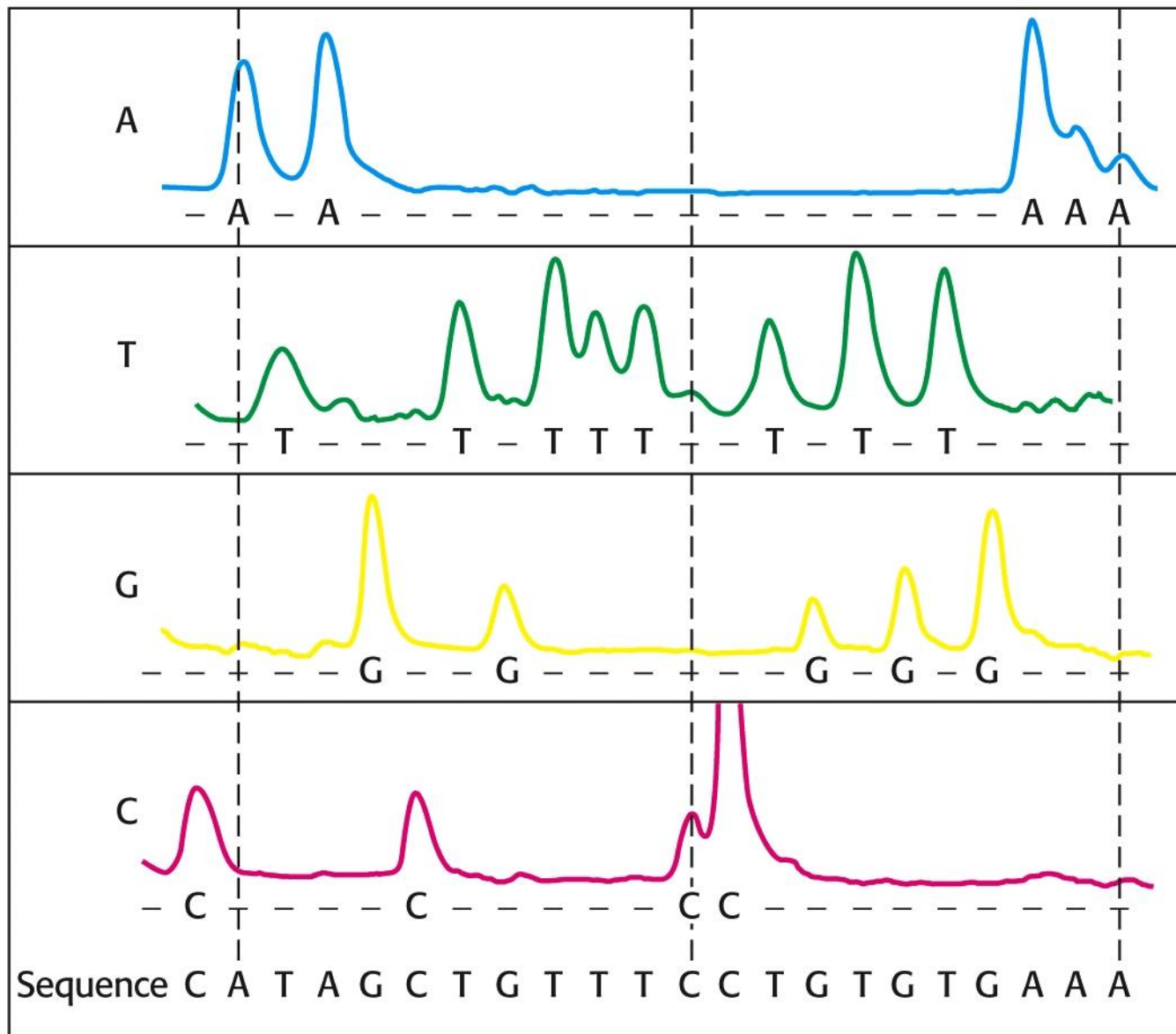
Autorradiograma de um gel de sequenciamento de DNA



Automação do Sequenciamento pelo Método de Sanger

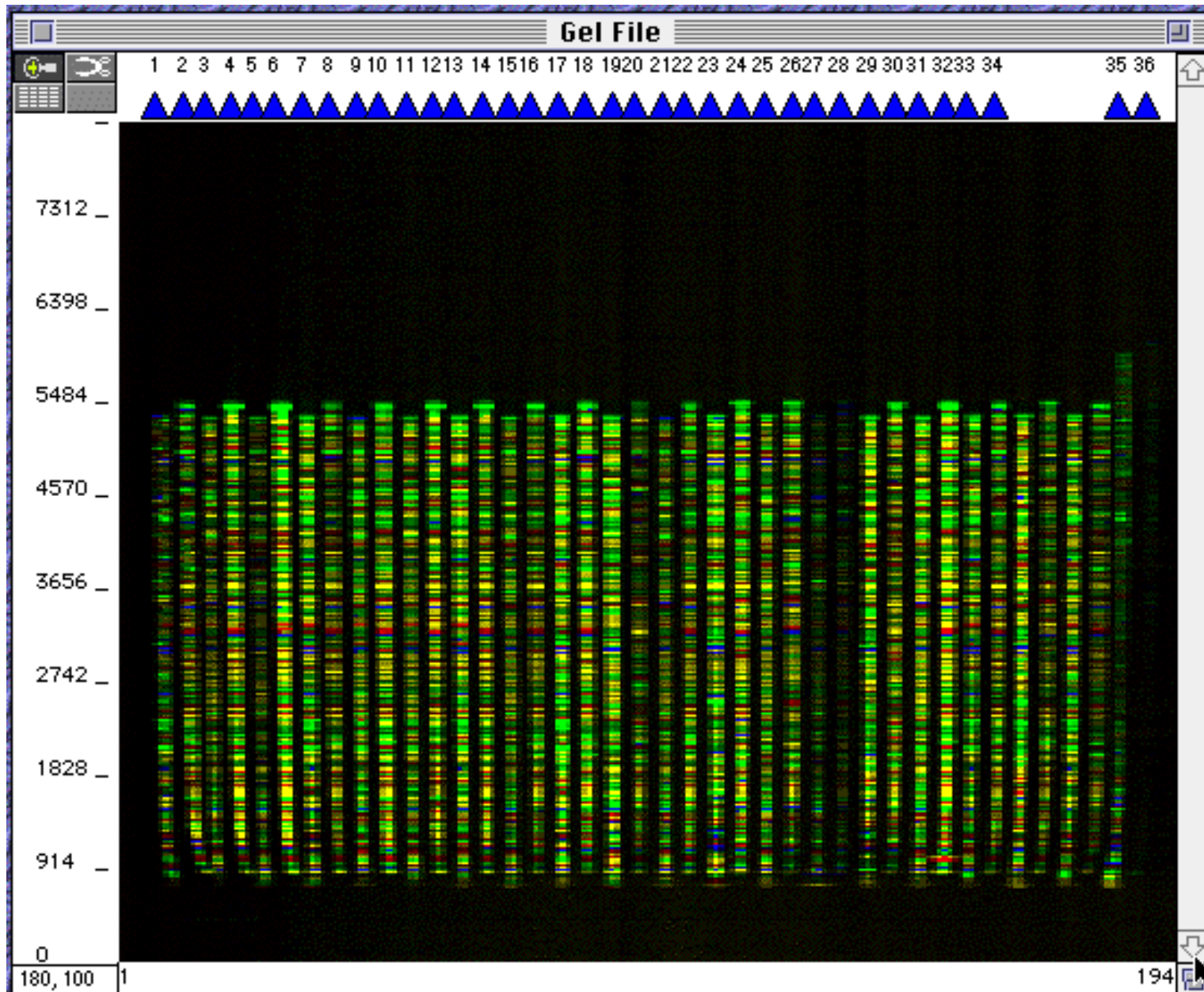


Intensidade de fluorescência

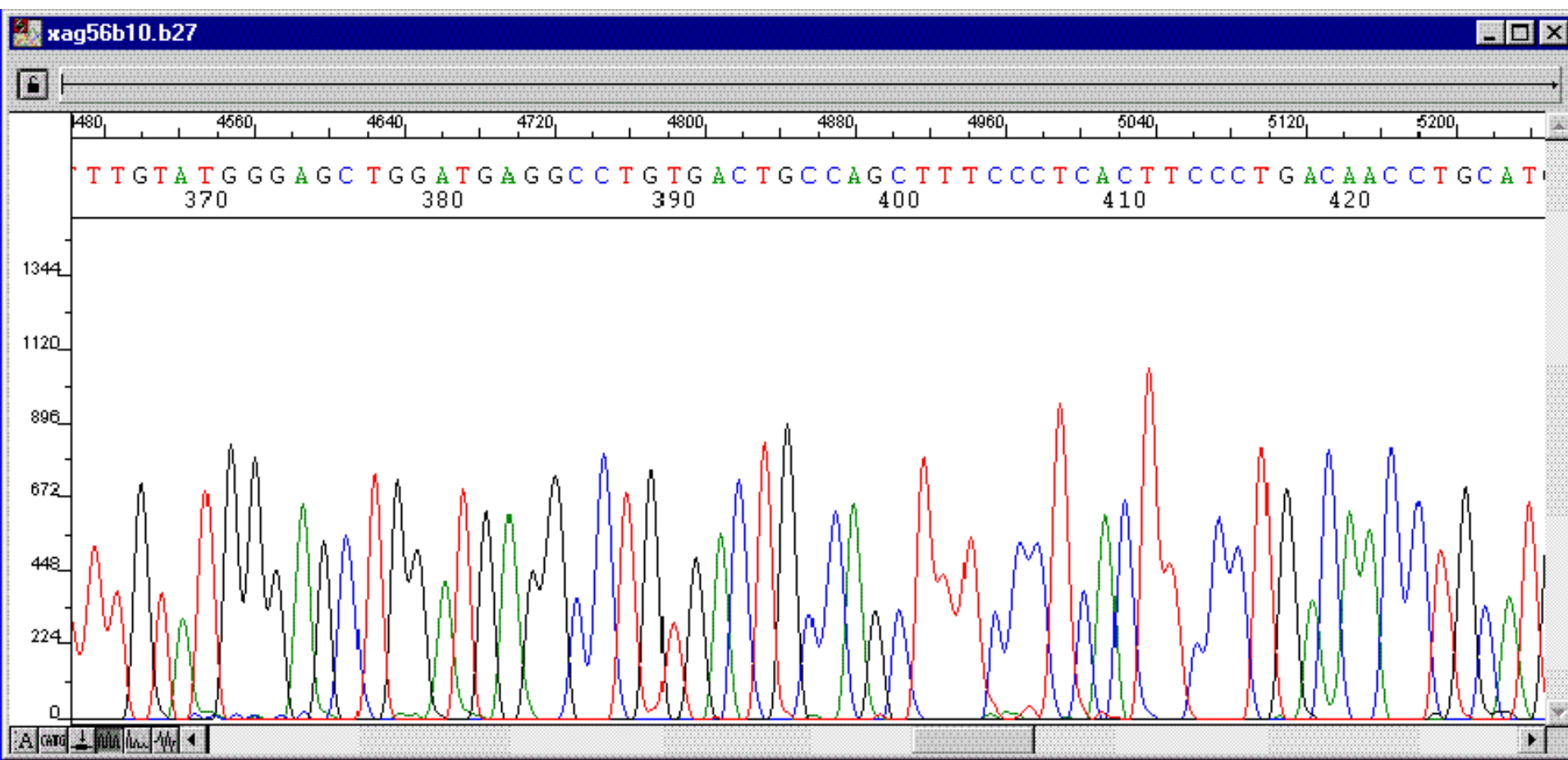


Tamanho em nucleotídeos (bases)

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

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

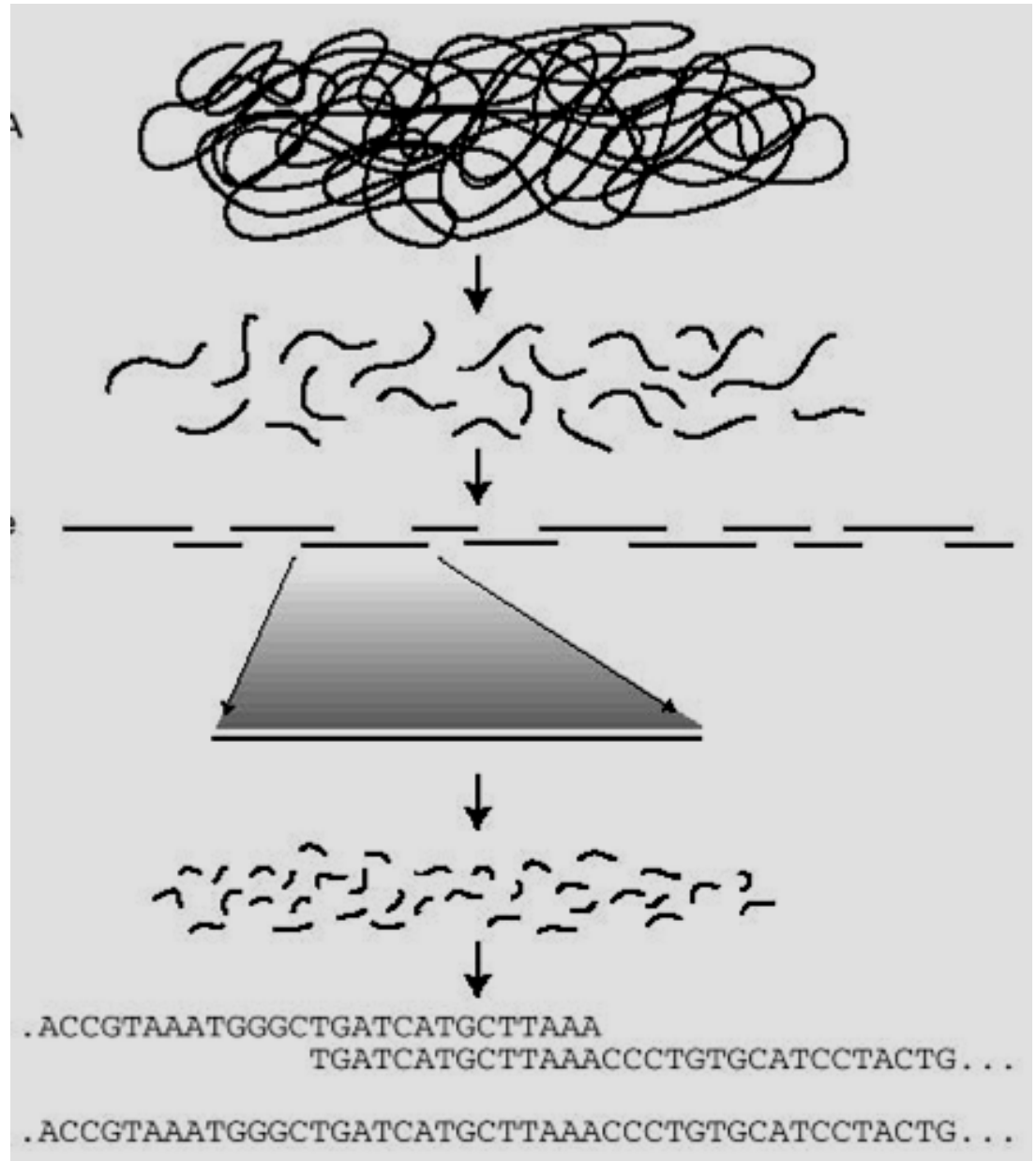
Seleção dos clones de BAC
para sequenciamento

Fragmentação e
clonagem

Geração de sub-bibliotecas dos
clones de BAC em plasmídeos

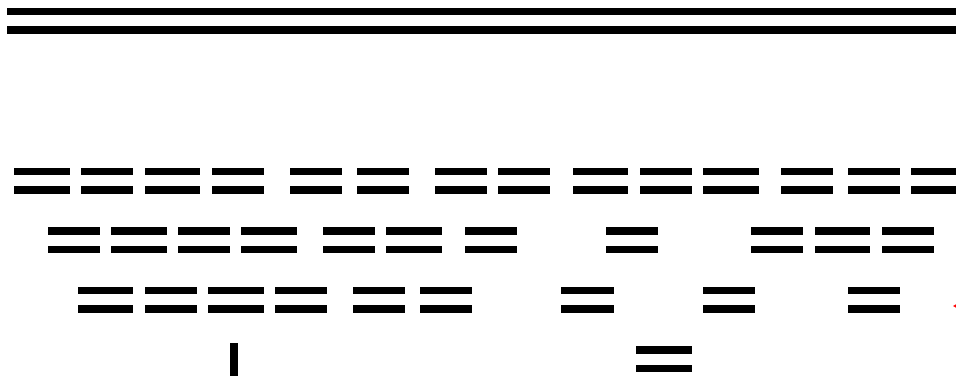
Sequenciamento dos clones
(sequenciamento shotgun)

Montagem (*in silico*)



DNA genômico

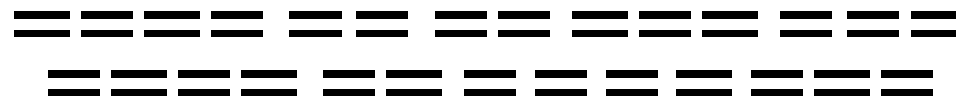
Fragmentar aleatoriamente e clonar os fragmentos em vetores do tipo BAC: biblioteca de BAC



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



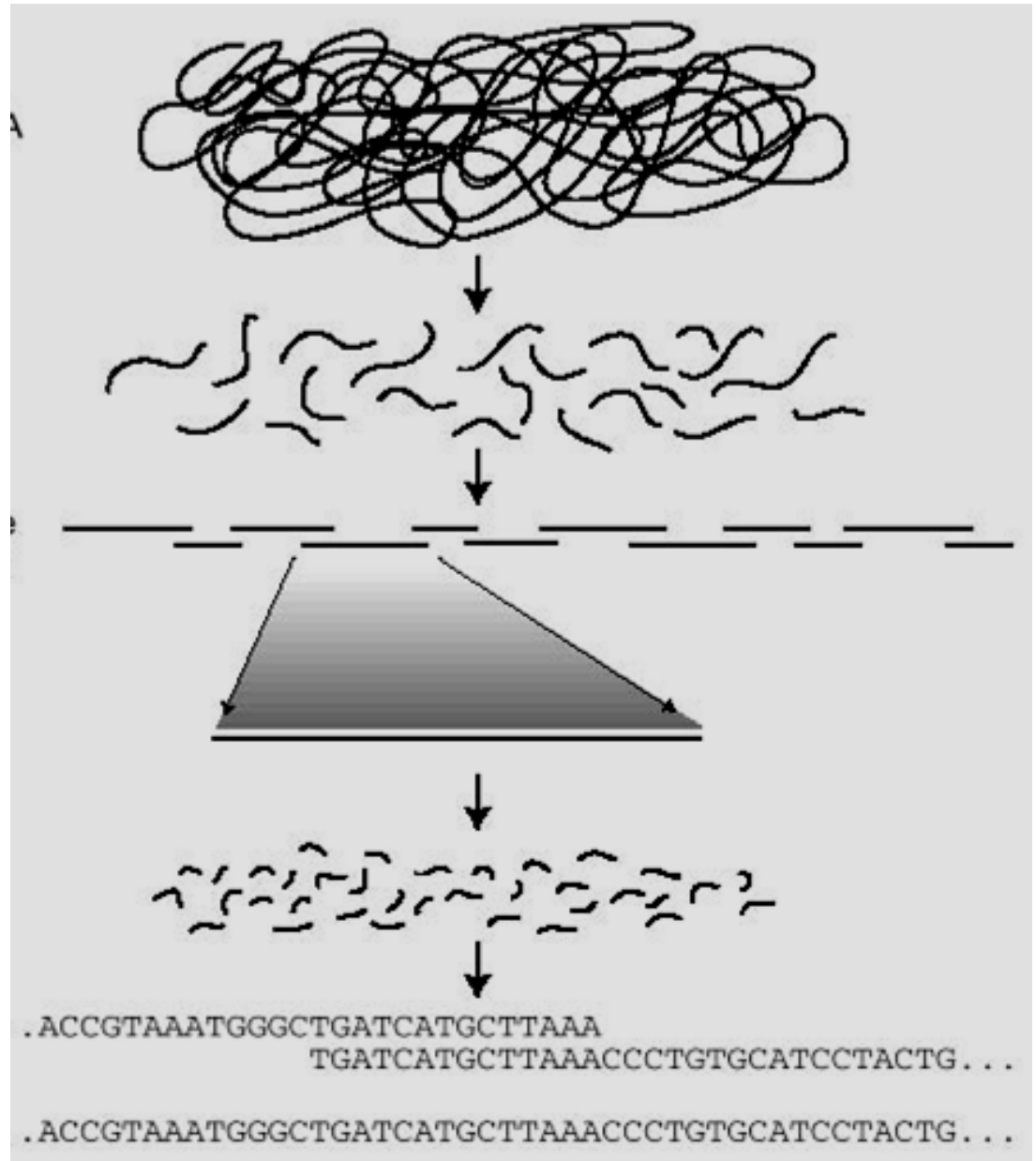
**Amplificação
dos fragmentos**



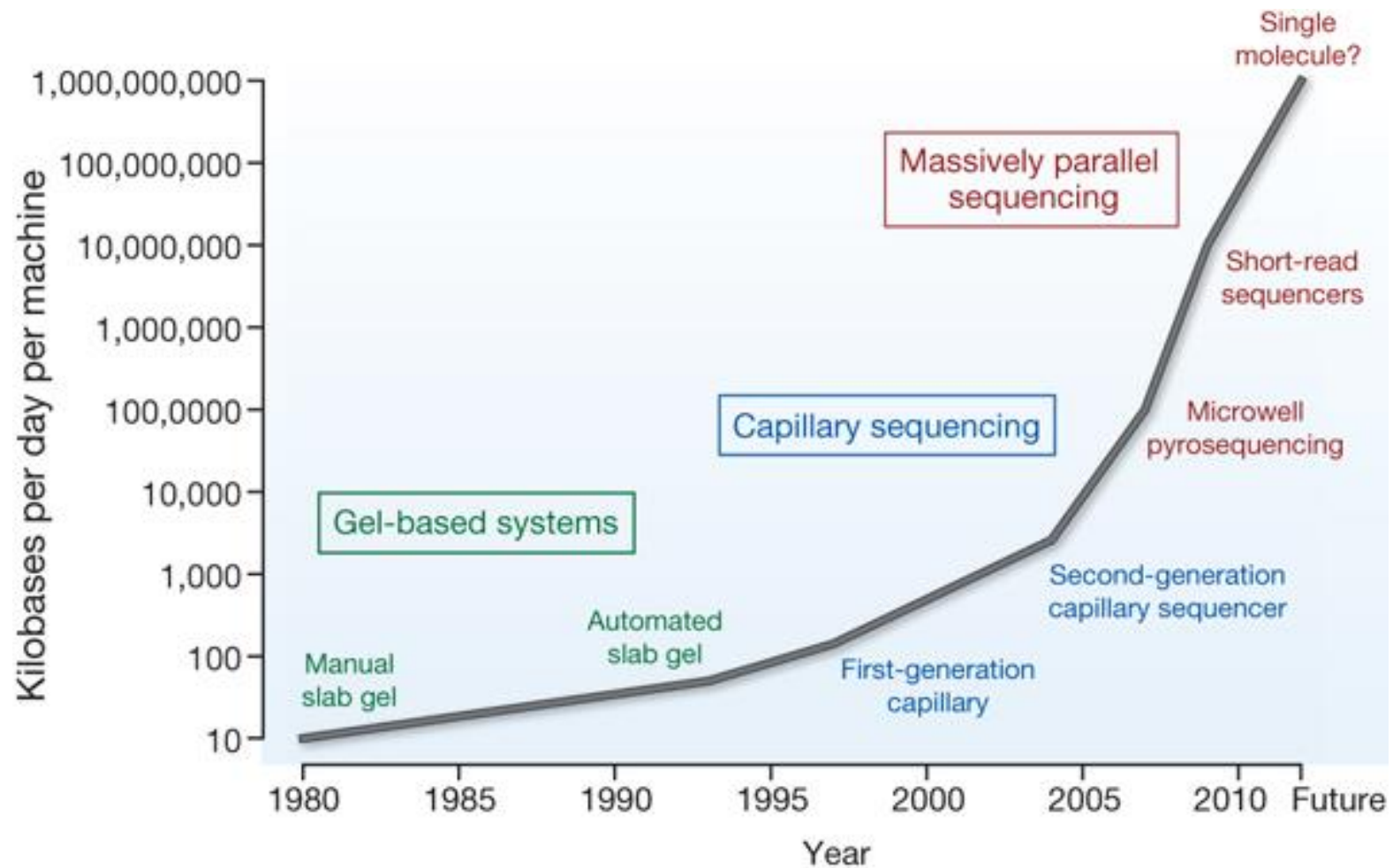
Sequenciamento



Montagem (*in silico*)



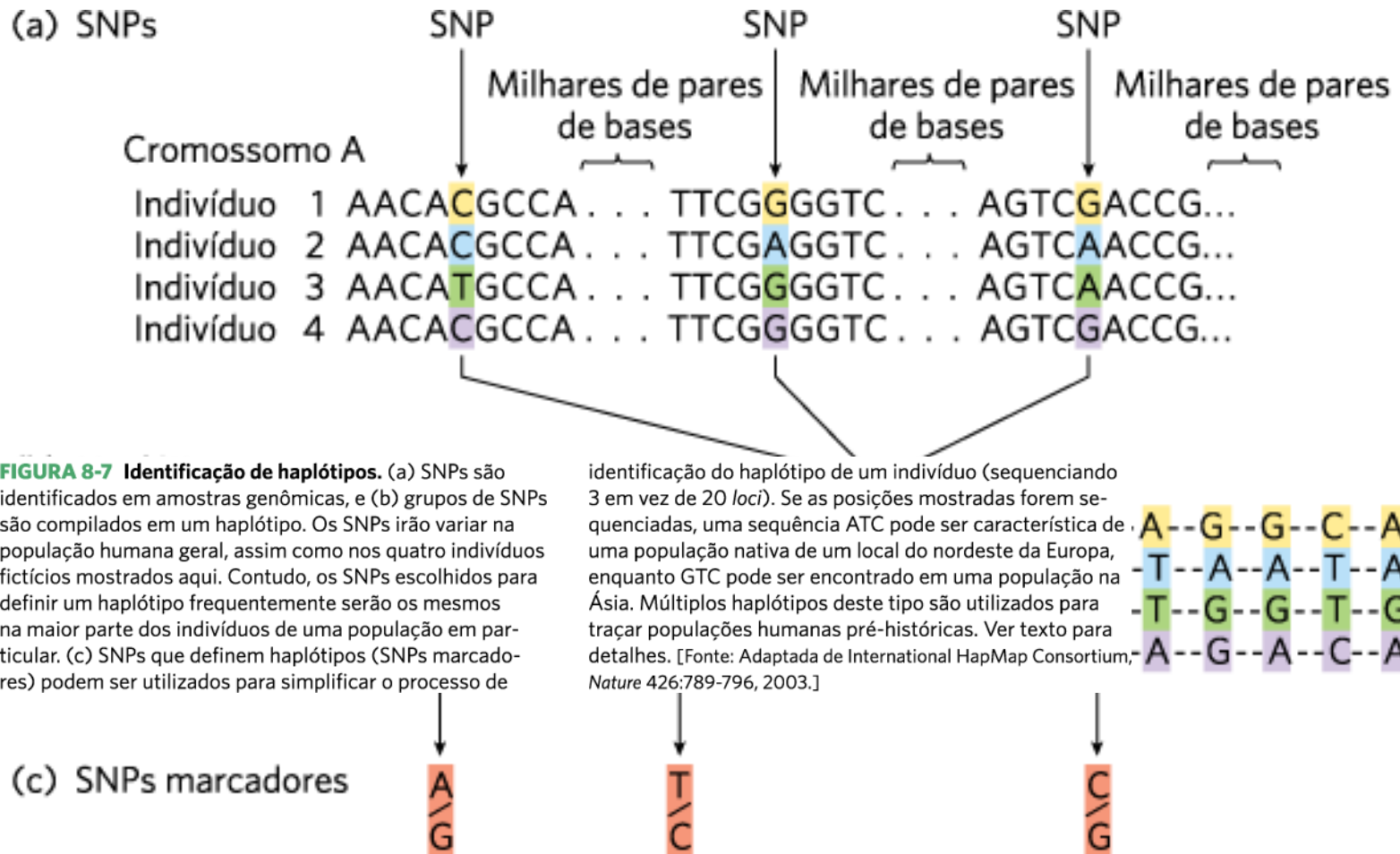
Evolução da tecnologia de sequenciamento de DNA



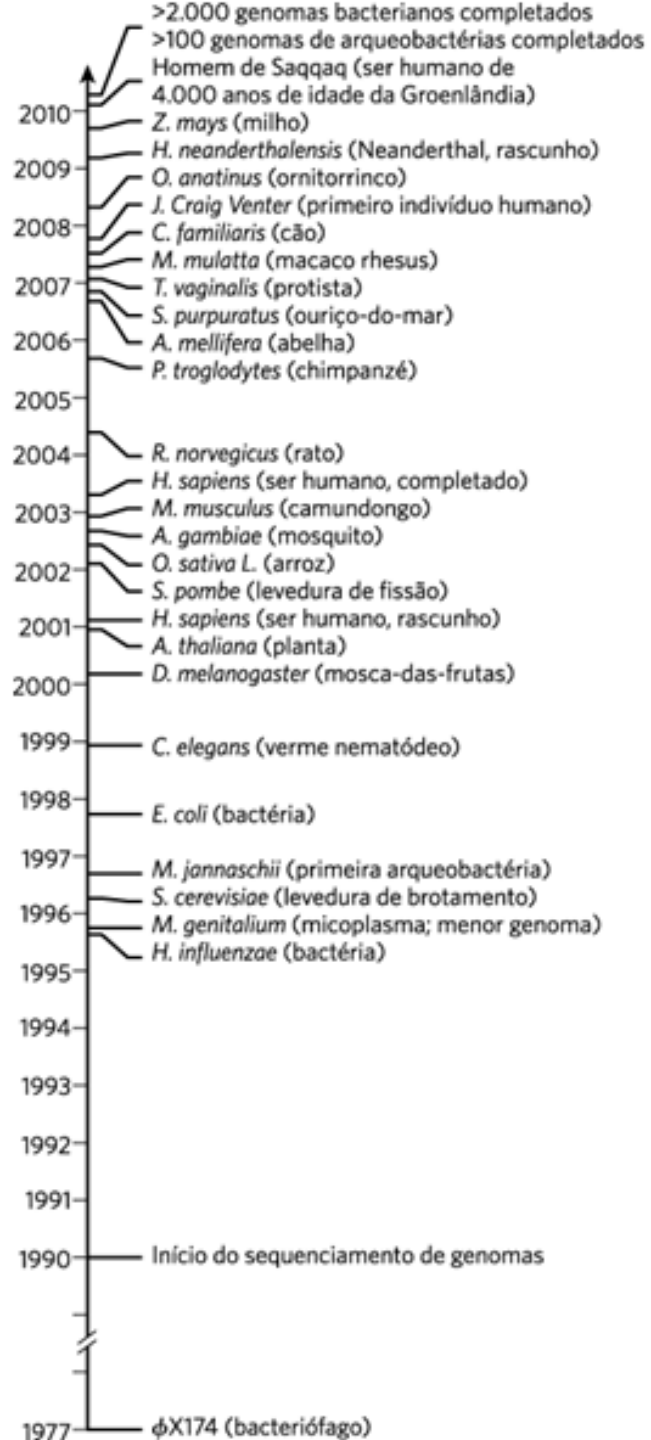
Aplicações de sequenciamento

- 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 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

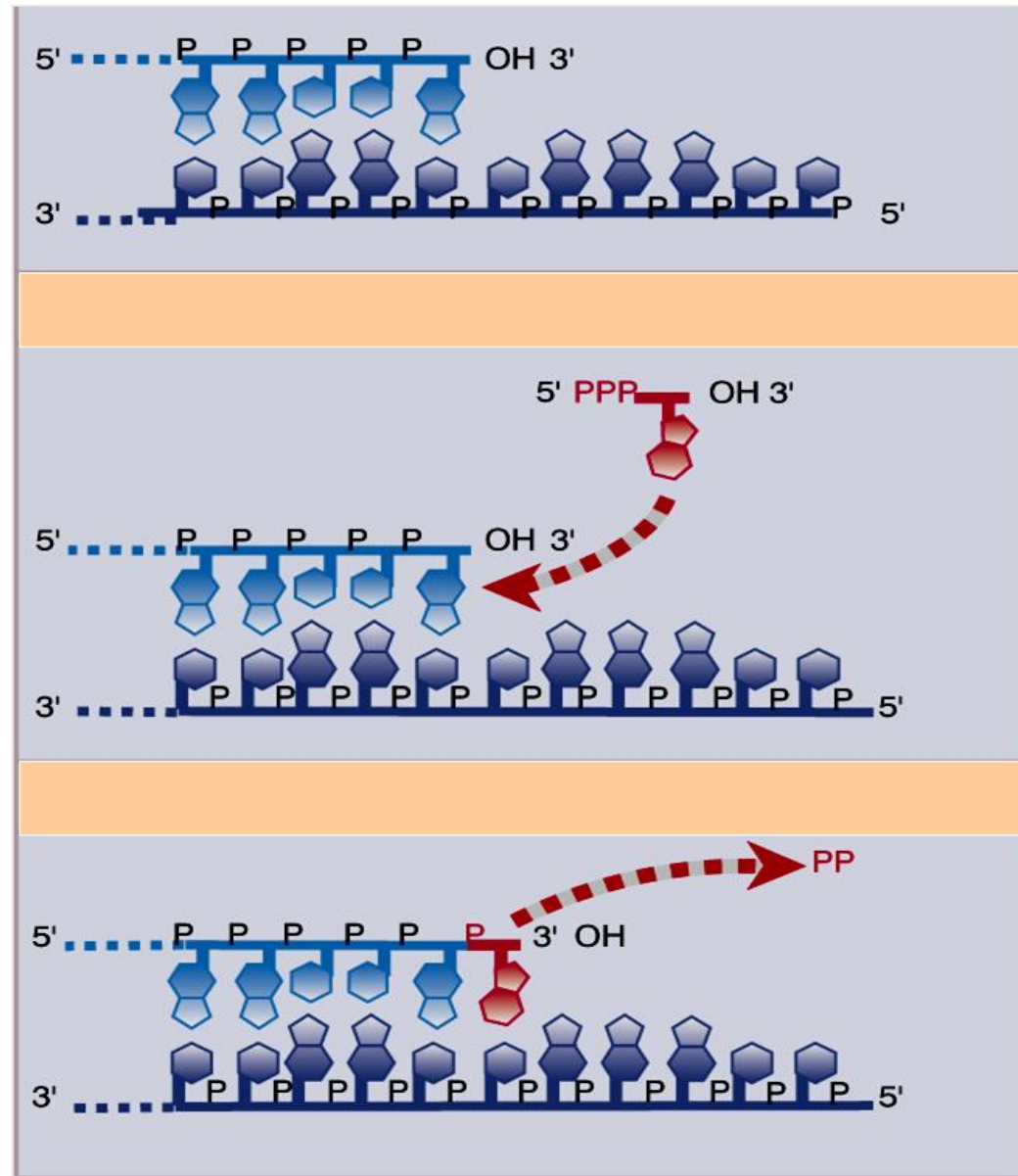
- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos a extremidade 3'OH da cadeia em crescimento.

- 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 (por isso a 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}
- Número de átomos no universo:
entre $4 \times \mathbf{10}^{79}$ and $4 \times \mathbf{10}^{81}$ (wikipedia)

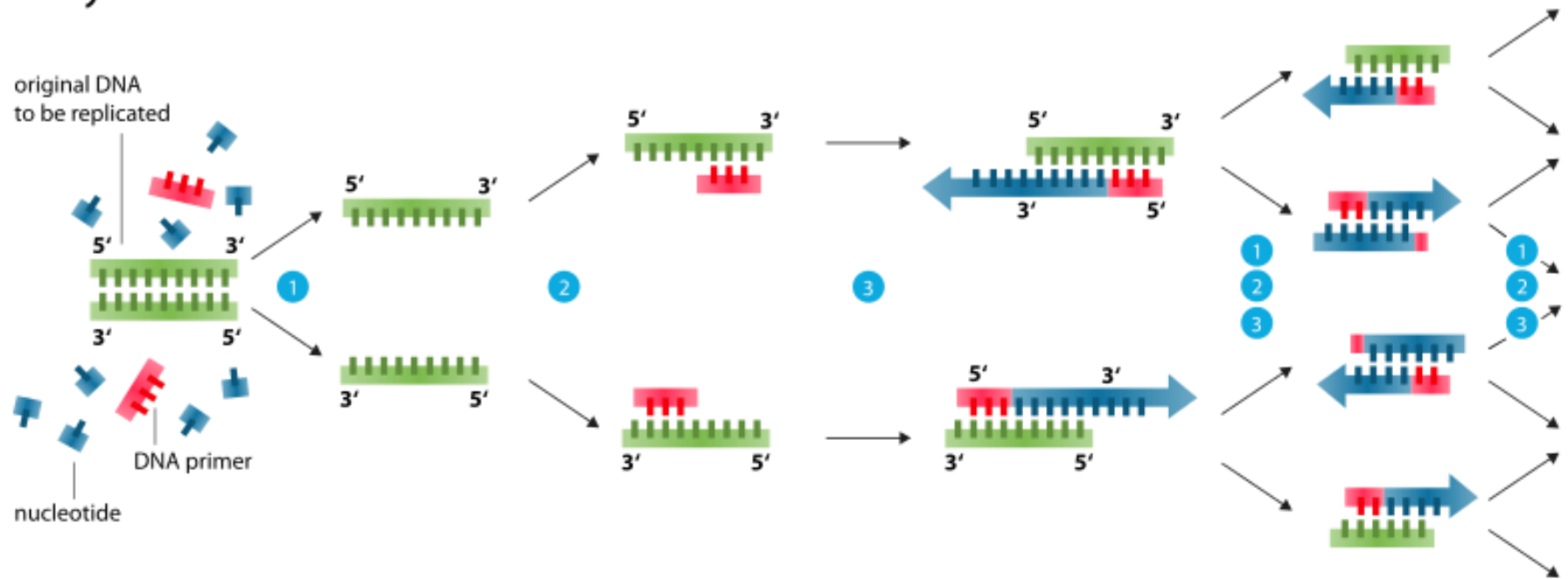
Ingredientes para PCR

- O DNA **modelo** 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
- *Deoxynucleosídeos 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 elongação do DNA, para que a polimerase consiga chegar ao fim do alvo
- Cada passo é realizado numa temperatura diferente
- Geralmente esses passos são repetidos entre 20 e 40 vezes
- Matematicamente, se começássemos com uma única molécula, teríamos no final
 - Entre 2^{20} 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

PCR se faz por máquinas



termocicladores

Aplicações

- Clonagem 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