



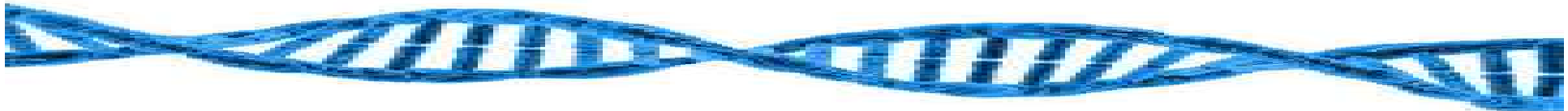
Curso teórico-prático

Princípios e Aplicações da Técnica de PCR

Prof. Dr. Rafael D Rosa

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

E-mail: rafael.d.rosa@ufsc.br



Princípios e Aplicações da **Técnica de PCR**

Carga horária: 10 h/a

Período: 02 a 05 de setembro de 2019 (segunda à quinta)

Horário: 09h00 às 11h30

Local: Laboratório Morfofuncional (LFM)



Cairé



Natan



Gabriel



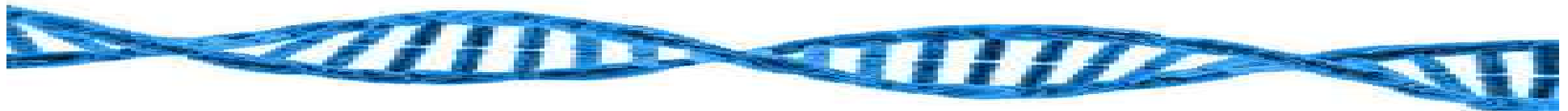
Gustavo



Nicolas

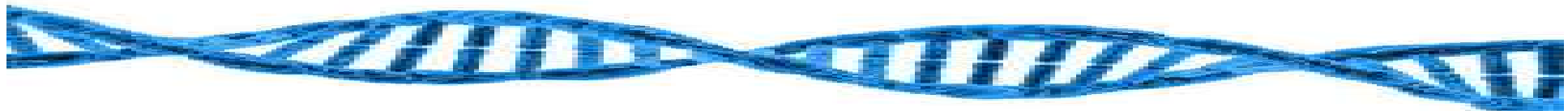


Breno



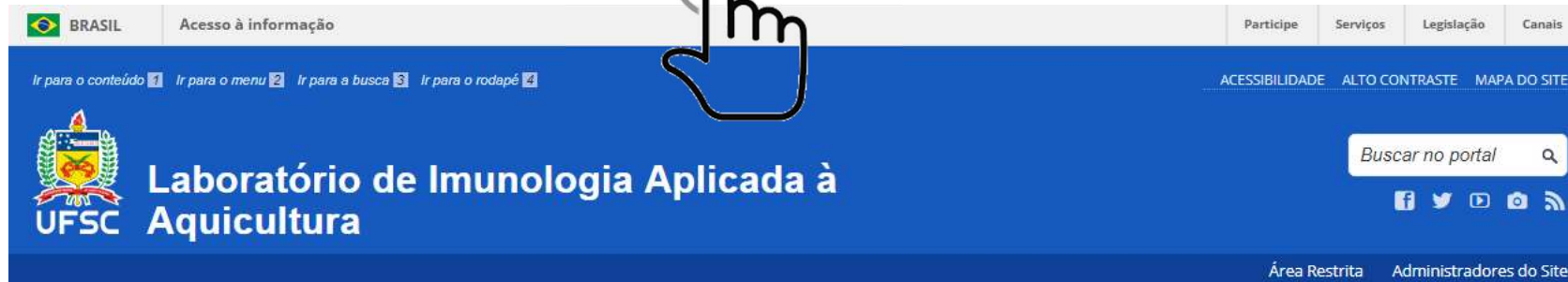
Princípios e Aplicações da **Técnica de PCR**

DIA	AULA	ASSUNTO
02	Teórica	Apresentação do curso Estrutura de ácidos nucleicos e Replicação do DNA A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
03	Teórica	Eletroforese de ácidos nucleicos Escolha de iniciadores
04	Prática	PCR convencional
05	Prática	Eletroforese de DNA



Princípios e Aplicações da Técnica de PCR

www.liaaq.ccb.ufsc.br



BRASIL Acesso à informação Participe Serviços Legislação Canais

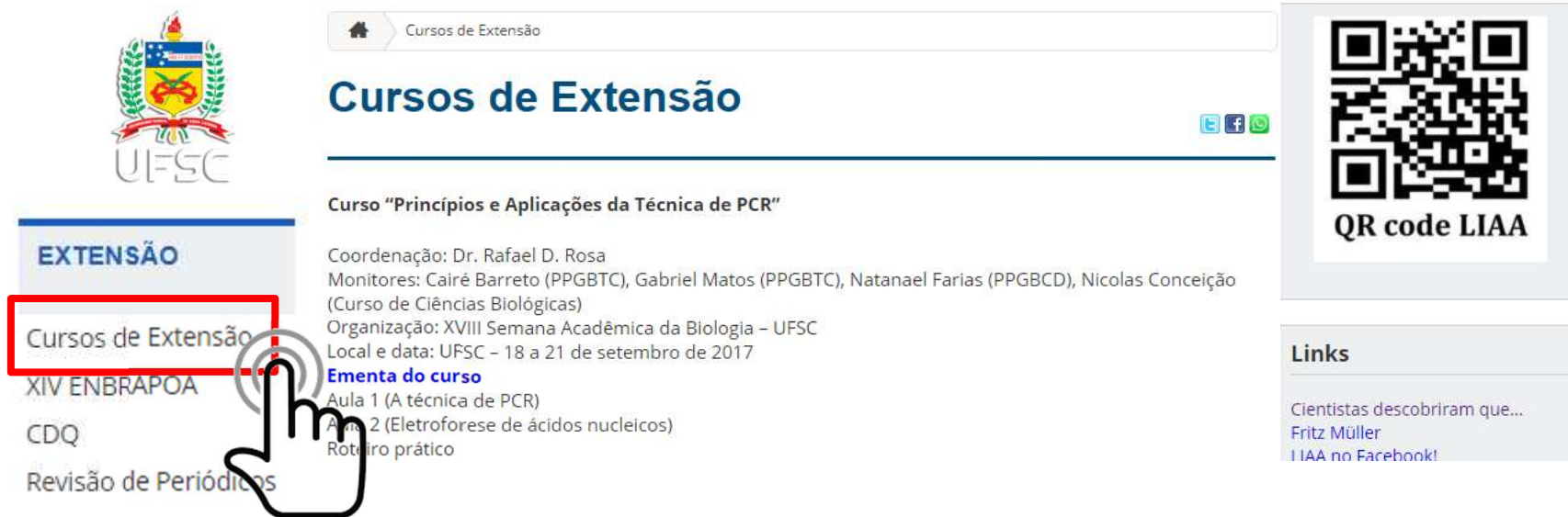
Ir para o conteúdo 1 Ir para o menu 2 Ir para a busca 3 Ir para o rodapé 4

ACESSIBILIDADE ALTO CONTRASTE MAPA DO SITE

Buscar no portal

Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura UFSC

Área Restrita Administradores do Site



Cursos de Extensão

Cursos de Extensão

Curso "Princípios e Aplicações da Técnica de PCR"

Coordenação: Dr. Rafael D. Rosa
Monitores: Cairé Barreto (PPGBTC), Gabriel Matos (PPGBTC), Natanael Farias (PPGBCD), Nicolas Conceição (Curso de Ciências Biológicas)
Organização: XVIII Semana Acadêmica da Biologia - UFSC
Local e data: UFSC - 18 a 21 de setembro de 2017

Ementa do curso
Aula 1 (A técnica de PCR)
Aula 2 (Eletroforese de ácidos nucleicos)
Roteiro prático

QR code LIAA

Links

Cientistas descobriram que...
Fritz Müller
LIAA no Facebook!

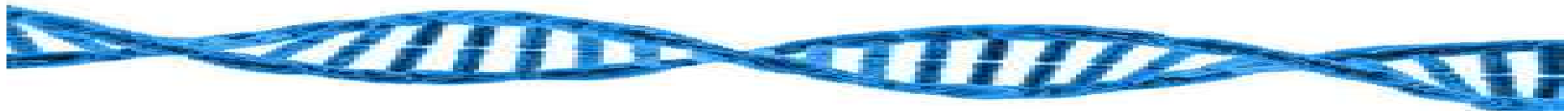
EXTENSÃO

Cursos de Extensão

XIV ENBRAPOA

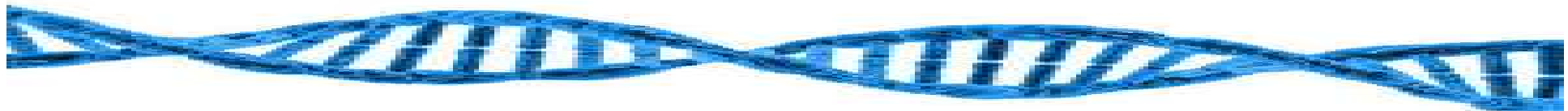
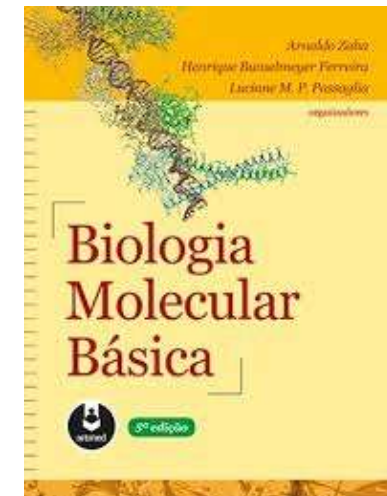
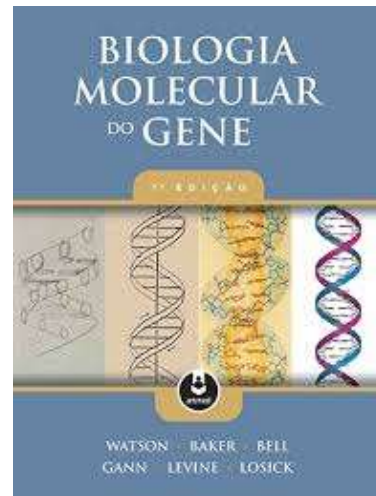
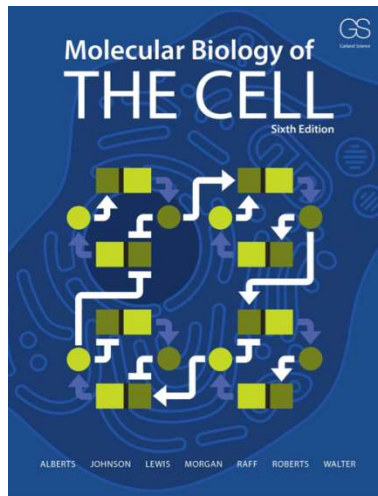
CDQ

Revisão de Periódicos



Princípios e Aplicações da Técnica de PCR

Bibliografia

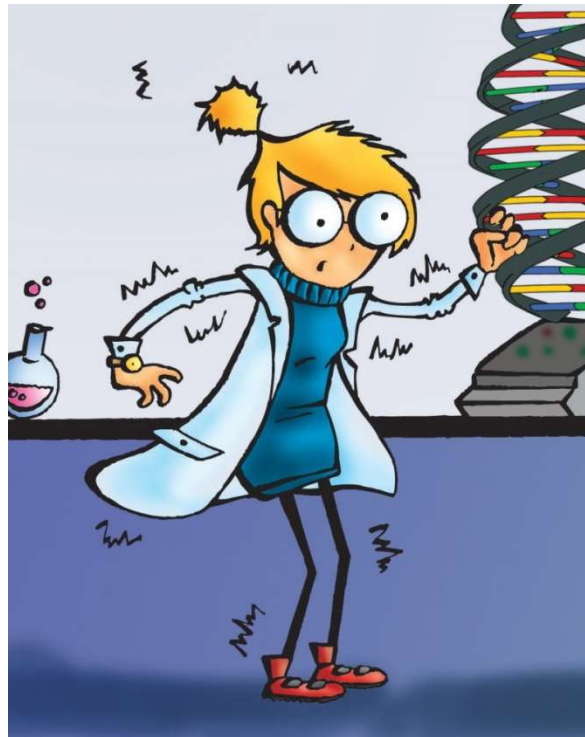


PCR

Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

PCR: POLYMERASE CHAIN REACTION

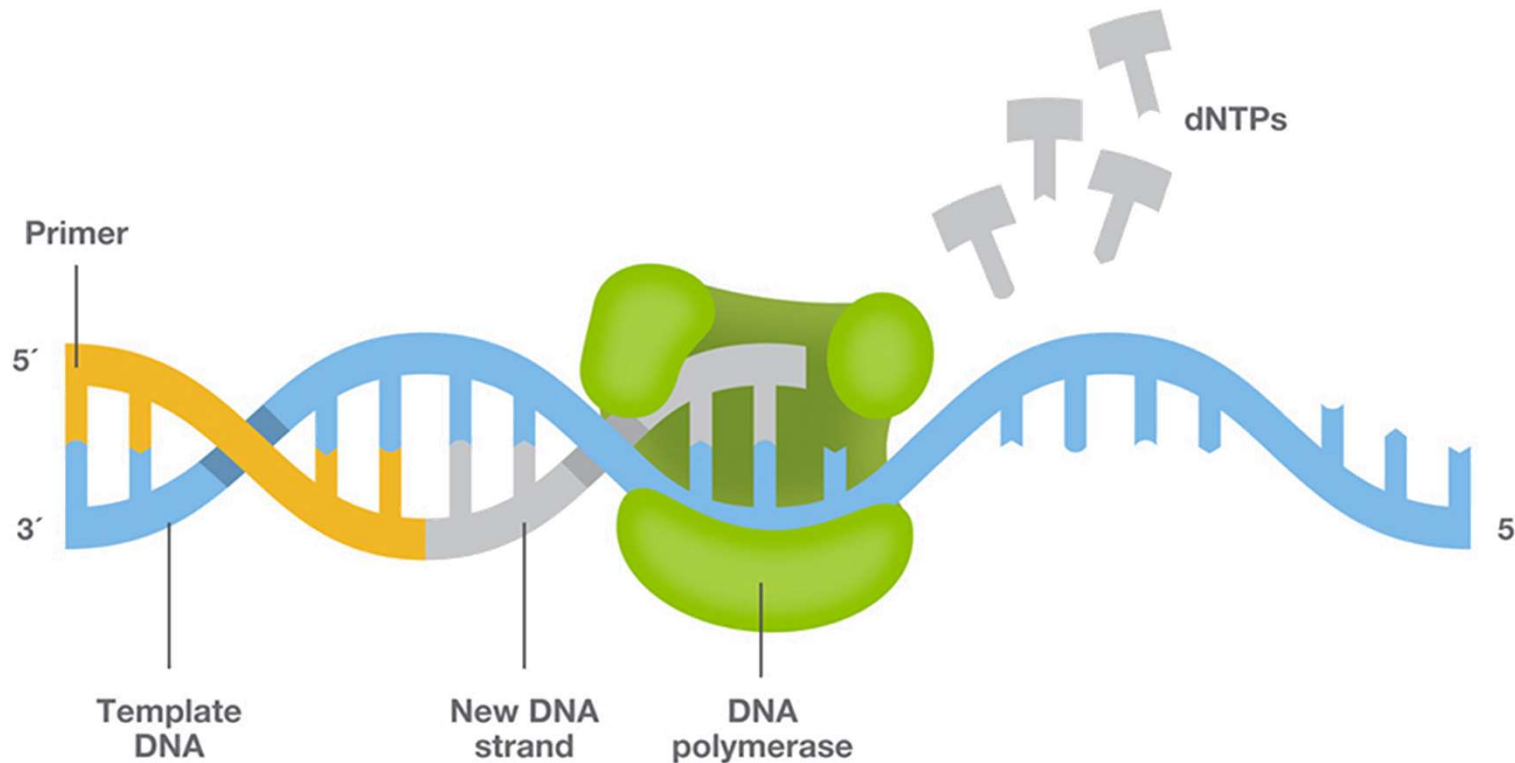


A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

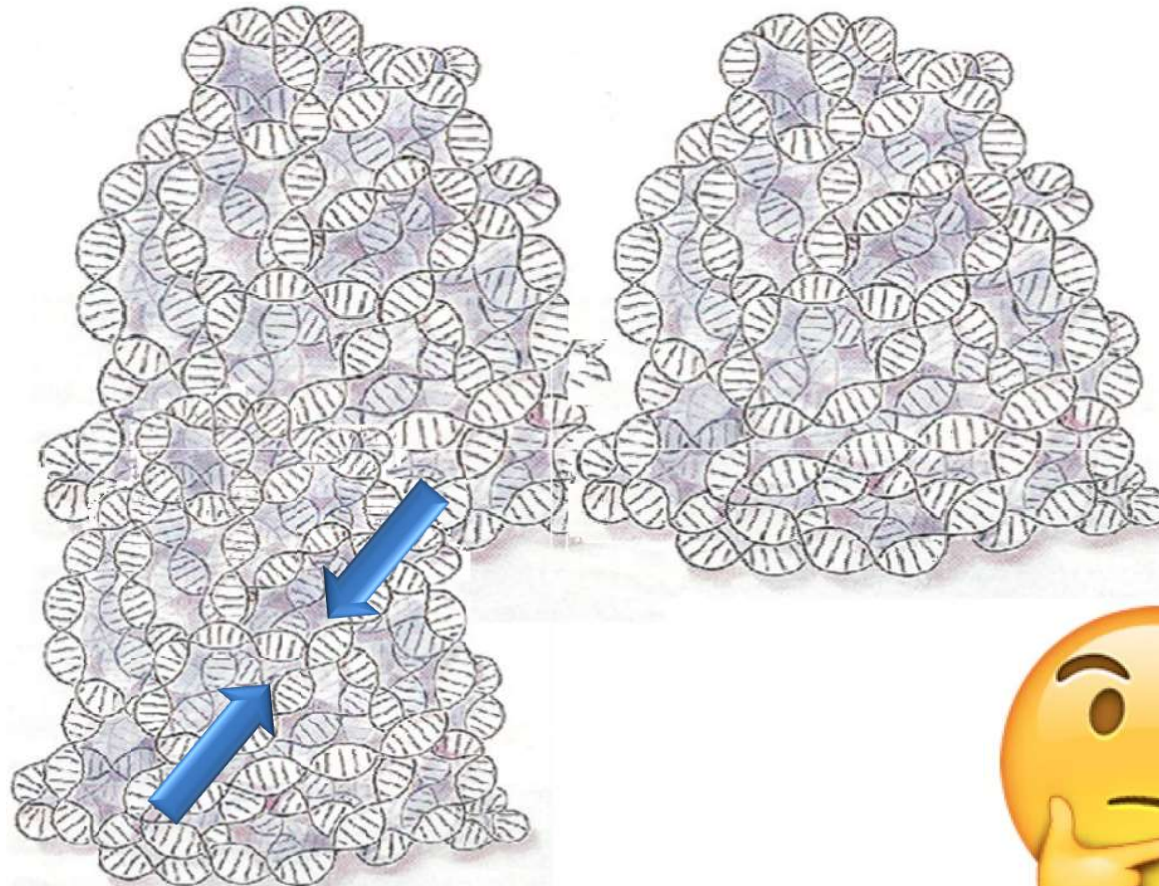
Replicação *in vitro* de **sequências específicas** de DNA

Reação enzimática (DNA polimerase + DNA)



A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Amplificação de sequências **ESPECÍFICAS**



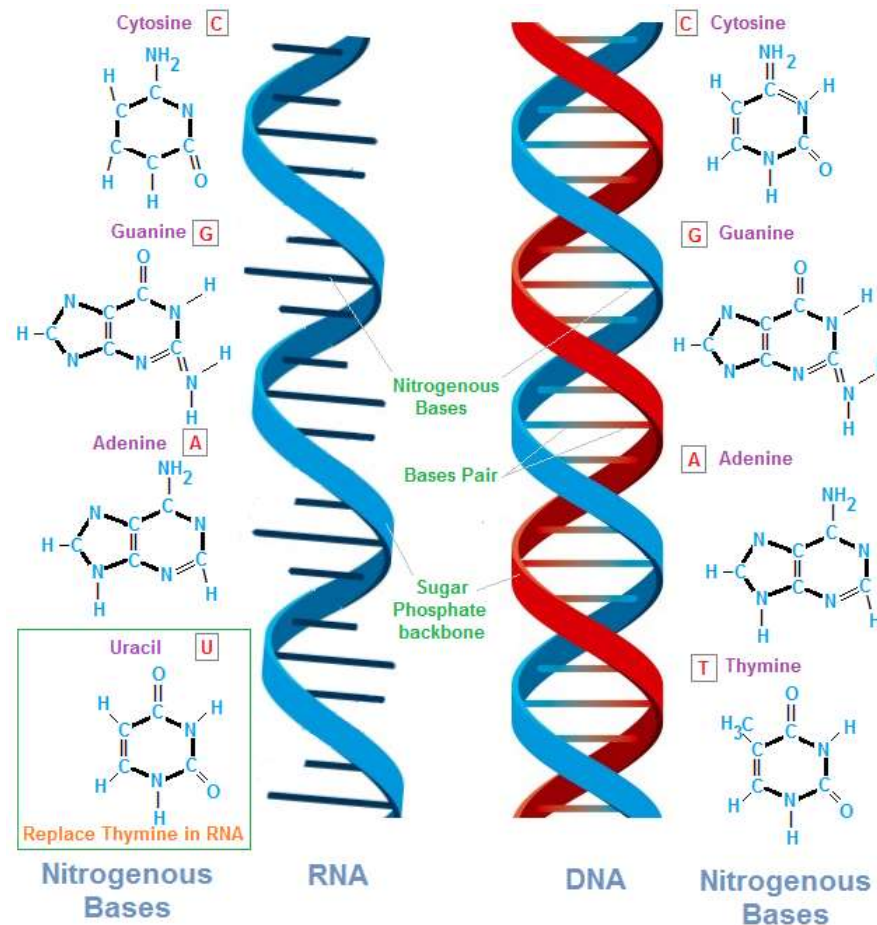
ESTRUTURA E
REPLICAÇÃO DO DNA



Estrutura dos ácidos nucleicos

DNA - Ácido DesoxirriboNucleico

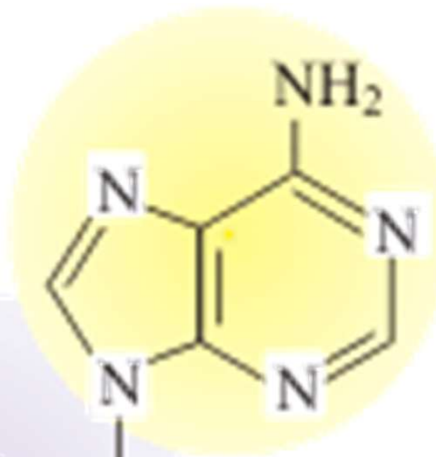
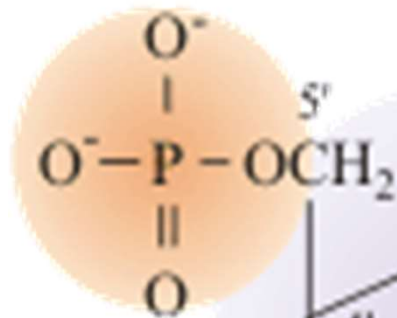
RNA - Ácido RiboNucleico



Estrutura dos ácidos nucleicos

Polímeros lineares de **nucleotídeos**

GRUPO FOSFATO



BASE NITROGENADA

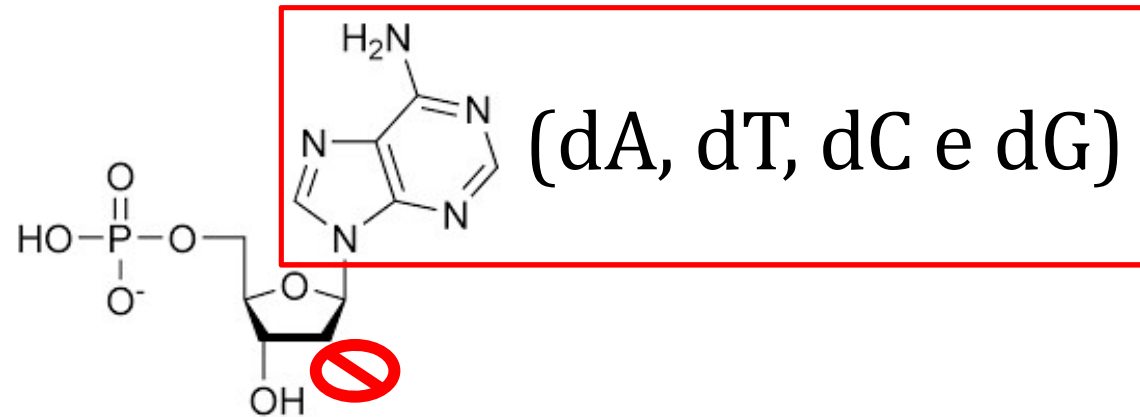


PENTOSE

Estrutura dos ácidos nucleicos

DNA ou ADN: Ácido DesoxirriboNucleico

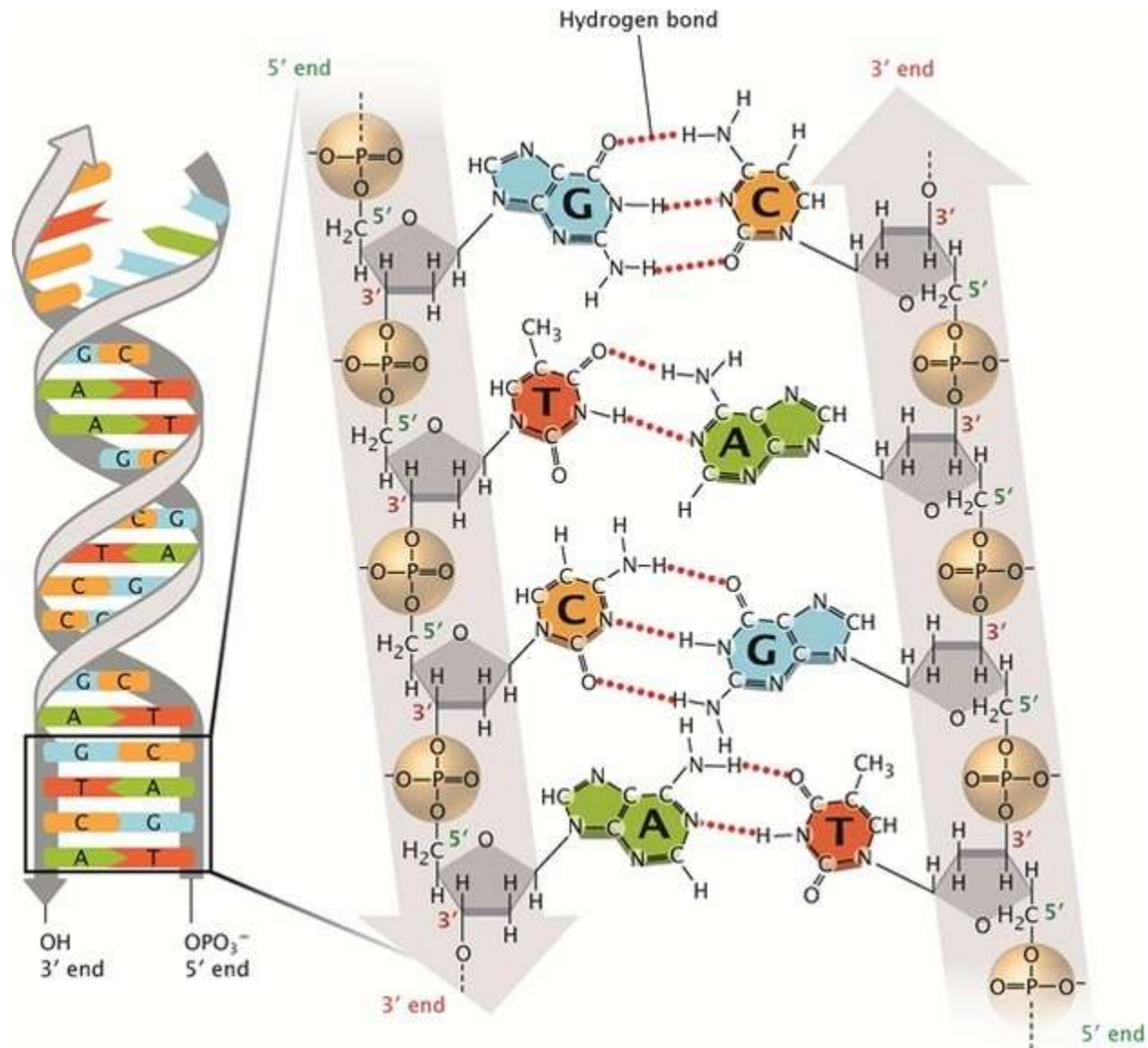
Polímeros de desoxinucleotídeos



Normalmente em fita dupla (dsDNA)

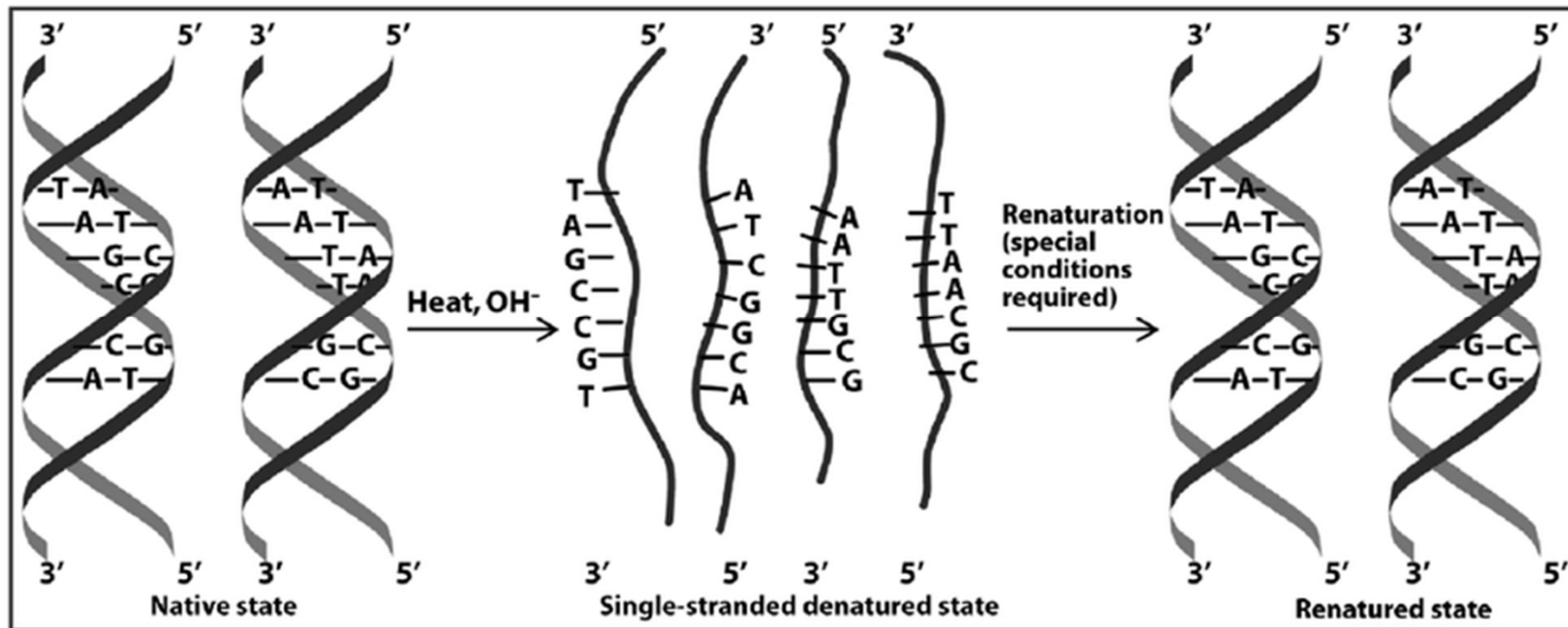
Fitas complementares (em direções opostas)

Estrutura dos ácidos nucleicos



Estrutura dos ácidos nucleicos

Desnaturação e Renaturação do DNA



Estrutura dos ácidos nucleicos

Desnaturação e Renaturação do DNA



FORTE

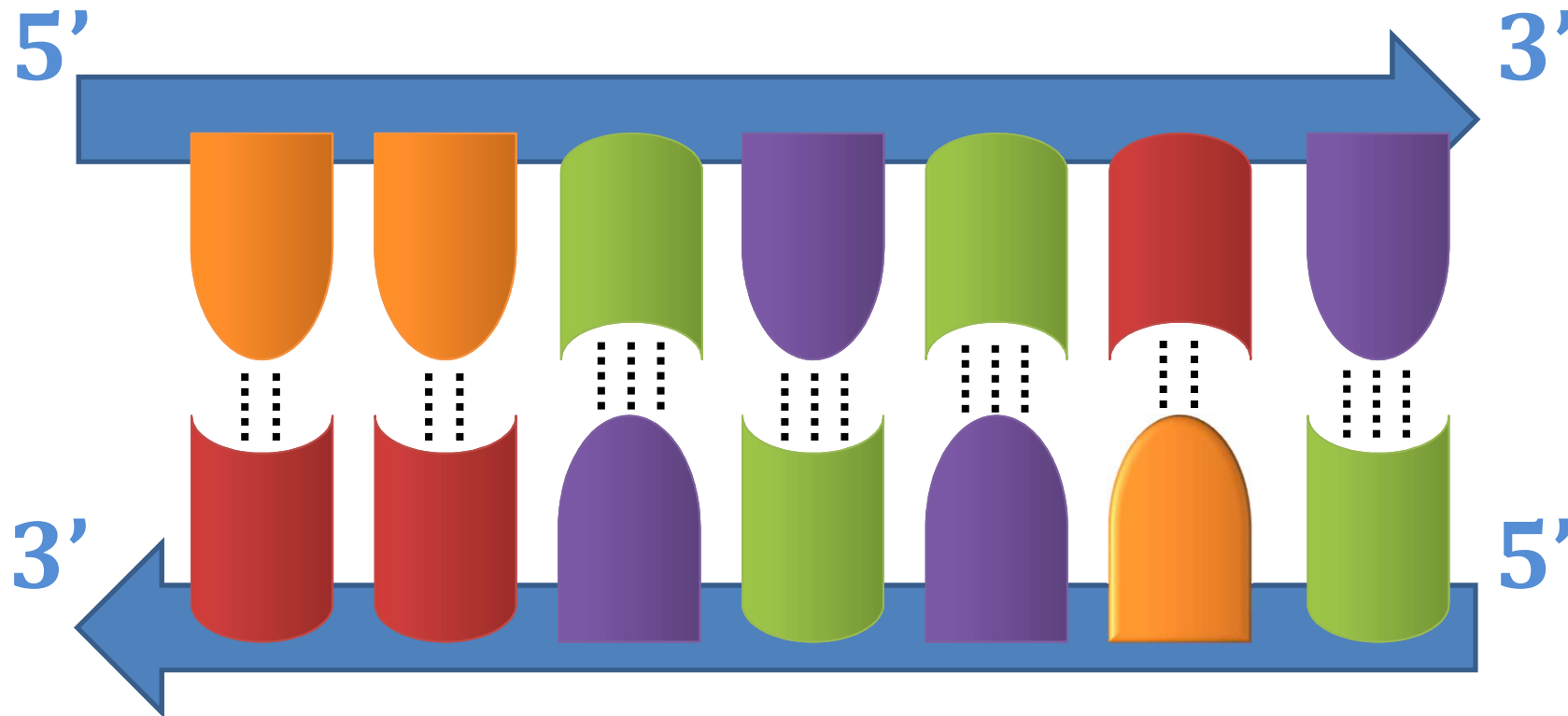
ligações fosfodiéster
(mesma fita)

FRACA

pontes de H
(entre as fitas)

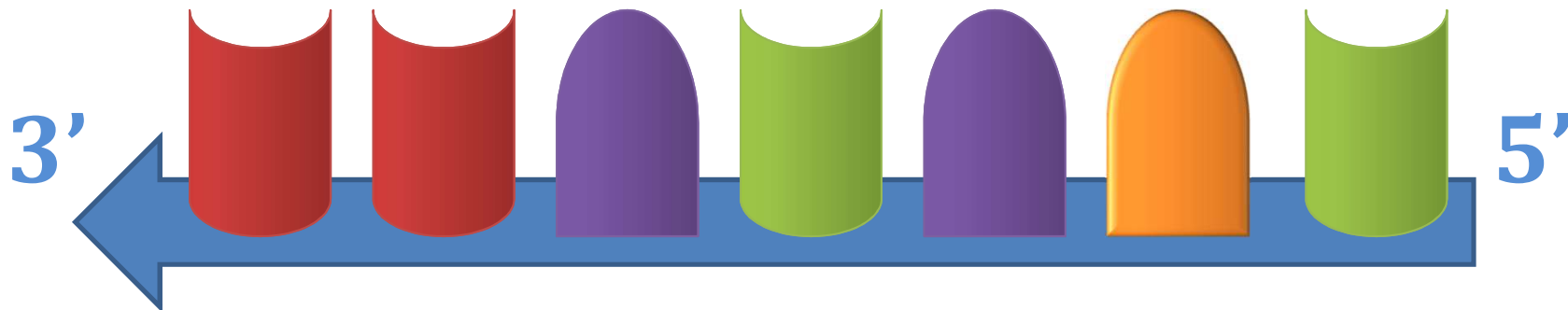
Estrutura dos ácidos nucleicos

Desnaturação e Renaturação do DNA



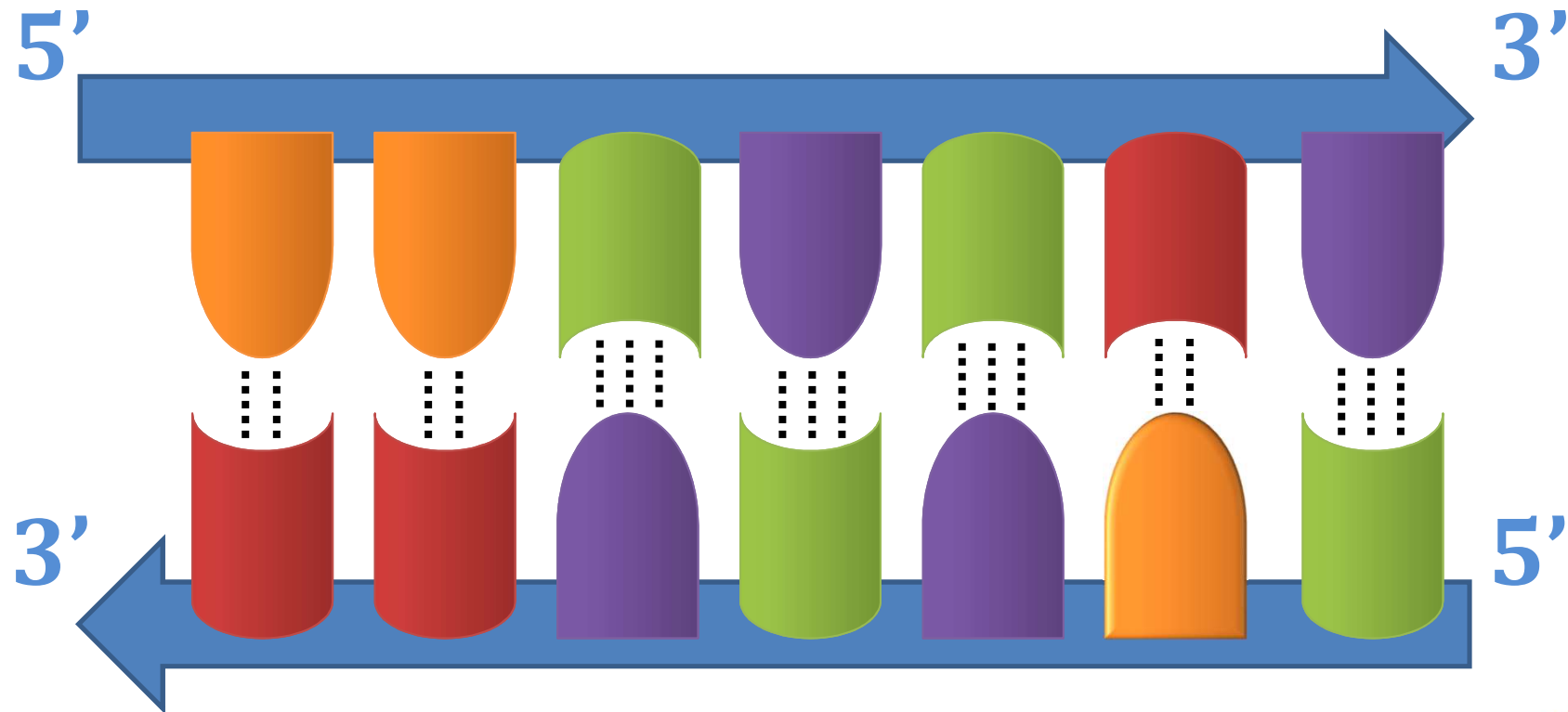
Estrutura dos ácidos nucleicos

Desnaturação e Renaturação do DNA



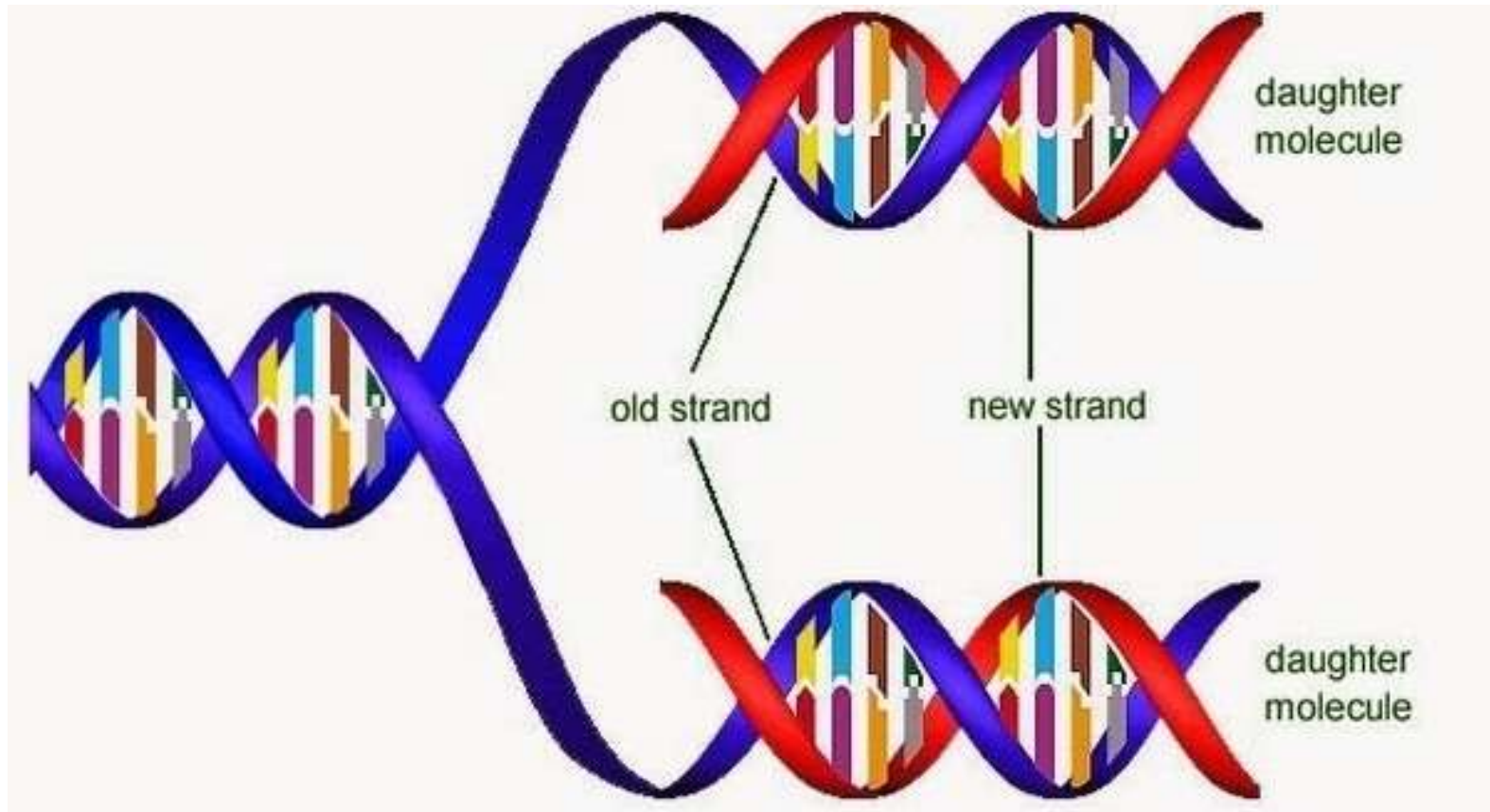
Estrutura dos ácidos nucleicos

Desnaturação e **Renaturação** do DNA



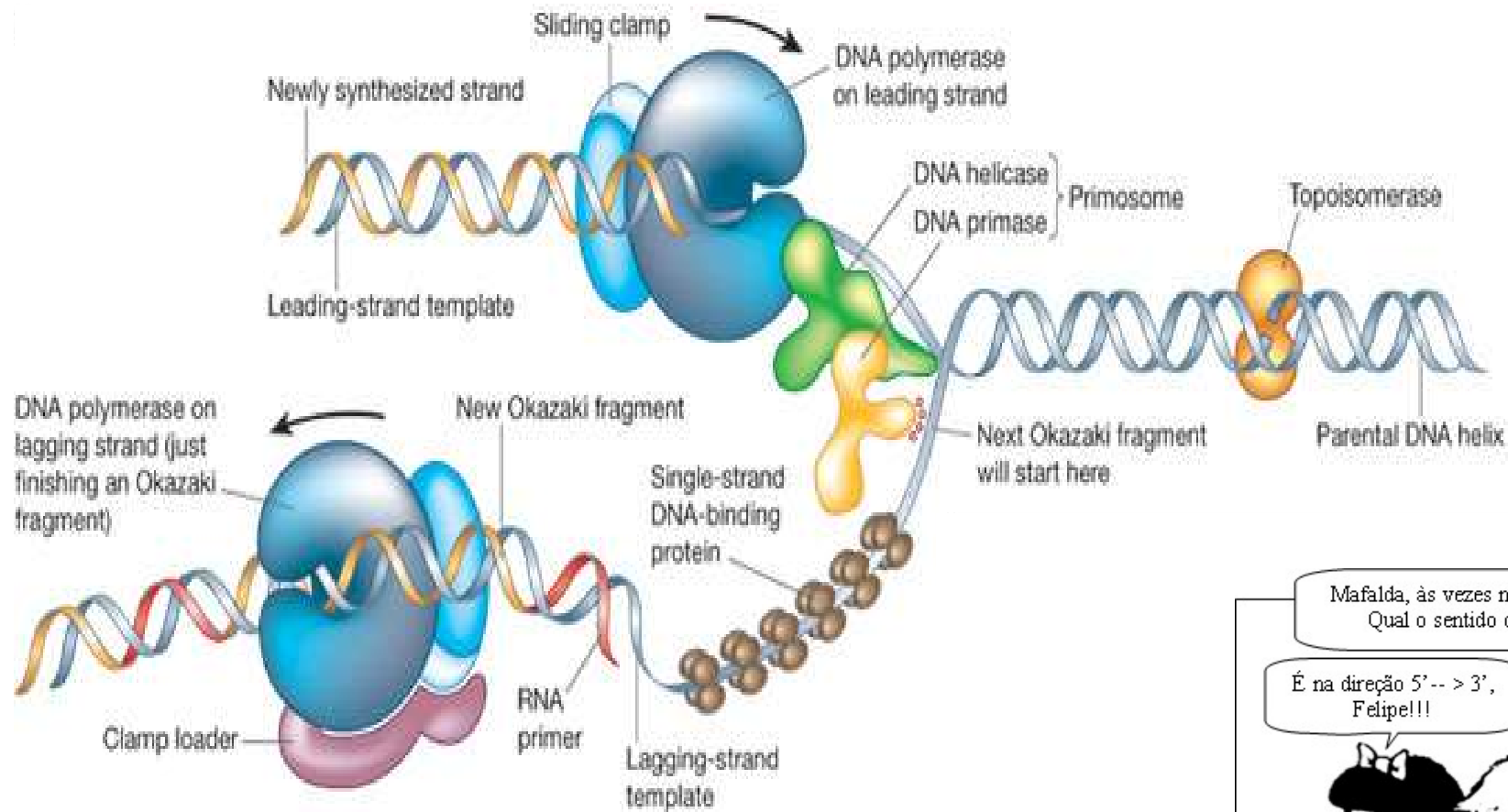
Replicação do DNA

A replicação do DNA ocorre de forma **semiconservativa**



Replicação do DNA

Polimerização unidirecional: **sentido 5' → 3'**



PCR

Fundamentos da Técnica

PCR: conceito

- ✓✓ **Estrutura dos ácidos nucleicos**
- ✓✓ **Replicação do DNA**
- ✓✓ **Conceito da técnica de PCR**

Fundamentos da técnica de PCR

Aplicações da PCR

Como visualizar e interpretar os resultados

Quais as variações da técnica de PCR

Como preparar reações de PCR

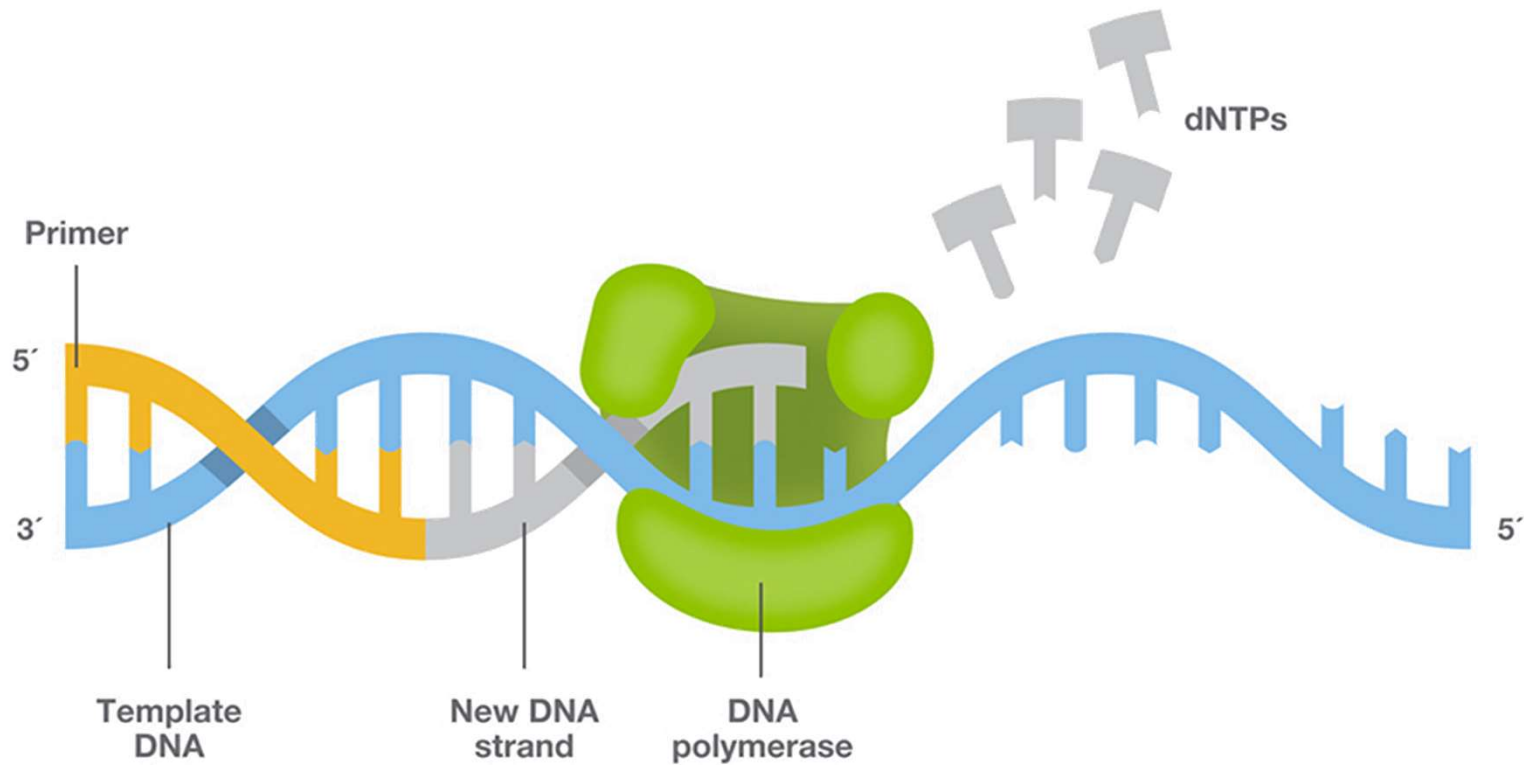
PCR na prática!



PCR: conceito

Replicação *in vitro* de **sequências específicas** de DNA

Reação enzimática (DNA polimerase + DNA)

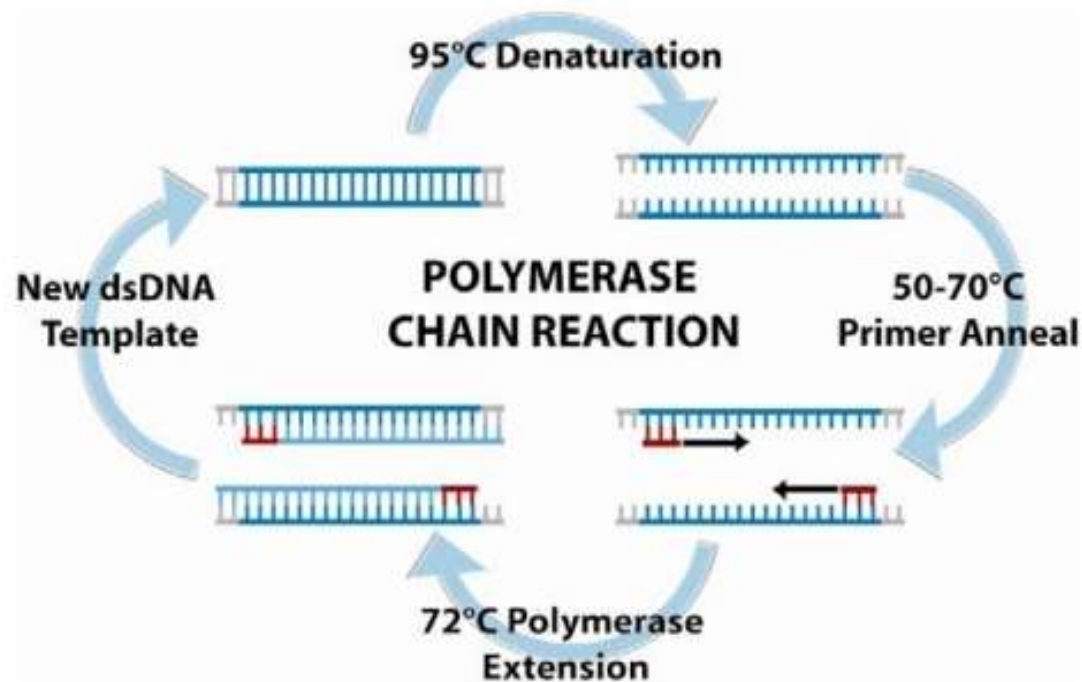


PCR: conceito

Replicação *in vitro* de **sequências específicas** de DNA

Reação enzimática (DNA polimerase + DNA)

Reação cíclica: **substrato** (DNA) → **produto** (DNA)



PCR: conceito

Técnica baseada na **replicação do DNA**

✓✓ **DNA polimerase**

~~⊗ Grampos deslizantes~~

~~⊗ Primase~~

~~⊗ Helicase~~

~~⊗ SSB~~

~~⊗ Topoisomerase/Girase~~

~~⊗ RNase H~~

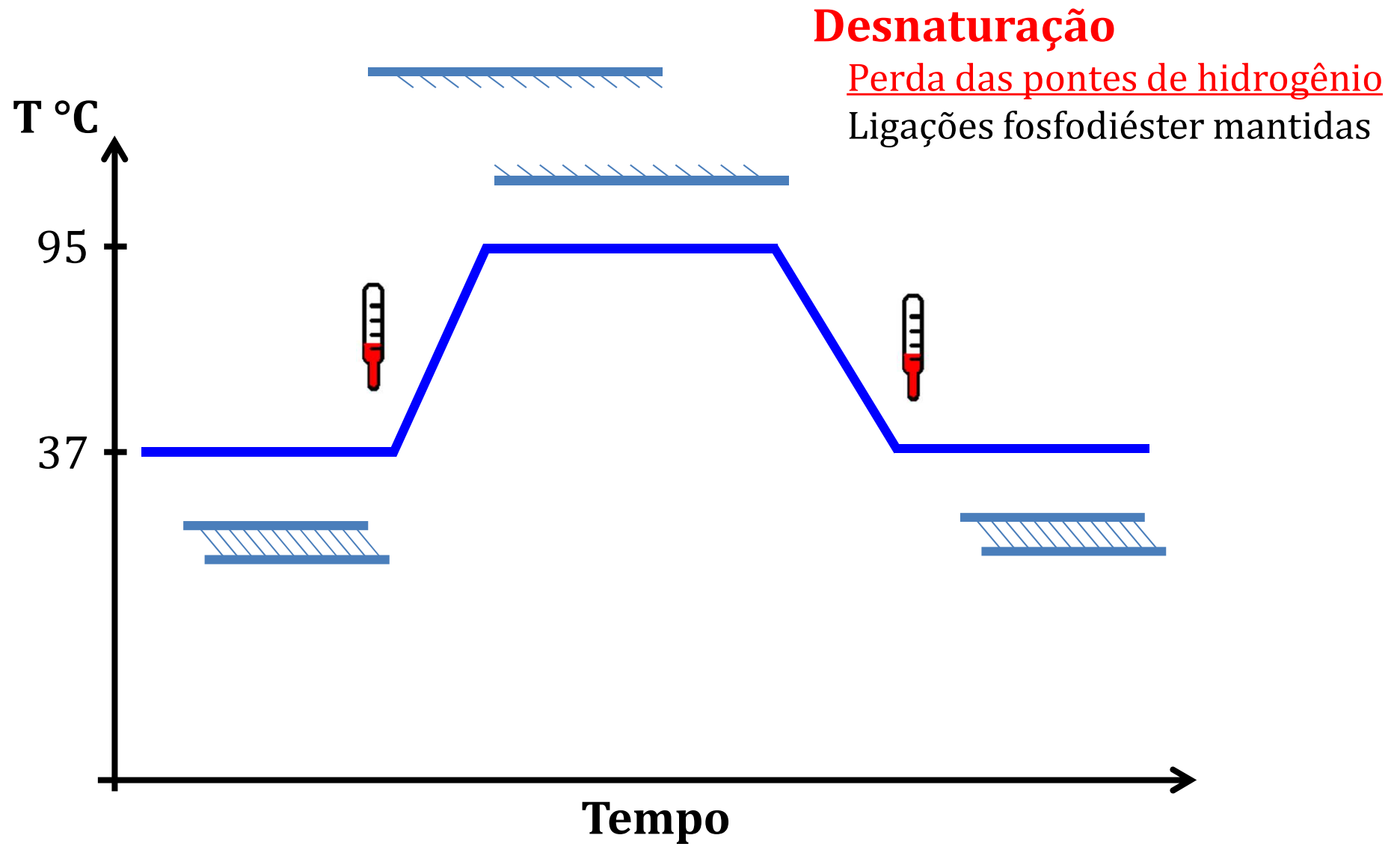
~~⊗ DNA ligase~~



Substituição de 7 proteínas por

GRADIENTE DE TEMPERATURA

PCR: conceito



PCR: conceito

Primers: os iniciadores da reação de PCR

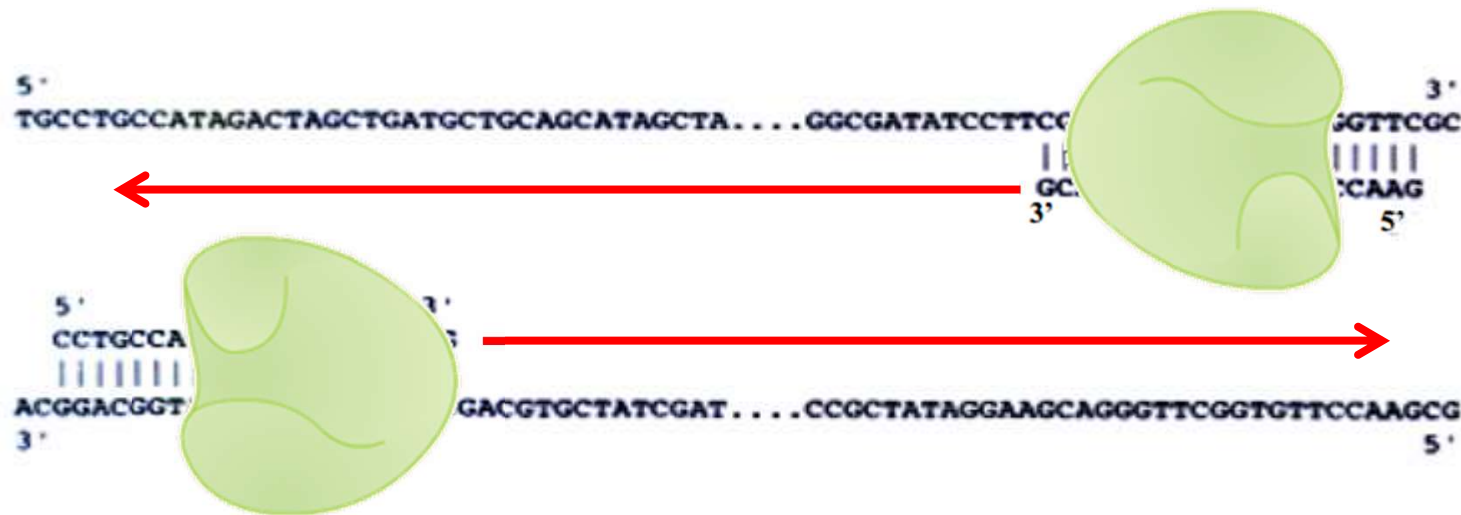
A Enzima DNA polimerase não se liga em fita simples

Iniciadores ou oligonucleotídeos (=PRIMERS)

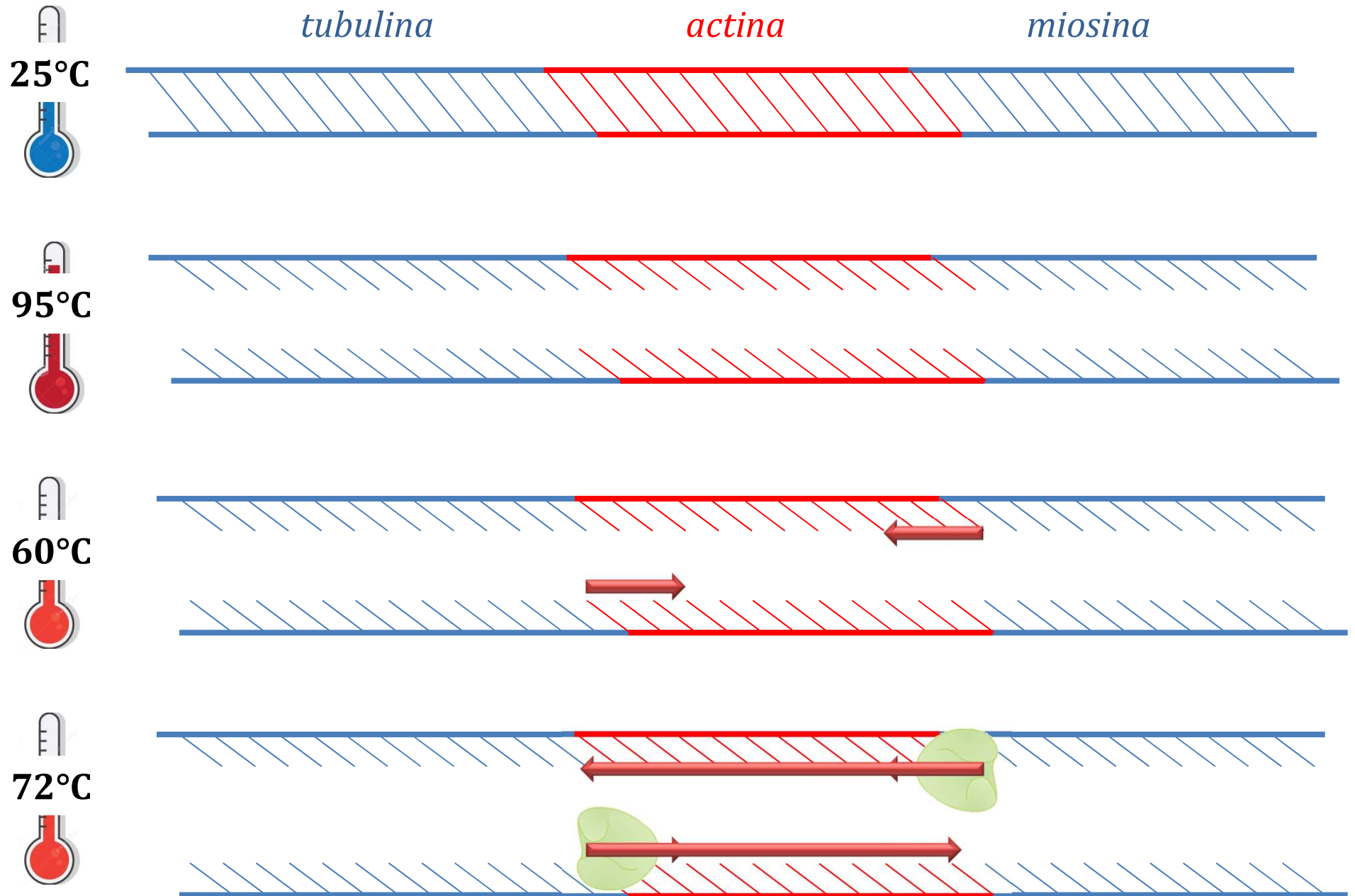
Utilização de pares de iniciadores (um complementar para cada fita)

Iniciador Senso (*Forward*): se liga na fita 3'-5'

Iniciador Antissenso (*Reverse*): se liga na fita 5'-3'



PCR: conceito

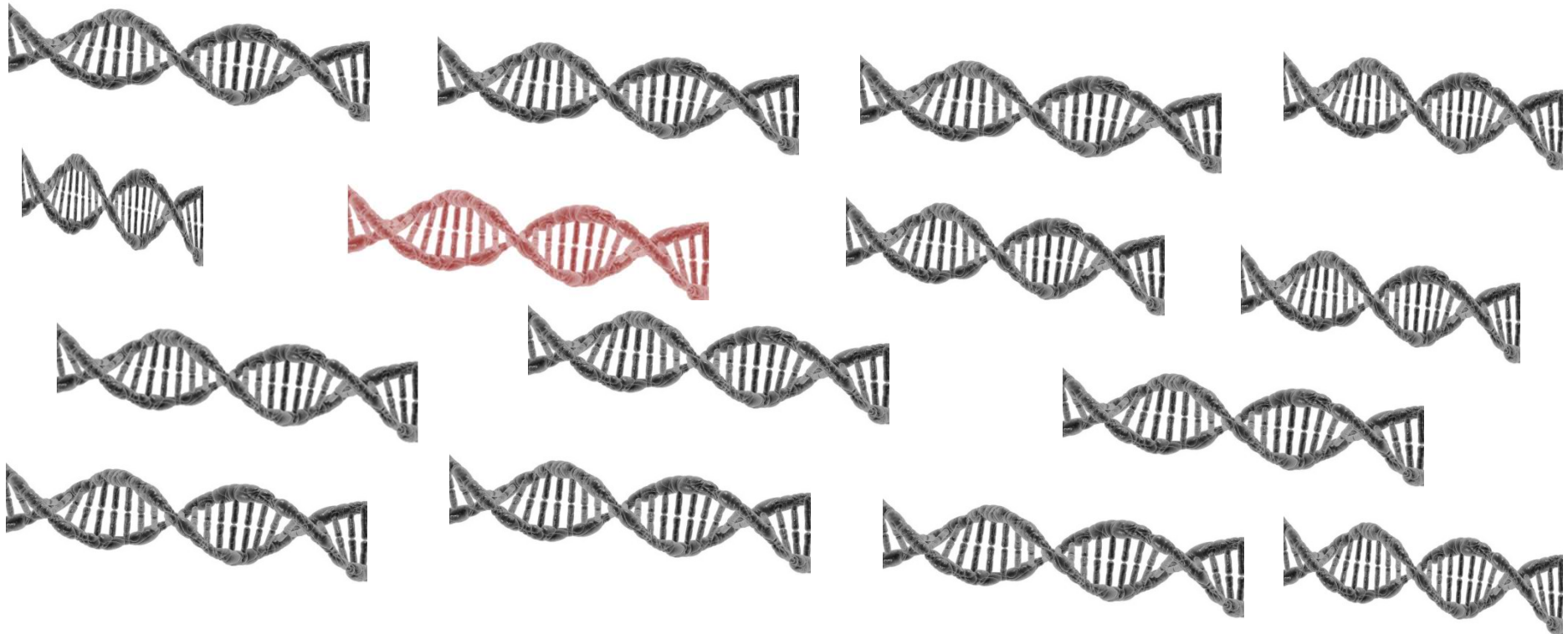


PCR: conceito

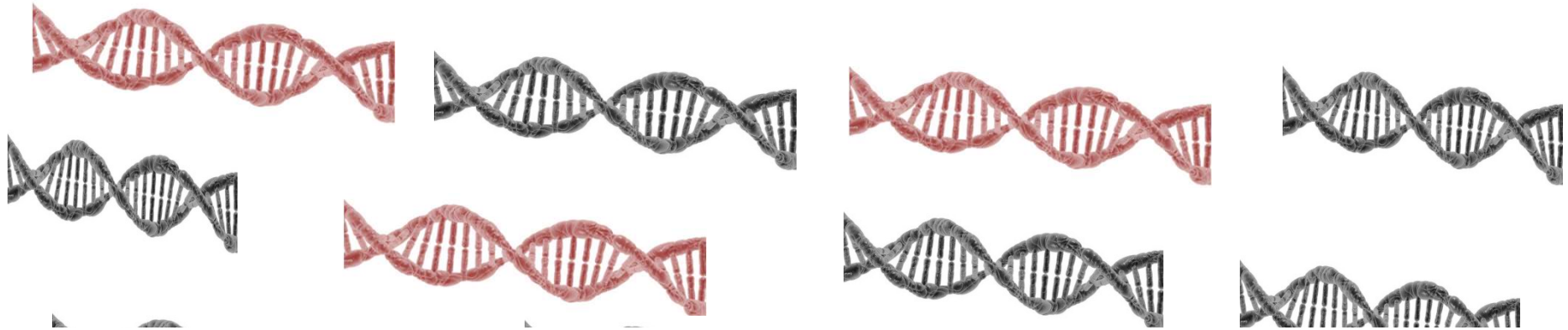
Reação Cíclica



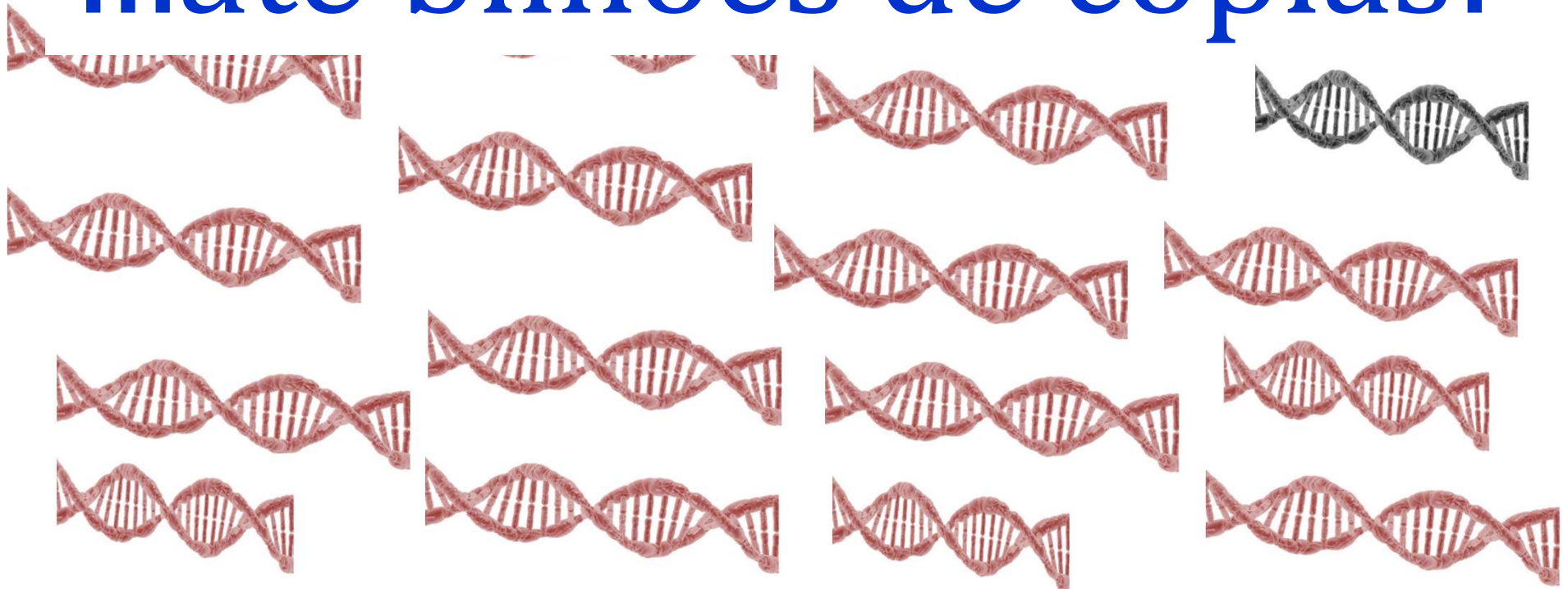
PCR: conceito



PCR: conceito



...até bilhões de cópias!



PCR: conceito

Componentes de uma reação de PCR:

Amostra de DNA

dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

Iniciadores (S e AS)

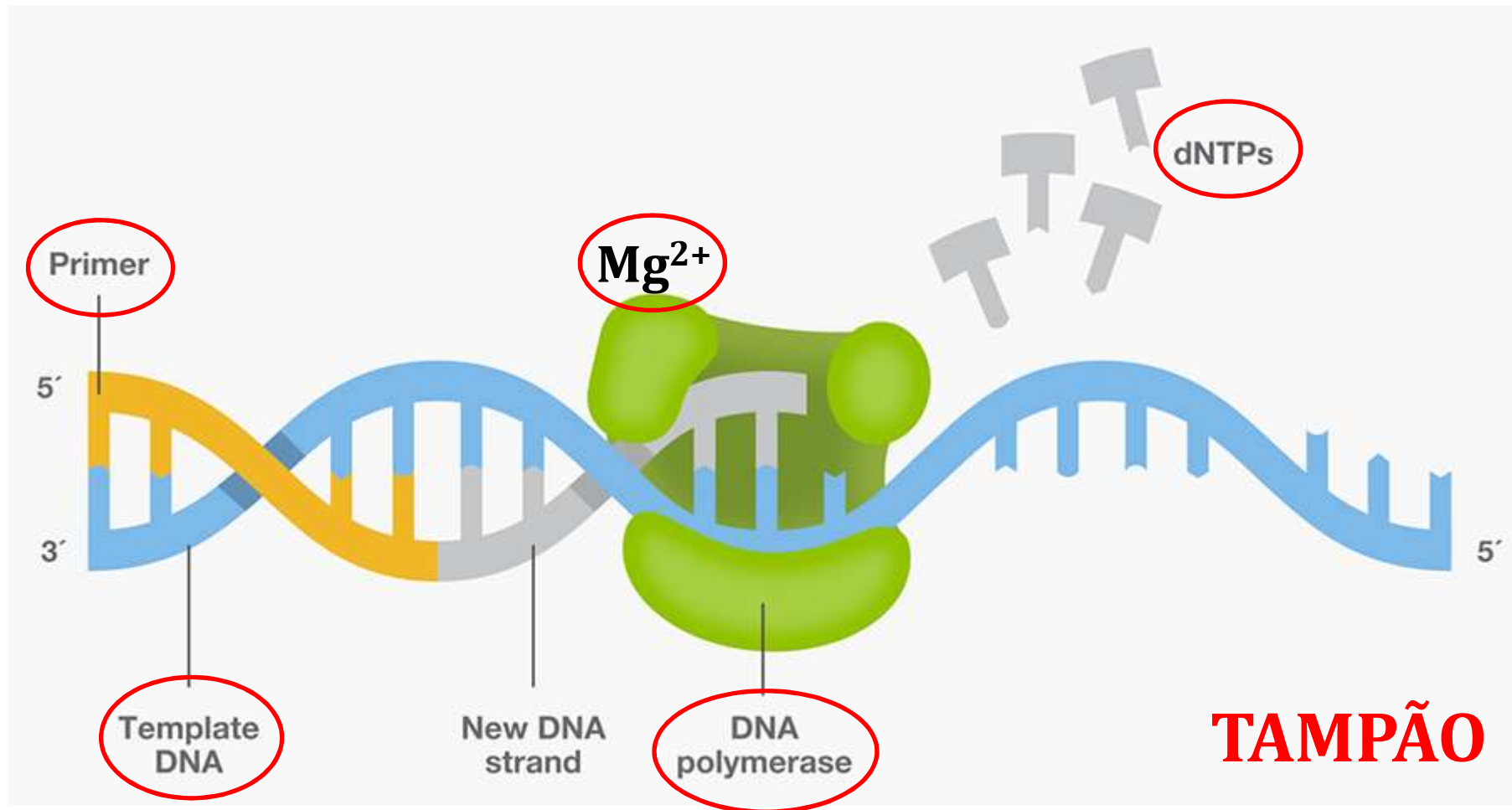
Enzima DNA Polimerase

Tampão da enzima

Mg^{2+} ($MgCl_2$ ou $MgSO_4$)

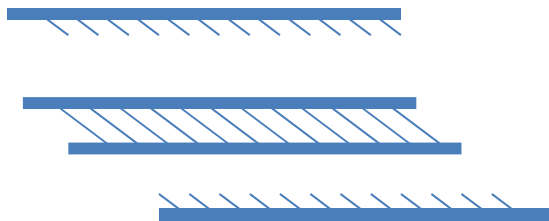


PCR: conceito



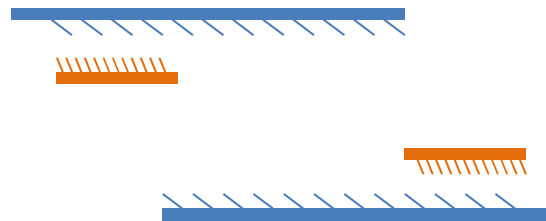
PCR: conceito

As principais etapas:



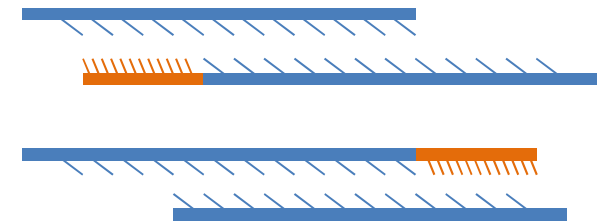
Desnaturação

(90-96°C)



Hibridização

(45-60°C)



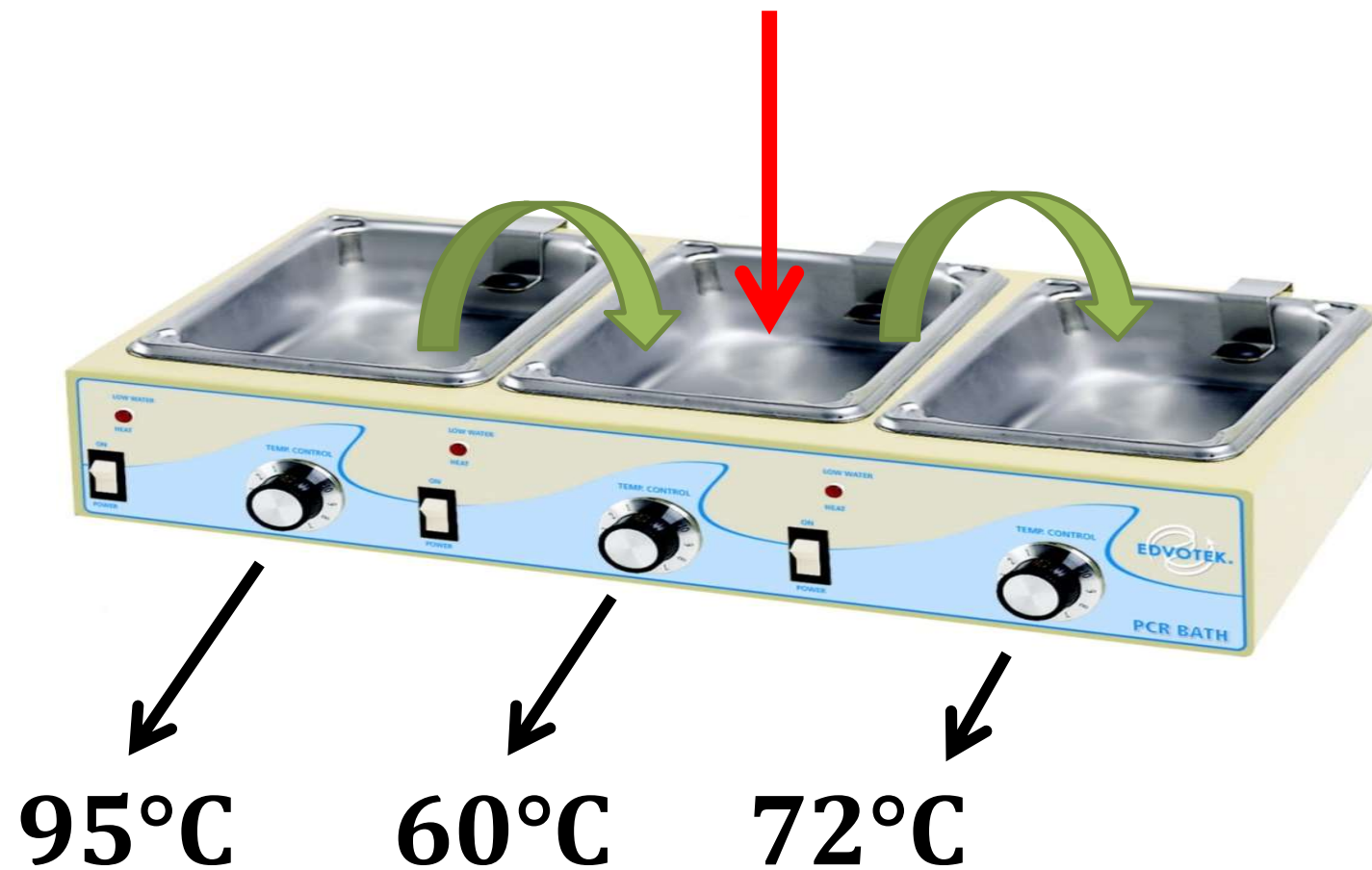
Extensão

(68-72°C)

DNA Polimerase
(termoestável)

PCR: histórico

Enzima DNA polimerase



PCR: histórico

29 JANUARY 1988

Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase

RANDALL K. SAIKI, DAVID H. GELFAND, SUSANNE STOFFEL,
STEPHEN J. SCHARF, RUSSELL HIGUCHI, GLENN T. HORN,
KARY B. MULLIS,* HENRY A. ERLICH

A thermostable DNA polymerase was used in an in vitro DNA amplification procedure, the polymerase chain reaction. The enzyme, isolated from *Thermus aquaticus*, greatly simplifies the procedure and, by enabling the amplification reaction to be performed at higher temperatures, significantly improves the specificity, yield, sensitivity, and length of products that can be amplified. Single-copy genomic sequences were amplified by a factor of more than 10 million with very high specificity, and DNA segments up to 2000 base pairs were readily amplified. In addition, the method was used to amplify and detect a target DNA molecule present only once in a sample of 10^5 cells.

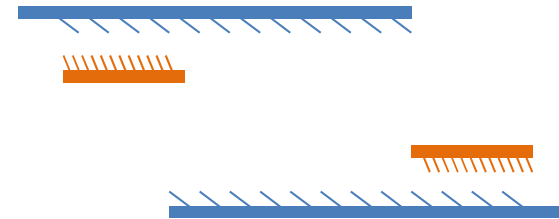
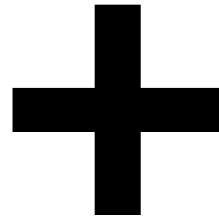
SCIENCE, VOL. 239

PCR: histórico



***Thermus aquaticus* (1976)
(Yellowstone National Park)**

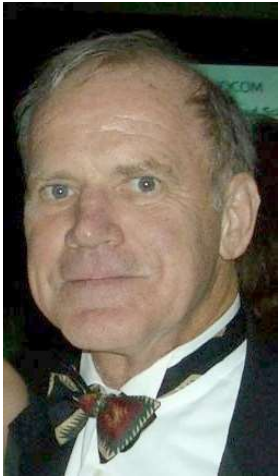
(*Taq* DNA polymerase)



Pares de iniciadores



PCR: histórico

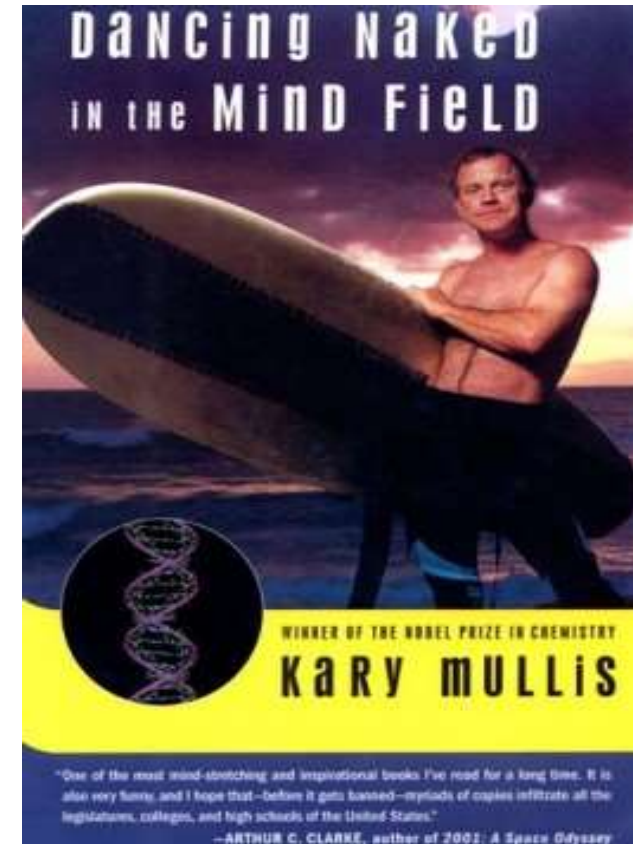


Kary Banks Mullis

1983 – Automação da técnica de PCR

1989 – Patente (Hoffman La Roche & Perkin-Elmer Corporation)

1993 – Prêmio Nobel de Química



PCR

Amplificação da sequência alvo

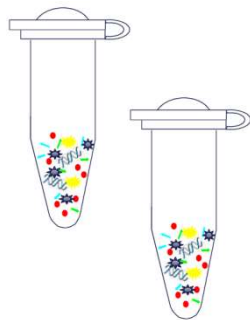
Fases da PCR: **princípio básico**

Reação enzimática: **DNA polimerase**.

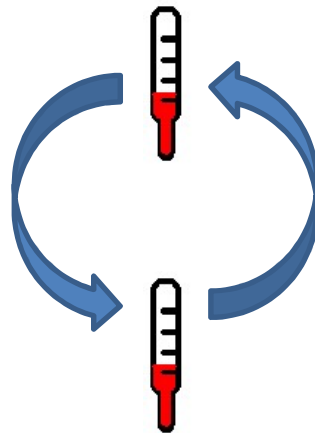
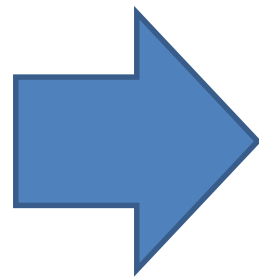
Temperatura + pH

Temperaturas diferentes: **enzima** e **substrato/produto**

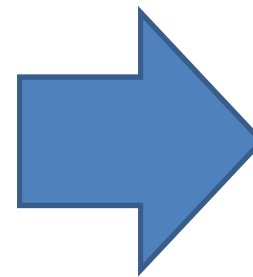
Produto da reação: **Gel (agarose; poliacrilamida)**.



Reagentes

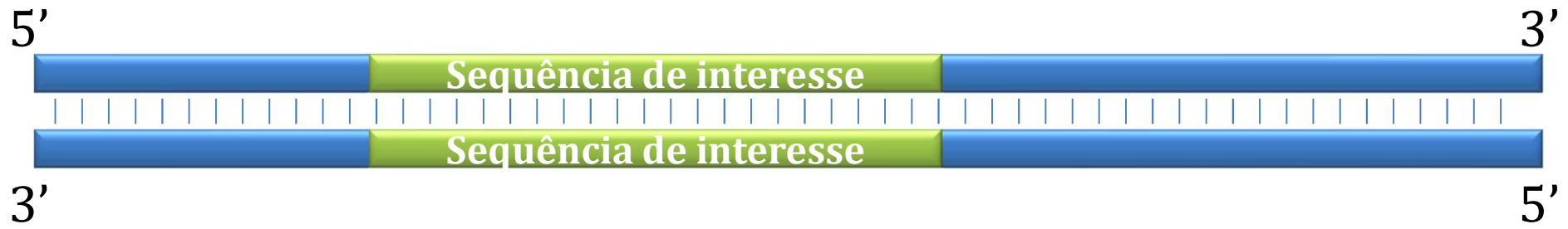


Termociclador



Gel

Fases da PCR: princípio básico



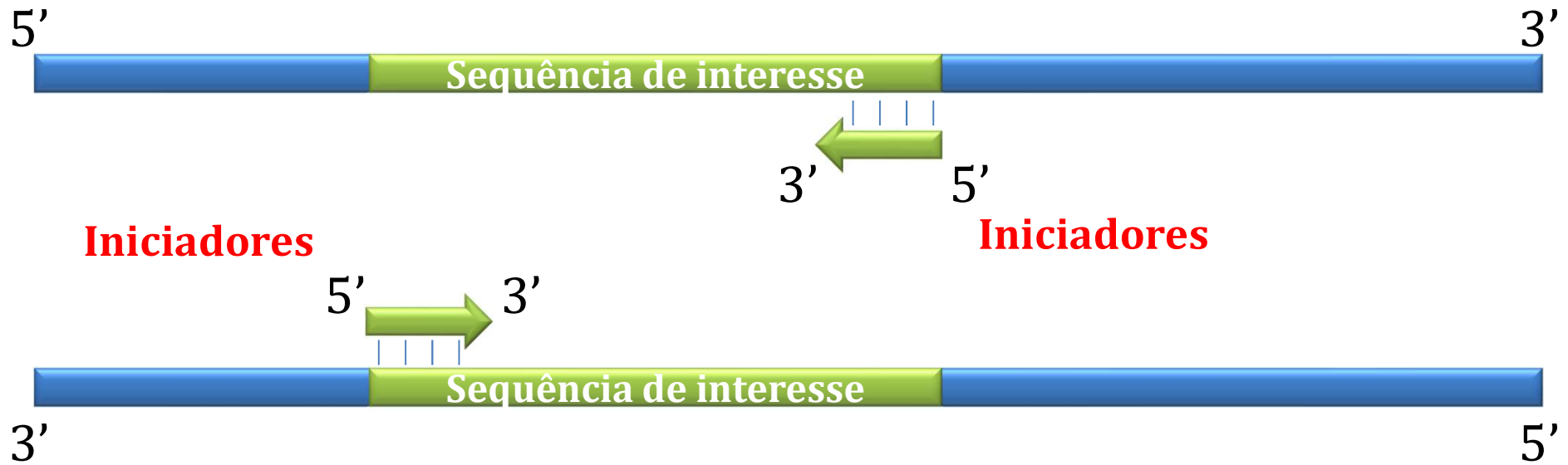
25°C

Fases da PCR: princípio básico



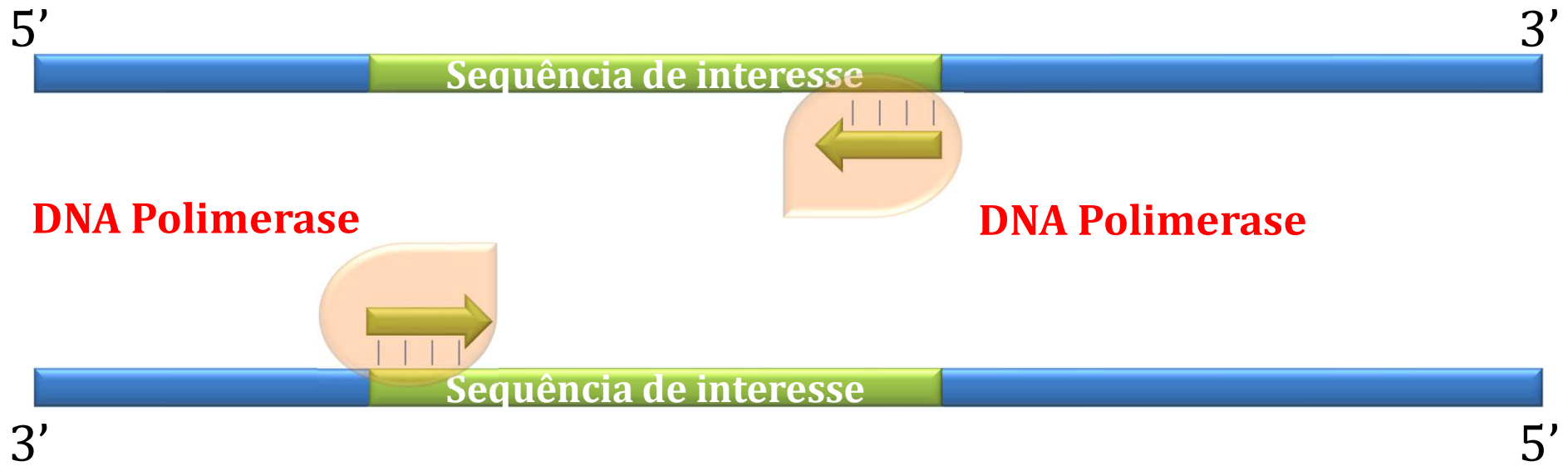
95°C

Fases da PCR: princípio básico



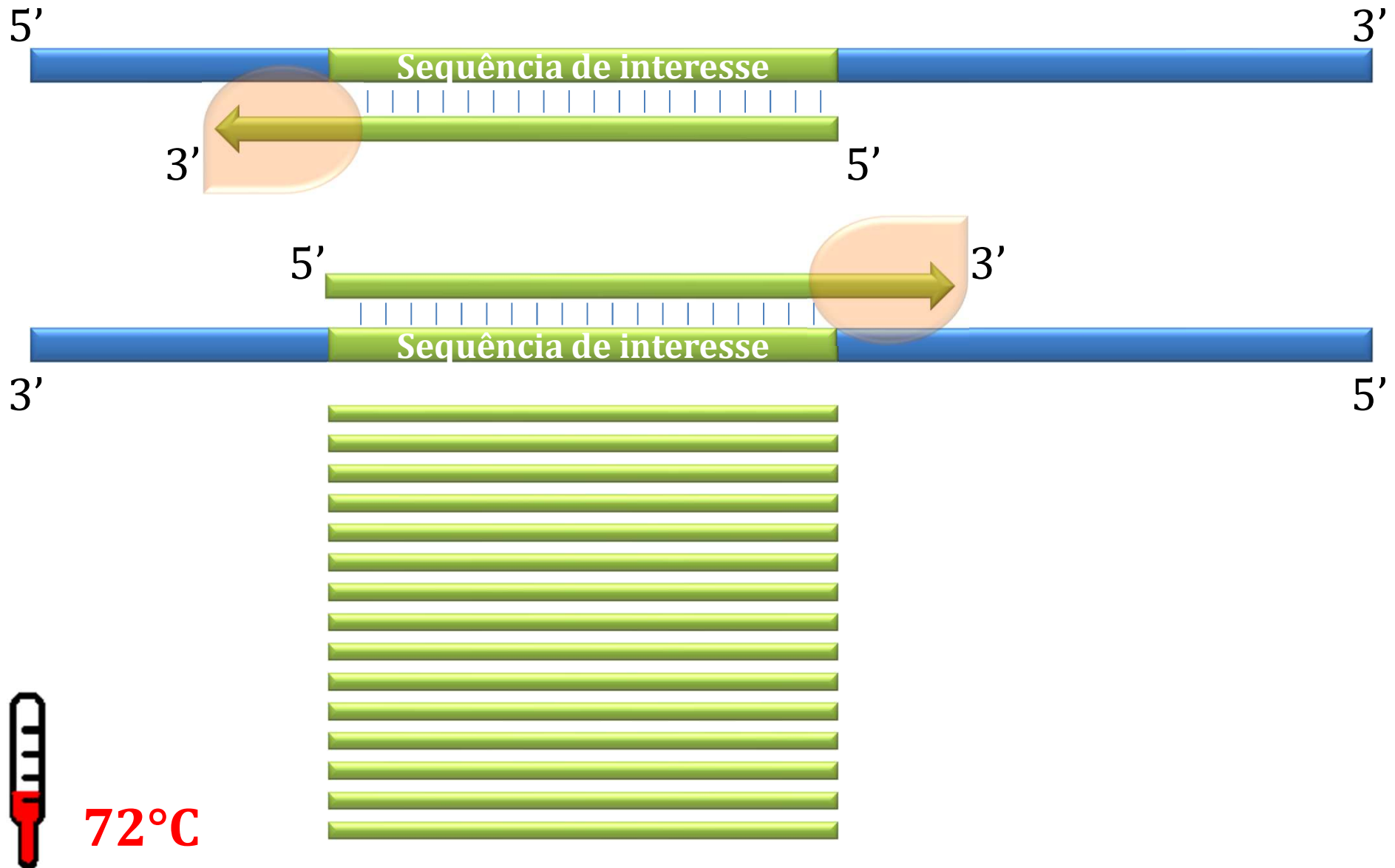
60°C

Fases da PCR: princípio básico



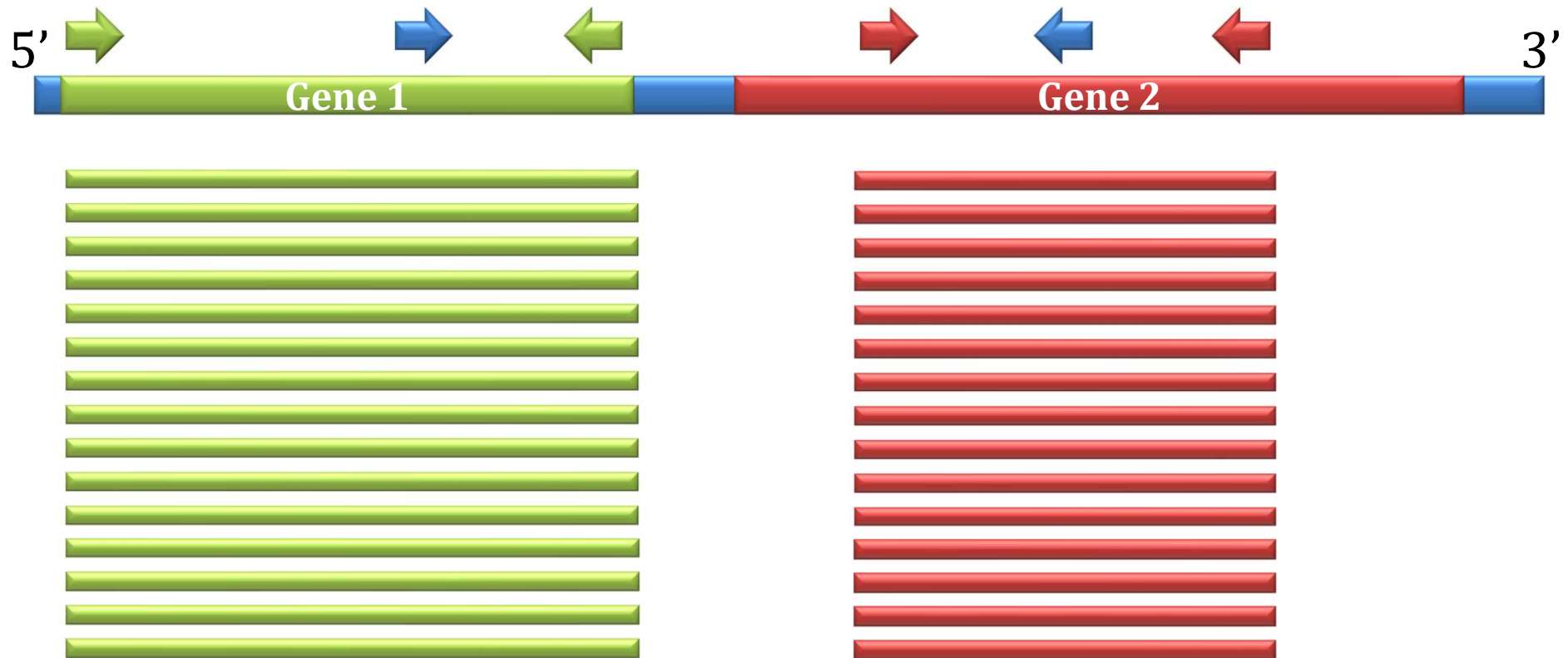
72°C

Fases da PCR: princípio básico

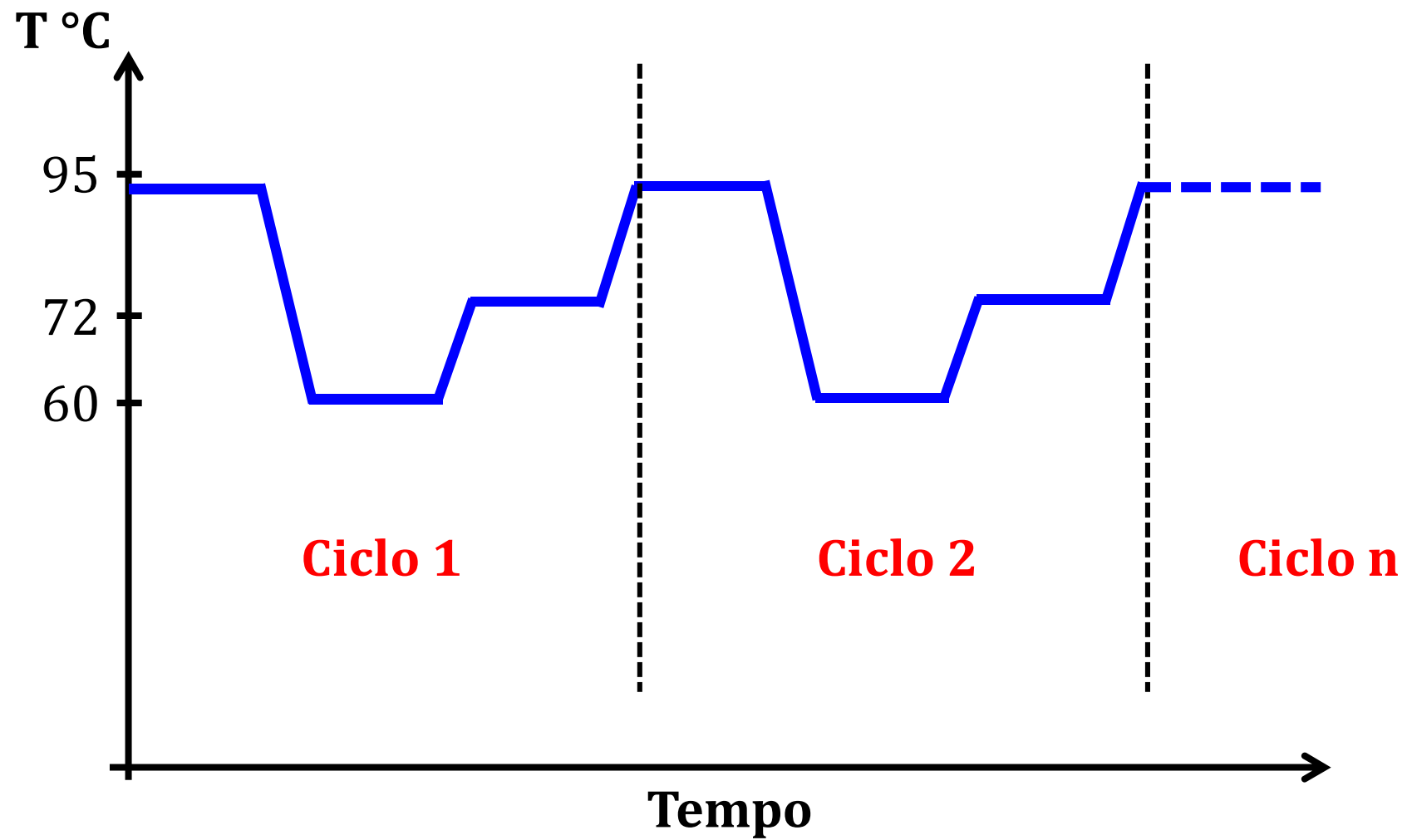


Fases da PCR: princípio básico

Replicação *in vitro* de **sequências específicas** de DNA



Fases da PCR: **ciclos**

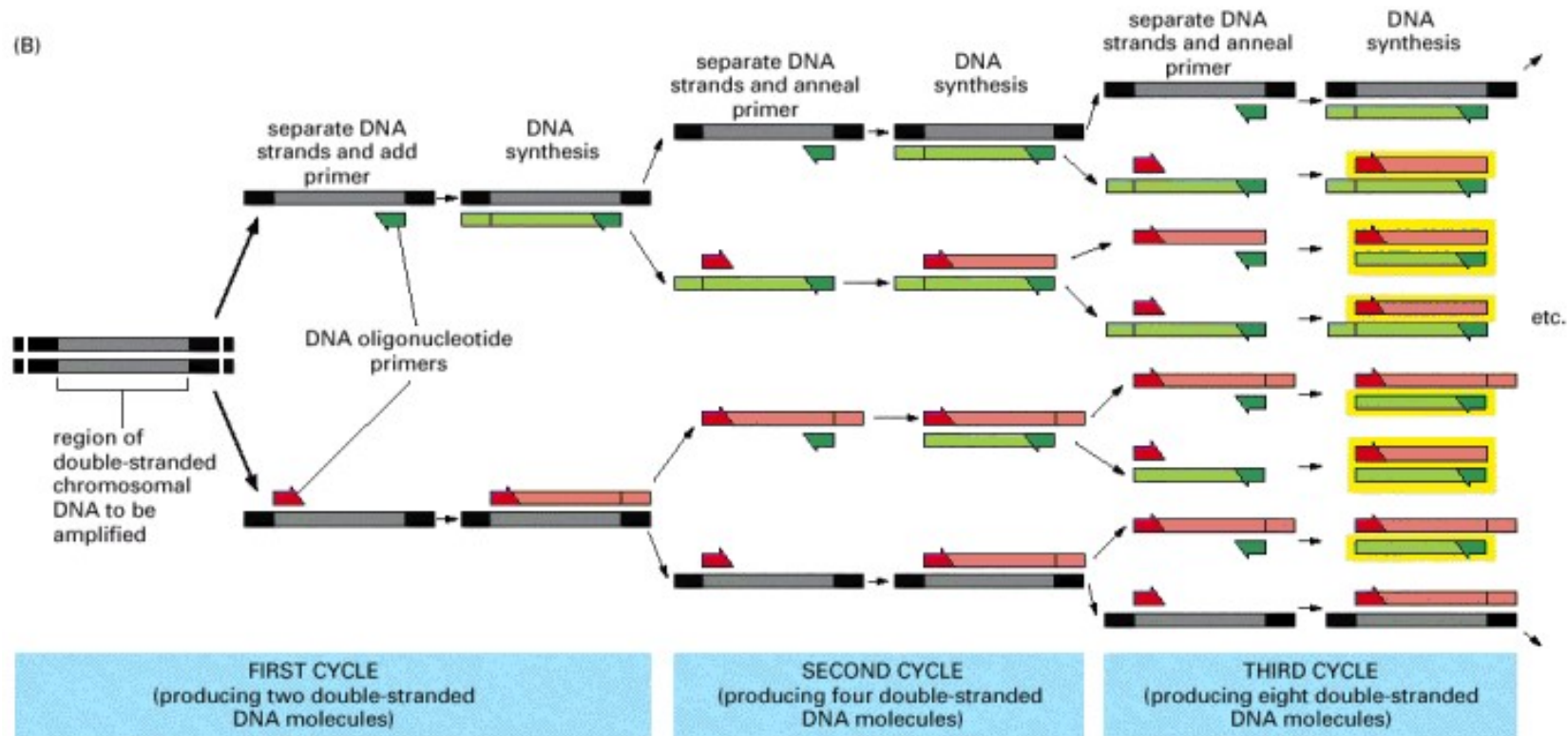


Fases da PCR: **ciclos**

Termocicladores



Fases da PCR: amplificação da sequência alvo



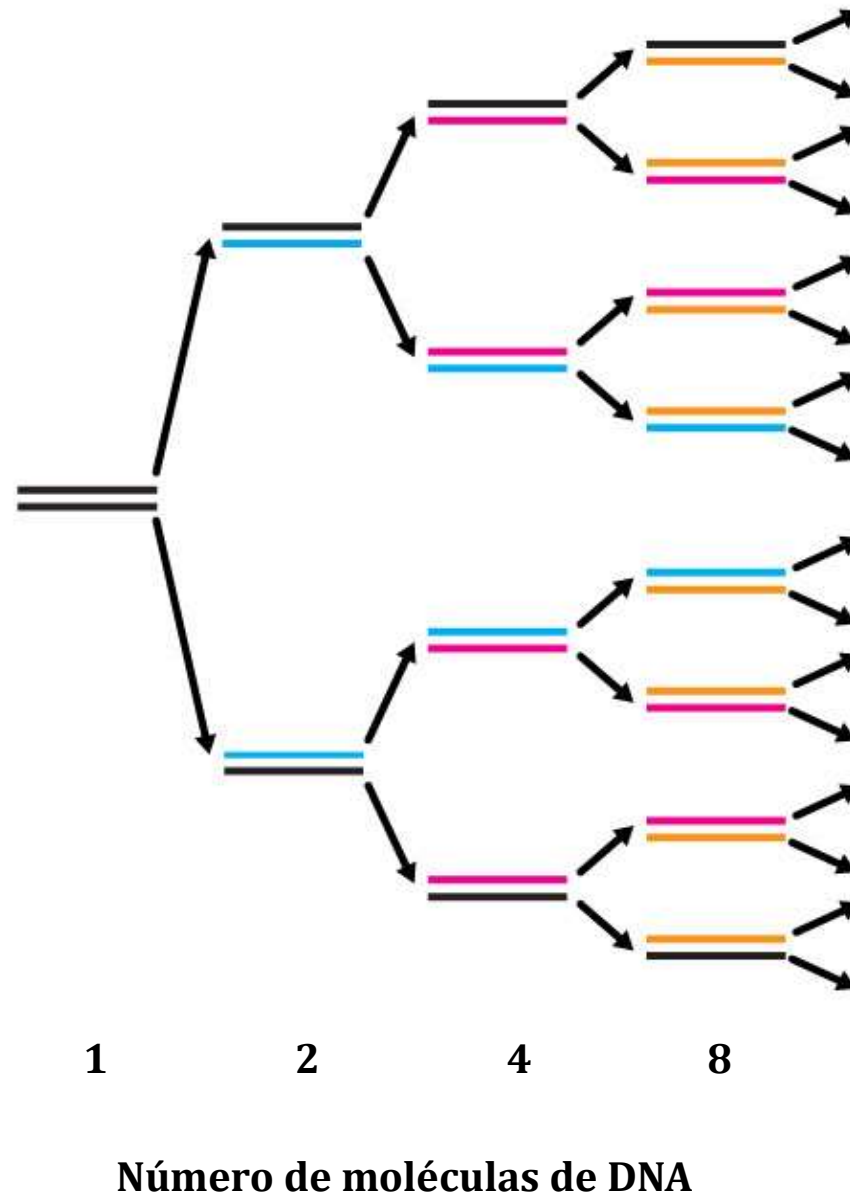
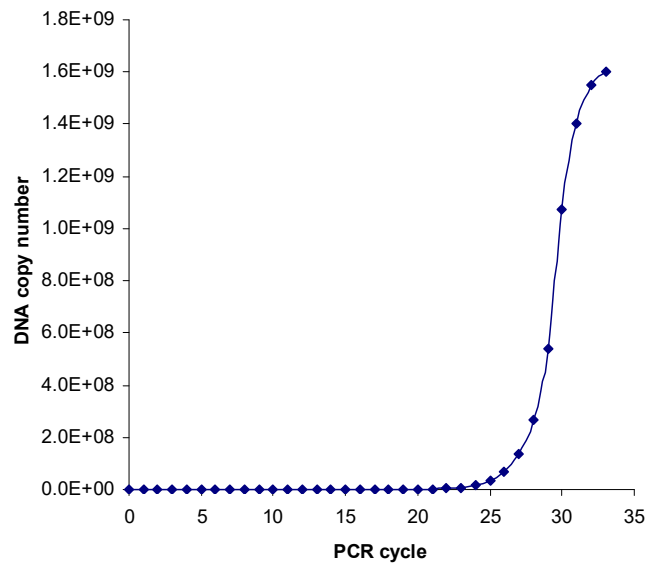
<http://www.youtube.com/watch?v=ZmqgRPISg0g>

Fases da PCR: **amplificação da sequência alvo**

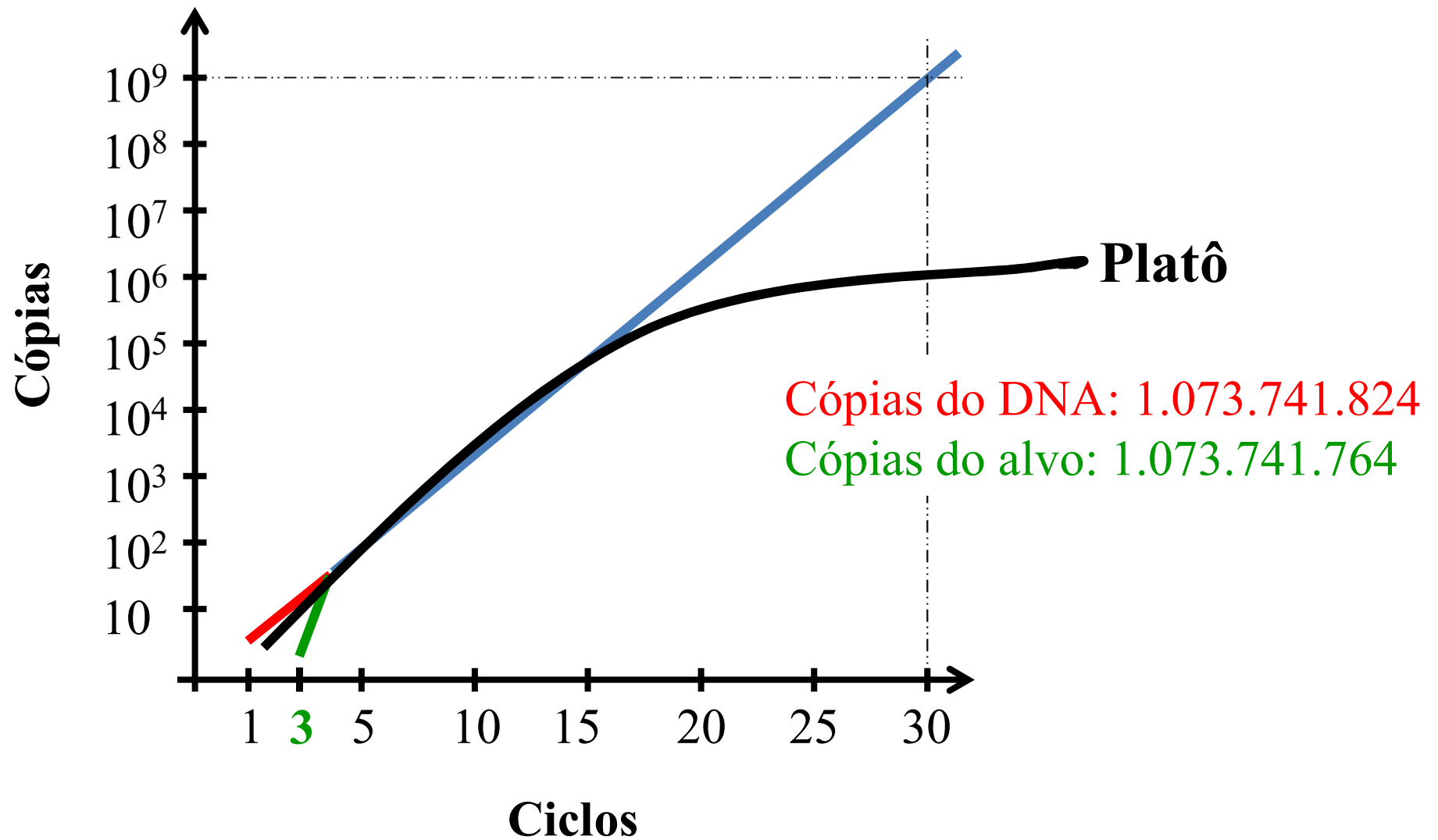
Polymerase Chain Reaction

Fases da PCR: amplificação da sequência alvo

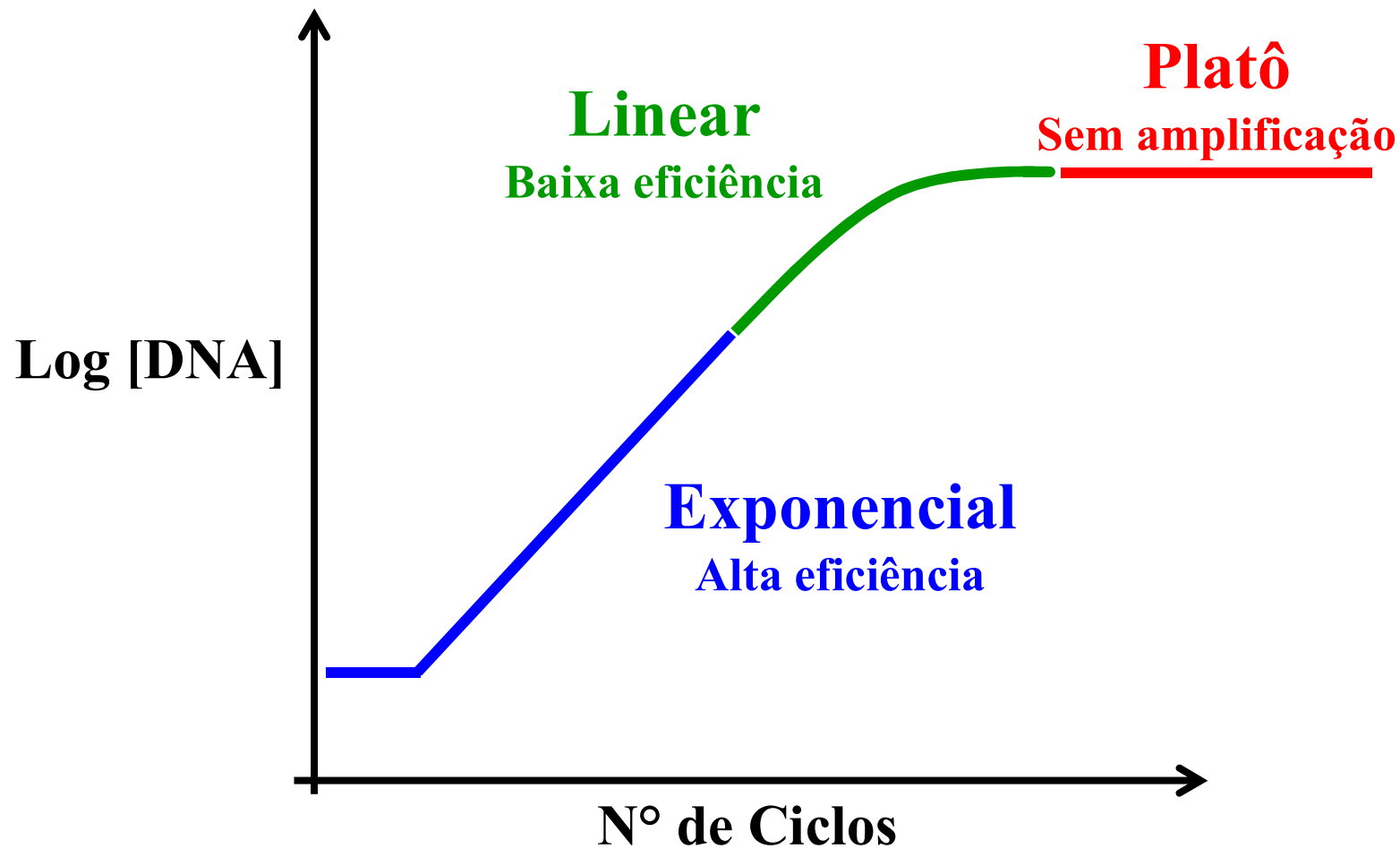
Rate of PCR 2^n



Fases da PCR: amplificação da sequência alvo

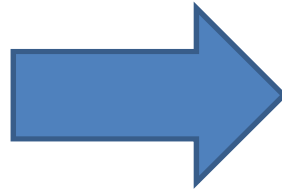


Fases da PCR: amplificação da sequência alvo



Fases da PCR: **amplificação da sequência alvo**

Platô
Sem amplificação



Detecção em gel

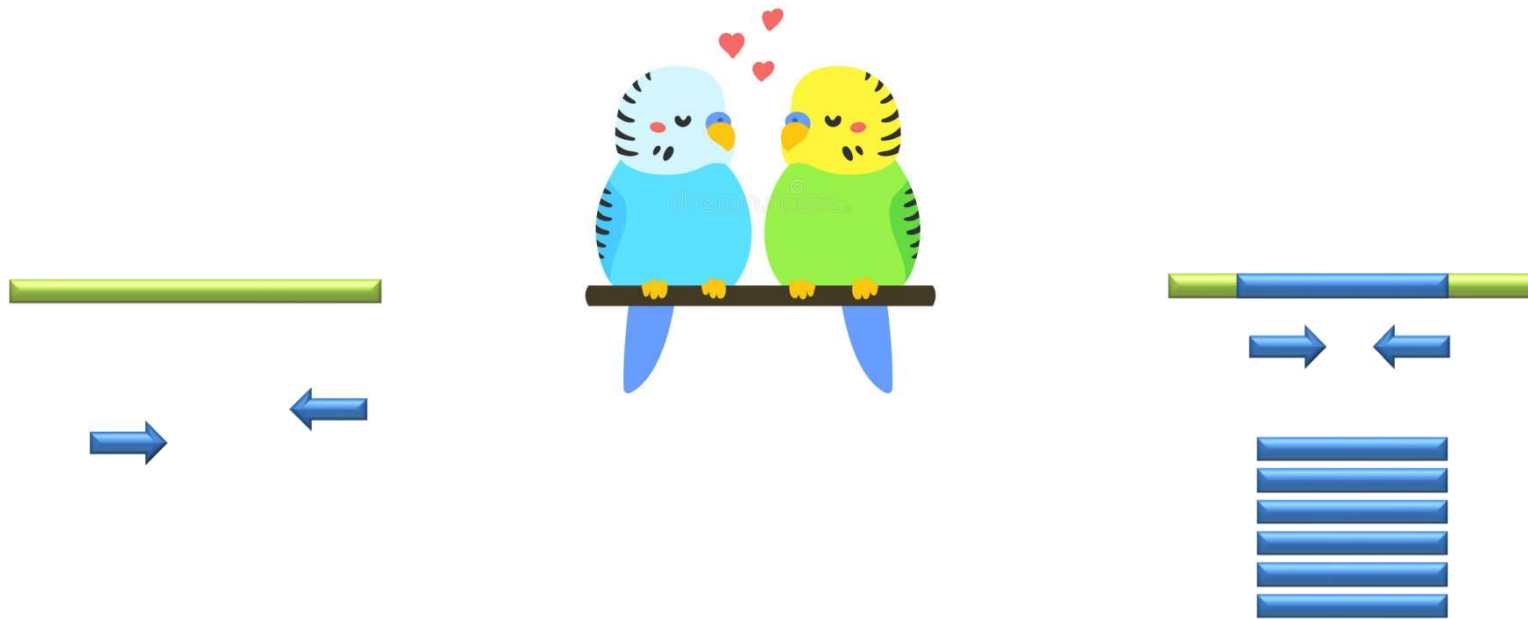
- Perda da atividade da enzima
- Todas as enzimas disponíveis estão ocupadas com a síntese de DNA
- Acúmulo de produtos amplificados que tendem a parear entre si, em detrimento do pareamento com os iniciadores
- Gasto dos reagentes, especialmente dos iniciadores e dos dNTPs
- Acúmulo de pirofosfato (resultante das ligações fosfodiéster)
- Competição com outros produtos que vinham sendo amplificados
- INIBIÇÃO PELOS PRODUTOS

PCR

Aplicações da técnica

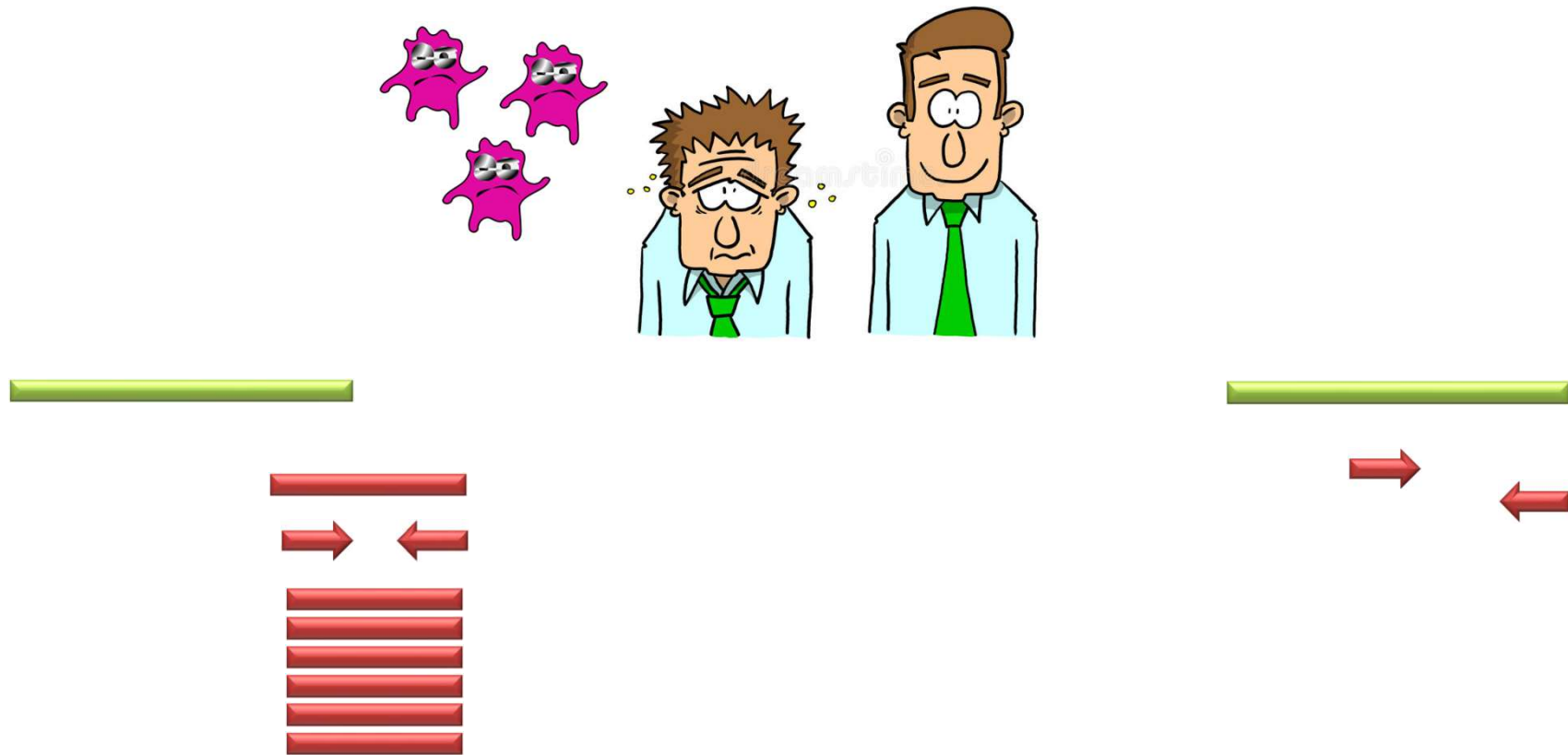
PCR: aplicações

Identificação molecular



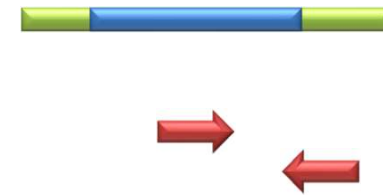
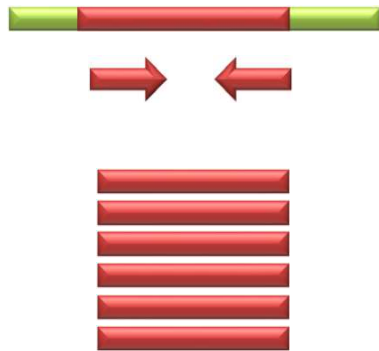
PCR: aplicações

Diagnóstico molecular



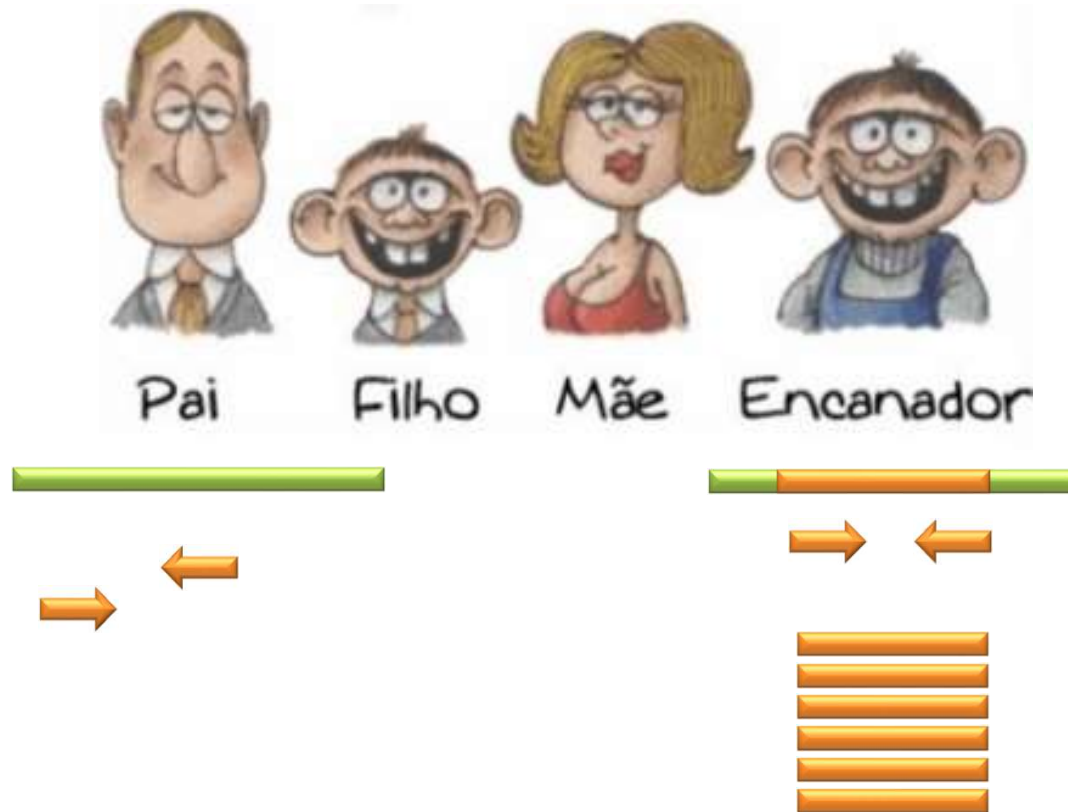
PCR: aplicações

Detecção de mutações



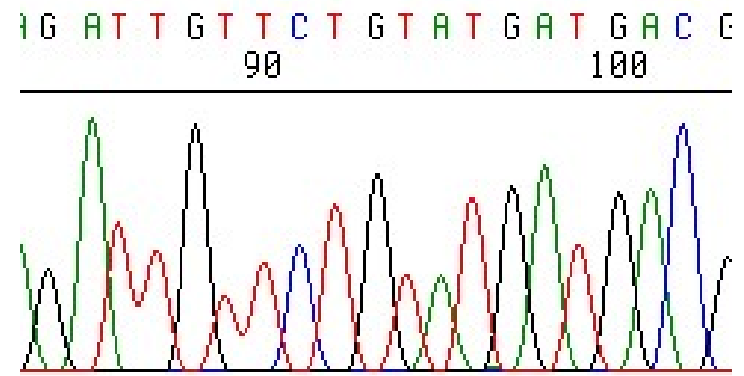
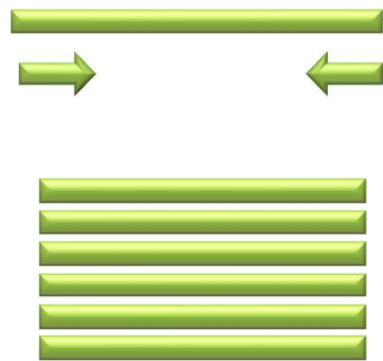
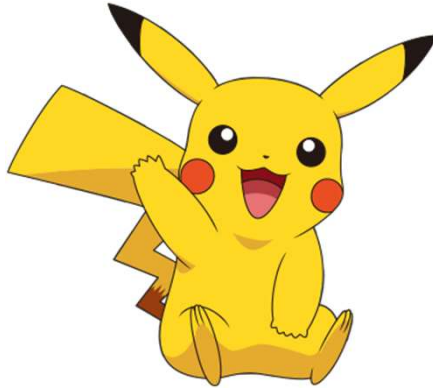
PCR: aplicações

Medicina forense



PCR: aplicações

Filogenia molecular



PCR: aplicações

As diferentes aplicações da técnica de PCR:

Amplificação de fragmentos específicos de DNA

Clonagem de genes e transcritos

Medicina forense

Diagnóstico molecular

Deteccção de mutações

Identificação de espécies

Análises de expressão gênica

Filogenia molecular...



Fim