

Princípios básicos da reação em cadeia da polimerase (PCR)



Programa

Princípios básicos da PCR – Parte I

Princípios básicos da biologia molecular

Definição de PCR

As fases da PCR

Princípios básicos da PCR – Parte II

Definição de PCR em tempo real

PCR em tempo real qualitativa

PCR em tempo real quantitativa

Princípios básicos da PCR – Parte III

Definição de temperatura de fusão

Análise da curva de fusão

Objetivos de aprendizagem

O objetivo geral deste módulo é explicar-lhe os métodos de PCR utilizados com o GeneXpert

No final desta formação, serão capazes de:

- Enumerar os elementos envolvidos no processo de PCR
- Explicar o processo de PCR e descrever os passos da PCR
- Definir “RT-PCR” (2 significados possíveis)
- Descrever as curvas de RT-PCR, definir o Ct
- Explicar como pode ser efetuada a quantificação com a RT-PCR
- Definir temperatura de fusão
- Explicar como a análise da curva de fusão permite identificar a resistência microbiana

Princípios básicos da reação em cadeia da polimerase (PCR) – I



Princípios básicos da biologia molecular

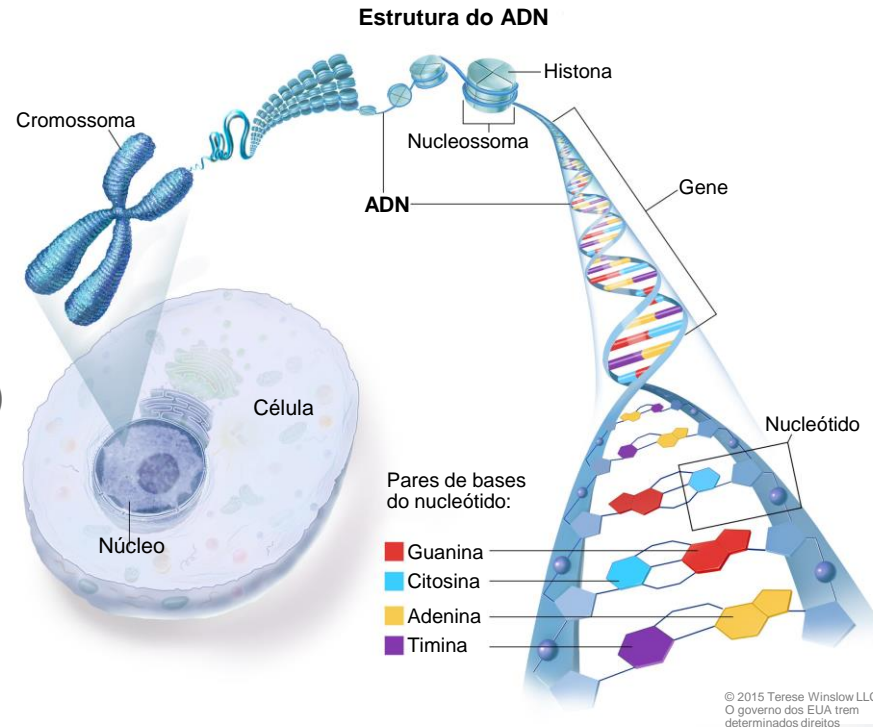
Um lembrete rápido



Princípios básicos da biologia molecular

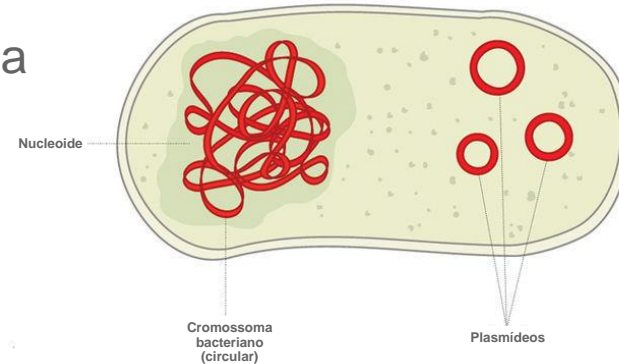
Informação genética contida no ADN

- O ADN tem a forma de uma dupla hélice
- O ADN codifica a informação genética (genes diferentes, informação diferente)
- O ADN está organizado em longas cadeias chamadas cromossomas
- O núcleo das células humanas contém 23 pares de cromossomas



Material genético nas bactérias

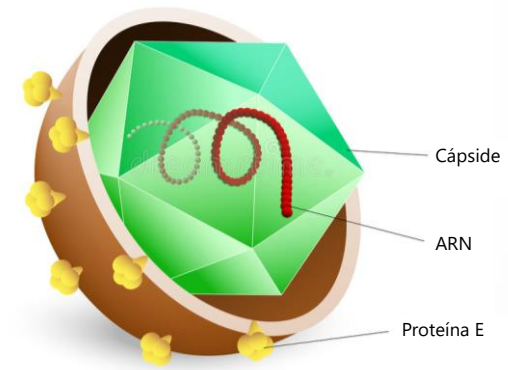
- A informação genética das bactérias está codificada no ADN
- A maioria das bactérias tem um genoma que consiste numa única molécula de ADN circular, localizada numa região chamada nucleoide (não rodeado por uma membrana)
- Elementos genéticos extra-cromossómicos, tais como plasmídeos e bacteriófagos, determinam frequentemente a resistência a agentes antimicrobianos, a produção de fatores de virulência ou outras funções.



© Copyright, 2014, University of Waikato. All rights reserved.
www.biotechlearn.org.nz

Material genético nos vírus

- Um vírus é um pequeno parasita que não se consegue reproduzir por si só. Depende da maquinaria da célula hospedeira.
- O genoma viral pode assumir várias formas: ARN ou ADN, de cadeia dupla ou simples, linear, circular ou mesmo segmentado



Ex.: Vírus da hepatite C



Blocos básicos do ADN

O ADN é composto por 4 nucleótidos

- A = Adenina
- T = Timina
- C = Citosina
- G = Guanina

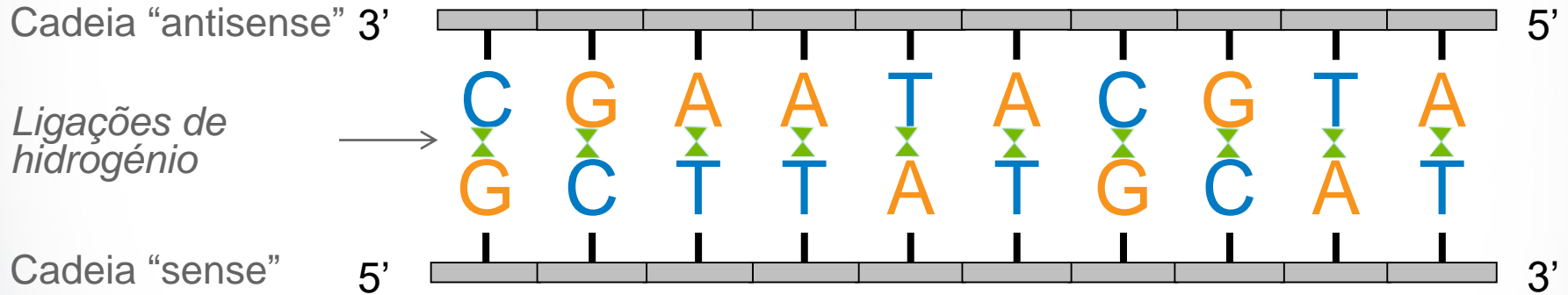


As 4 bases estão unidas entre si para formar uma sequência (cadeia simples de ADN)



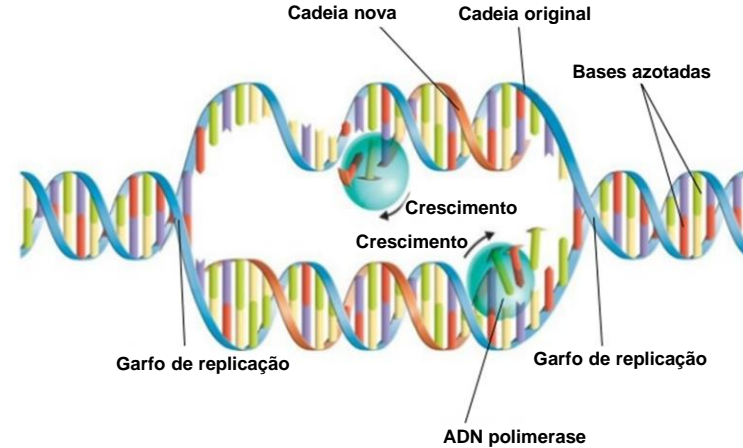
Princípios básicos da biologia molecular

A maioria do ADN é de cadeia dupla e emparelha-se de uma forma única:



Replicação do ADN

- É produzido ADN novo por enzimas chamadas **ADN polimerases**. Sintetizam ADN apenas no sentido 5' → 3'.
- Outra enzima chamada primase fabrica um **primer** de ARN para que as polimerases possam atuar.
- Assim que o primer de ARN está no devido lugar, a ADN polimerase “aumenta-o”, adicionando nucleótidos um a um para produzir uma nova cadeia de ADN que é complementar da cadeia template.



Copyright Pearson Prentice Hall

Definição de PCR

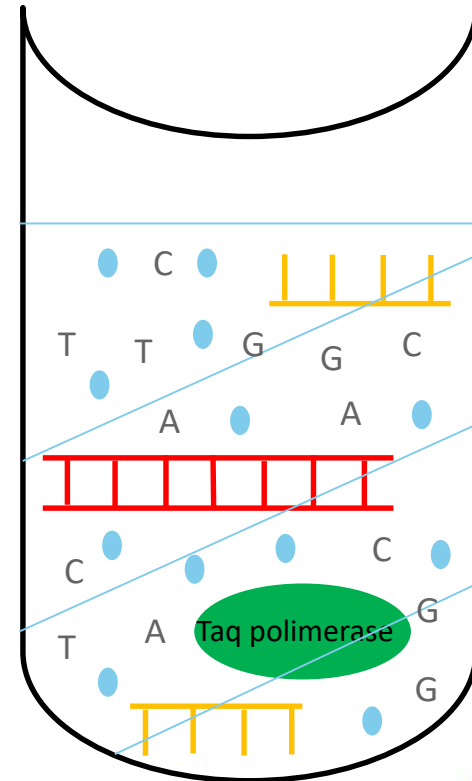


O que é a PCR?

1. A PCR (**reação em cadeia da polimerase**) é uma **reação em cadeia** que gera múltiplas cópias de uma sequência específica de ADN presente na amostra.
2. A amplificação do ADN ocorre por **ciclos térmicos repetidos**
3. O número de cópias da sequência específica **duplica** após cada ciclo
4. Após quarenta ciclos, uma única cópia deu lugar a 2 biliões de cópias

Componentes de uma reação de PCR

- **Template de ADN** (gene viral, bacteriano ou humano)
- **dNTP** (uma mistura dos quatro nucleótidos necessários para construir novas cadeias de ADN: A, T, C, G)
- **Primers** (oligonucleótidos com cerca de 20 nucleótidos, que se vão hibridizar com o ADN-alvo)
- **Polimerase** (Taq polimerase natural termoestável que consegue funcionar a uma temperatura ótima de cerca de 70 °C)
- **Tampão** (Mg²⁺, Tris-HCl, Triton: proporciona as condições ótimas para a polimerase trabalhar)

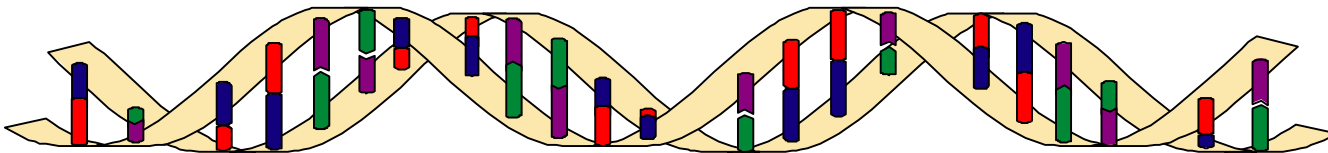


As fases da PCR



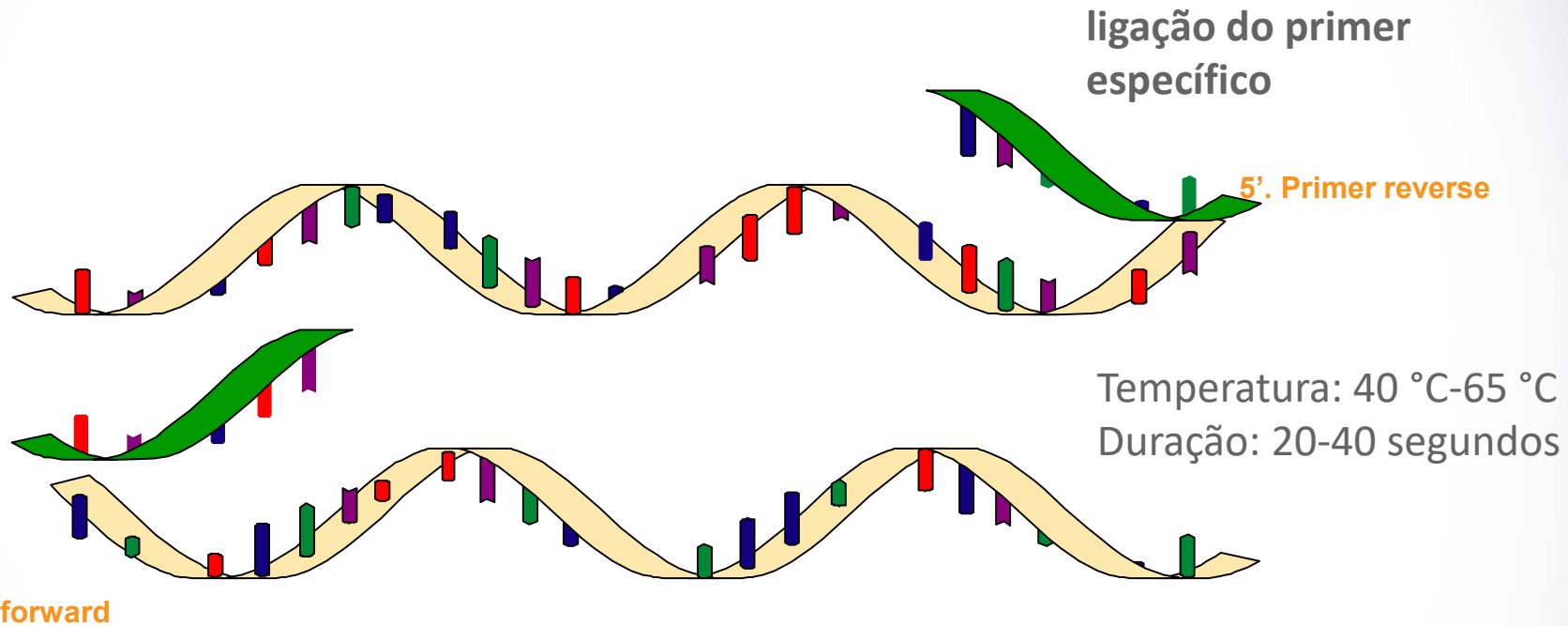
A primeira fase de um ciclo de PCR - **desnaturação**

separação das cadeias de ADN



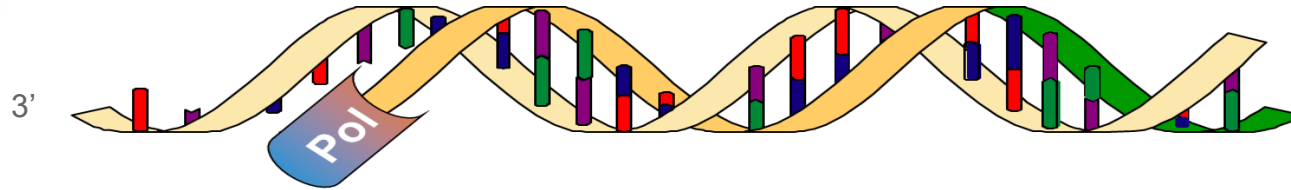
- 90 °C - 95 °C
- 20-30 seg.

A segunda fase de um ciclo de PCR - **hibridação**



A terceira fase de um ciclo de PCR - **extensão**

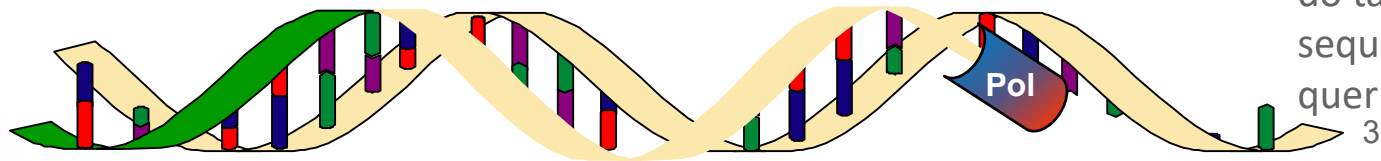
Síntese da cadeia de ADN



5'. Primer reverse

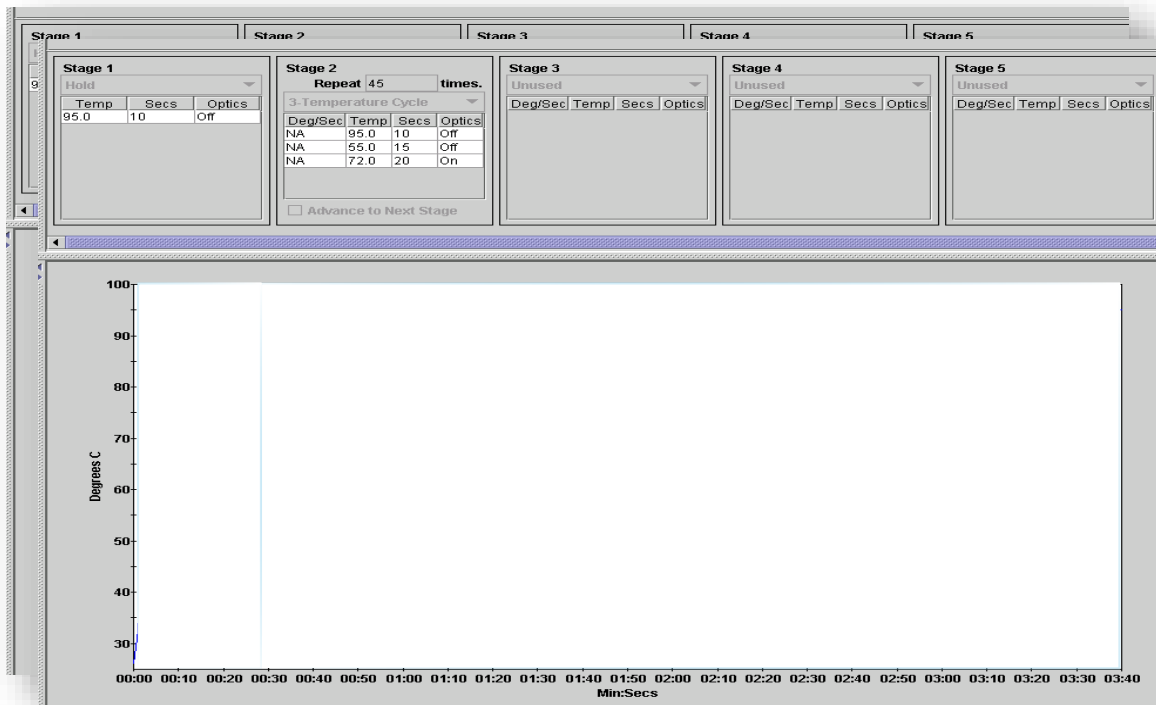
- 60 °C-75 °C

A duração depende do tamanho da sequência que se quer amplificar



Primer 5' forward

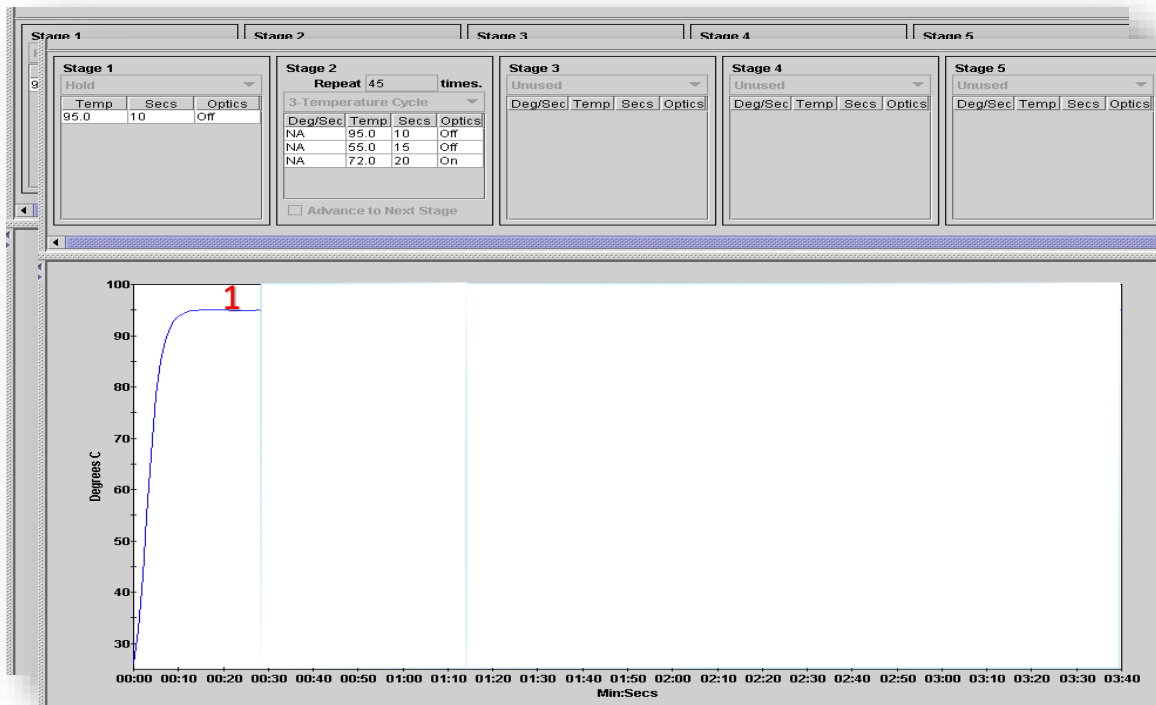
Perfil térmico dos ciclos de PCR



1. Desnaturação

Nota: habitualmente, uma PCR consiste em 30 a 40 ciclos

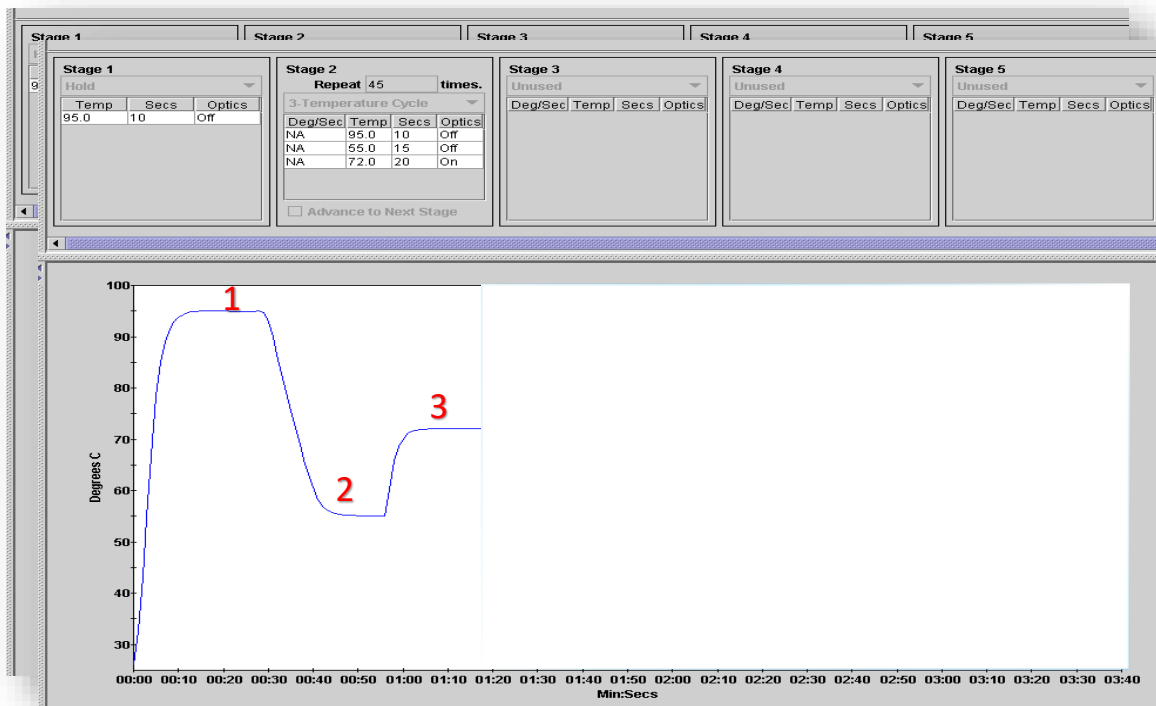
Perfil térmico dos ciclos de PCR



2. Hibridação

Nota: habitualmente, uma PCR consiste em 30 a 40 ciclos

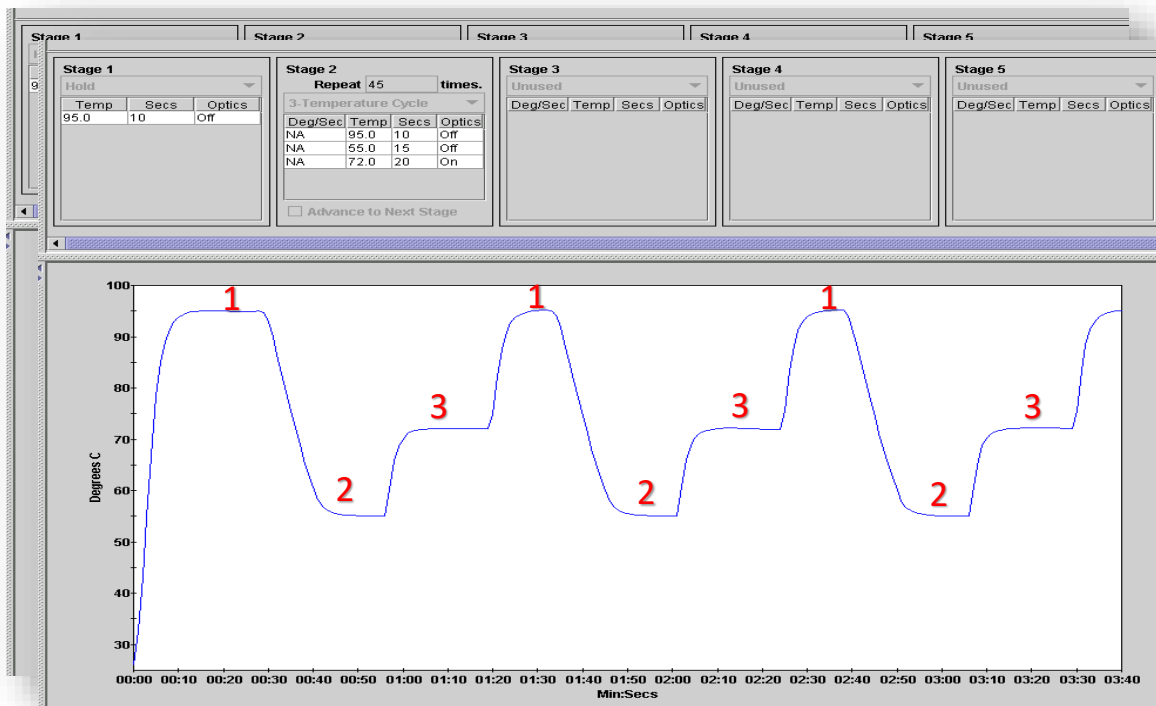
Perfil térmico dos ciclos de PCR



3. Extensão

Nota: habitualmente, uma PCR consiste em 30 a 40 ciclos

Perfil térmico dos ciclos de PCR



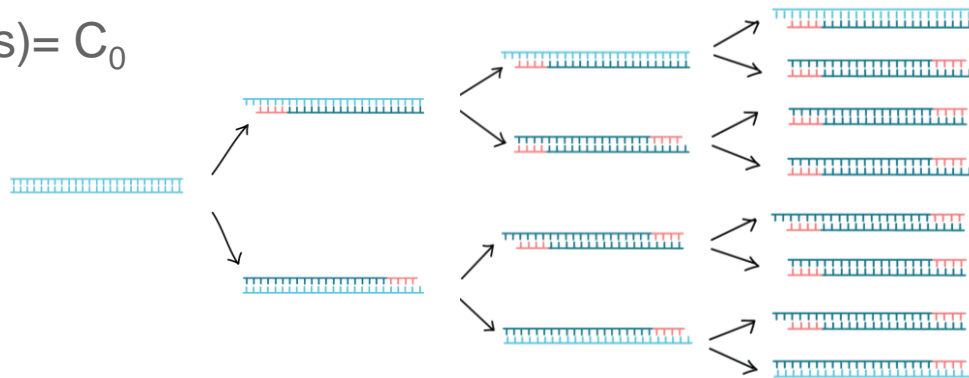
1. Desnaturação
2. Hibridação
3. Extensão

Nota: habitualmente, uma PCR consiste em 30 a 40 ciclos

Número de cópias de ADN obtidas por PCR

– **Em teoria**, o número de cópias do ADN-alvo duplica com cada ciclo, o que significa um fator de eficácia de PCR $E = 2$

- Concentração inicial (0 ciclos) = C_0
- Após um ciclo: $C_0 \times 2$
- Após 2 ciclos: $C_0 \times 4$
- Após 3 ciclos: $C_0 \times 8$
- **Após n ciclos: $C_0 \times 2^n$**



– **Na verdade**, esta taxa de replicação não pode ser mantida para sempre e a duplicação vai-se tornando menos que uma duplicação e, em seguida, nem sequer uma replicação

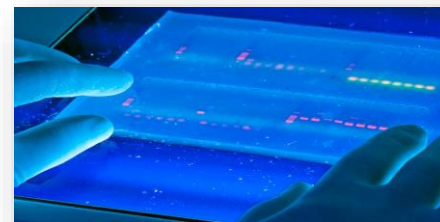
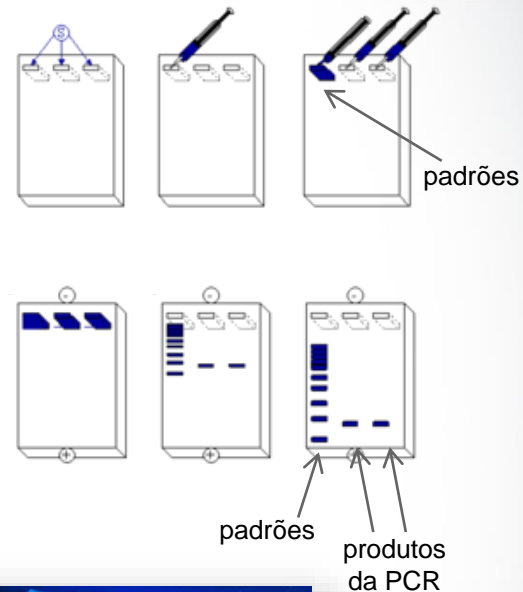
Fatores que influenciam a eficiência da PCR

- Desenho do teste (fabricante)
 - Desenho do primer/sonda
 - Tipo de ADN polimerase
 - Qualidade dos reagentes
 - Mistura principal
 - Condições dos ciclos de PCR: temperaturas e duração das fases
- Pré-analíticos (técnico de laboratório)
 - Qualidade dos reagentes, devido às condições de transporte e conservação
 - Qualidade da amostra: presença de inibidores da PCR

Deteção do produto no ponto final

Numa PCR clássica, a deteção é efetuada no ponto final (fim da PCR)

1. Uma mistura de fragmentos de tamanhos conhecidos (padrões) é colocada num gel de agarose, como referência, para se calcular o tamanho dos produtos da PCR.
2. O produto da PCR também é colocado no gel
3. É aplicado um campo elétrico, e as moléculas com carga negativa migram para o polo positivo
4. Os produtos da PCR migram de acordo com o seu tamanho
5. O ADN é corado com brometo de etídio, que é visível com o auxílio de uma lâmpada UV
6. Se o alvo que procuramos está presente na amostra, está presente um produto da PCR do tamanho esperado





Obrigado.

www.Cepheid.com

