

Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações

BSc. Daniel Perez Vieira

(Protozoologia-IMTSP/ Laboratório de Biologia Molecular-IPEN)

Aula 1 - PCR: Princípios e tipos de Reação

Breve Histórico

Desenvolvida por Saiki, *et al.* (1985) e principalmente por Mullis, *et al.* (1987). Kary Mullis, que percebeu que possuía uma importante ferramenta em mãos, tentou publicar seus experimentos nas duas revistas científicas mais importantes do mundo, a *Science*, americana, que prontamente lhe negou a publicação, e a *Nature*, britânica, que procedeu da mesma forma. Mullis, resignado, conseguiu publicar então seu artigo sobre amplificação do gene da β -globina humana na *Methods in Enzymology*, de impacto infinitamente menor.

Apesar dos fracassos iniciais, a *Perkin-Elmer Cetus*, uma reconhecida empresa de insumos para pesquisa comprou-lhe a patente, o que lhe rendeu bons lucros, não antes de ser agraciado com o prêmio Nobel de Química em 1993.

Hoje a *Perkin-Elmer* repassou os direitos à *Roche Molecular Systems* (valor da compra: US\$ 300.000.000,00), que possui todas as patentes envolvidas no processo de PCR, inclusive as relacionadas aos termocicladores convencionais. Porém, a tecnologia tornou-se tão difundida que o custo de pagamento da patente tornou-se acessível às suas concorrentes, e a variedade de reagentes e aparelhos atualmente no mercado é grande.

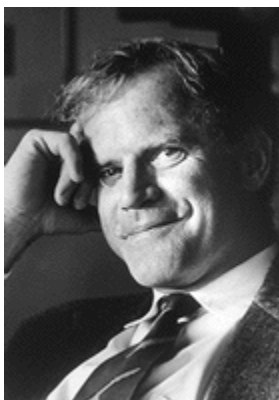


Fig. 1: Kary Mullis, inventor da PCR, em foto de 1994 (© Nobel Academy)

Na verdade, Saiki já havia descrito a técnica, mas Mullis inovou: Conseguiu especificidade na cópia de apenas segmentos específicos, introduzindo o conceito de *primer* de PCR, e na utilização de uma DNA polimerase termoestável. Até então, a precursora da PCR demandava grandes quantidades de enzima, adicionadas a cada ciclo de amplificação. Além disso, desenvolveu-se vários equipamentos para a automatização da adição da enzima após cada ciclo, todos de custo elevadíssimo (os primeiros “termocicladores”). Mullis utilizou a então recém descrita *Taq*, DNA polimerase termoestável isolada da bactéria de fontes termais *Thermus aquaticus*. Esta enzima se mantém estável em temperaturas de até 117°C, com temperatura ótima de 72°C. Estes dois passos tornaram a técnica muito mais fácil de se realizar.

Porém, a realização manual dos ciclos de temperatura, banhando-se um *rack* de tubos em vários banhos-maria de temperaturas diferentes, ainda constituía um fator dificultante do processo. Em 1989, o *DNA Thermal Cycler* apareceu como o primeiro termociclador automático. Até hoje, a maioria dos termocicladores automáticos funciona com o mesmo princípio: aquecimento por resistências elétricas e refrigeração com ventoinhas e tubulações em serpentina preenchidas por etileno glicol. Aperfeiçoou-se os sistemas de contagem de tempo, para aumentar a confiabilidade das reações. Em meados dos anos 90 surge o padrão *Peltier*, cujo bloco de aquecimento é composto por uma liga metálica que aquece ou resfria de acordo com o sentido da corrente elétrica aplicada.



Fig. 2: Termociclador atual. Observa-se a presença do bloco de ensaio.

A repercussão da invenção da PCR foi tão grande, que o médico Michael Crichton, escritor de “Parque dos Dinossauros”, afirmou que teve a idéia de escrever este roteiro ao ler a descrição da técnica, fato que reforça a idéia da versatilidade do processo. Ainda sobre a repercussão da técnica, hoje existem grandes empresas e grupos de pesquisa tentando descobrir alternativas á PCR, sem grande expressão devido ao sucesso da criação do químico norte-americano Kary Mullis.

Fundamentos e Objetivos

Multiplicar um trecho específico do DNA (gene ou parte dele, regiões supervariáveis, *Junk DNA*, etc.) utilizando desoxinucleotídeos como monômeros até um ponto em que sua concentração em dada solução seja tão alta que possa ser facilmente detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias. Portanto, Kary Mullis na verdade propôs uma técnica que consegue resolver um grande problema da análise de ácidos nucleicos: sua baixa quantidade na maioria dos tecidos vivos.

A multiplicação destes trechos específicos se dá alternando-se a temperatura de ensaio entre: a) Denaturação das cadeias do DNA genômico; b) anelamento (*annealing*) dos *primers*, usados para delimitar a seqüência a ser amplificada; c) temperatura ótima específica da enzima: 72°C; d) reinício do ciclo.

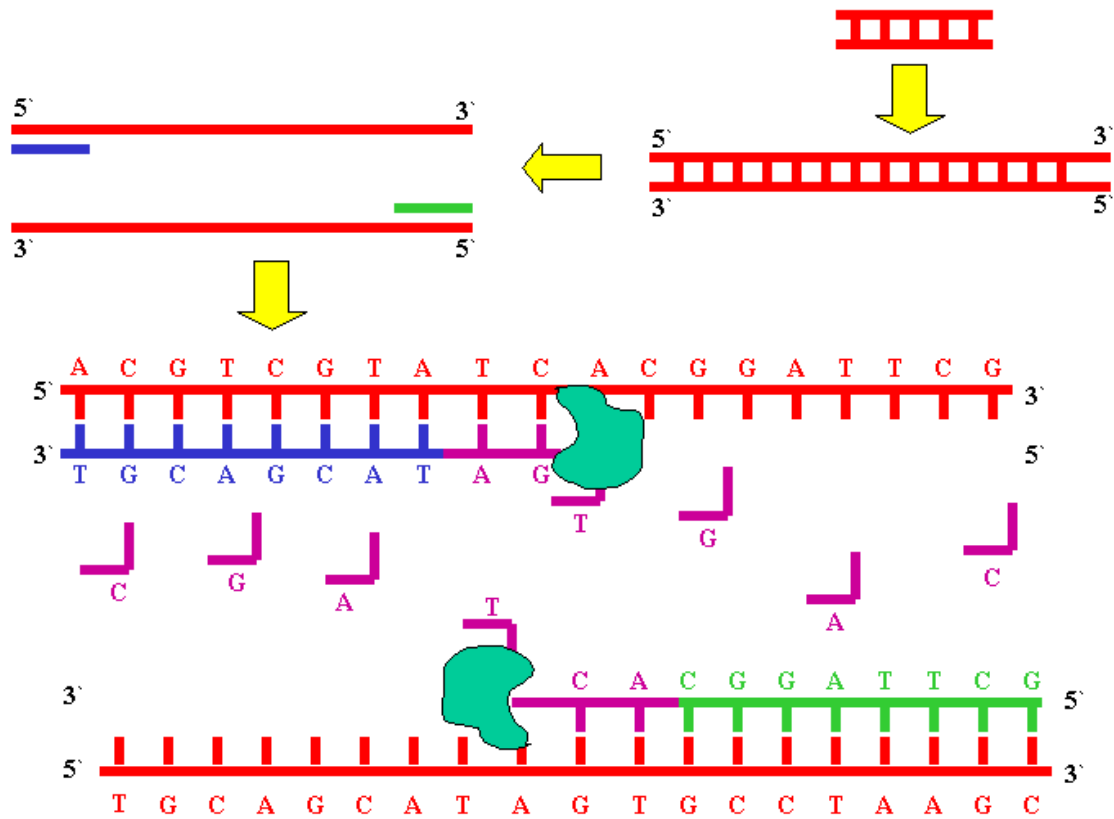


Fig. 3: Esquema dos processos realizados numa reação de PCR. Após a denaturação das fitas-molde, ocorre o pareamento dos *primers*. A enzima, representada em verde, adiciona os desoxinucleotídeos complementarmente às fitas-mãe.

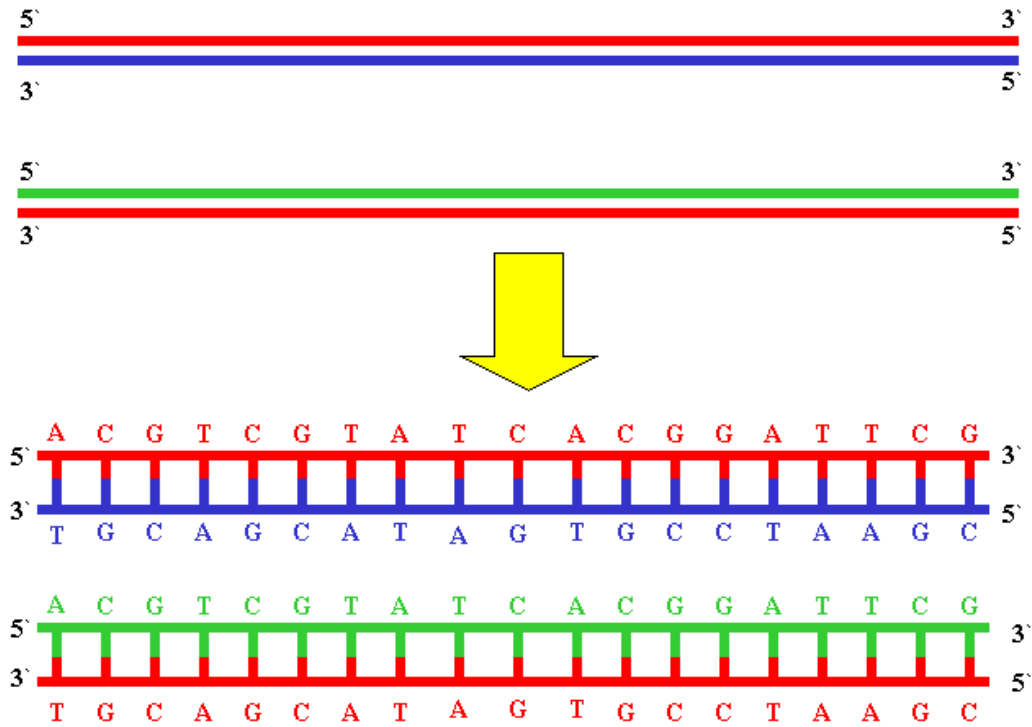


Fig. 4: Passos finais de uma reação de PCR. A figura mostra as duas fitas-mãe, pareadas com as suas fitas-filha complementares, sintetizadas a partir da adição dos desoxinucleotídeos pela DNA polimerase.

A quantidade de DNA final segue uma função exponencial, onde:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

N = Número final de cadeias de DNA
N₀ = Número inicial de DNA molde (*template*)
n = Número de repetições do ciclo

Portanto, a concentração final do DNA molde na solução é muito maior (da ordem de 2^{35}) do que a inicial, possibilitando a sua identificação.

Reagentes Necessários para a Reação

A reação SEMPRE parte de um DNA molde, extraído convenientemente da amostra, ou de uma amostra de RNA, convertida para cDNA (DNA complementar). O ideal é que o ácido nucléico esteja livre de impurezas (proteínas, lipídeos, outro ácido nucléico, reagentes de extração, etc.) e numa concentração mínima de 5µg/mL, apesar de quantidades bem menores poderem ser utilizadas (em medicina forense, chegou-se a utilizar quantidades de até 10^{-12} mol de DNA).

A DNA polimerase: A mais utilizada ainda é a *Taq*, numa concentração que varia de 1 a 4U por microlitro de solução. Normalmente, a maioria das DNA polimerases disponíveis no mercado são fornecidas conjuntamente com uma solução-tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante. Basicamente, estas soluções contêm íons diversos (Na^+ , Cl^- , K^+ , entre outros) que otimizam as condições de reação. Alguns tampões contêm ainda detergentes (Tween 20, Triton X-100, Nonidet P-40), inibindo a formação de dímeros das cadeias enzimáticas, proteínas estabilizantes (*BSA = Bovine Serum Albumin = Albumina Sérica Bovina*) e algumas substâncias que agem na denaturação da cadeia molde

de DNA (*DTT* = *Dithiothreitol*, β -mercaptanoethanol), quebrando as pontes de hidrogênio entre as bases.

Um reagente de importância crítica é o $MgCl_2$, doador muito estável de íons Mg^{2+} , que são cofatores indispensáveis para atividade da enzima. Algumas enzimas utilizam outros íons metálicos como cofatores. Um desses casos, e talvez o mais interessante é a enzima *Tth* (*Thermus thermophilus*) Polimerase. Esta enzima possui atividade DNA polimerásica em presença de íons Mg^{2+} ; porém, na presença de Mn^{2+} esta mesma enzima apresenta atividade de uma transcriptase reversa, ou seja, sintetiza DNA a partir de uma cadeia de RNA.

Os desoxinucleotídeos são a matéria-prima propriamente dita para a síntese das fitas-filhas. São compostos por nucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP) desoxilados no carbono 5' da desoxirribose. São adicionados pela polimerase complementarmente à fita-mãe. Adiciona-se uma mistura de todos os dNTP's em concentrações iguais à reação.

Os dNTP's são ligados à fita-mãe pela polimerase numa área delimitada pelos *primers*, que são pequenas seqüências de DNA (12 a 35 bases) complementares às bordas

Tipos de reação de PCR mais comuns

RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction): Esta reação é composta de 2 partes: a transcrição reversa e a amplificação propriamente dita. Seu principal diferencial é que na verdade esta reação não parte de um molde de DNA diretamente extraído da amostra; a amostra fornece o RNA, que é convertido em cDNA (DNA complementar). Ferramenta útil em estudos de expressão gênica, pois avaliando o mRNA, podemos detectar quais proteínas estão sendo efetivamente expressas. No entanto, o estudo direto do RNA (principalmente o mRNA) é inviável, devido à sua alta sensibilidade a vários fatores e a altas temperaturas. O primeiro passo da reação consiste na síntese de uma fita de DNA

utilizando como *template* uma fita de RNA numa reação catalisada por uma transcriptase reversa. Usualmente, são utilizadas duas enzimas desta classe, extraídas de vírus: a *AMV* (*Avian Myeloblastosis Virus*) e a *M-MuLV* (*Moloney Murine Leukemia Virus*). Além disso, também são utilizados *primers*, mas inespecíficos e nunca em pares. São oligonucleotídeos compostos por várias timinas consecutivas (6 a 35), que são anelados às regiões *Poly-A* (ou *A-Rich*) do RNA, ricas em adeninas. Após este ciclo, obtém-se o cDNA que será utilizado na PCR. É importante ressaltar que o *round* de transcrição reversa não altera o número de fitas de RNA ou DNA.

Multiplex PCR: Mais de um segmento genômico é amplificado numa única reação, cada um com seu par de *primers* específico. Esta vantagem pode simplificar alguns experimentos, como a investigação de paternidade, onde vários marcadores genômicos devem ser analisados. Também é útil para a introdução de um controle de reação (a ser discutido posteriormente).

Nested PCR: Para melhorar a especificidade e a eficiência da reação, o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo seqüências localizadas fora dela, e depois, utilizando este primeiro produto, a amplificação da real seqüência-alvo. Estas duas etapas (*rounds*) podem ser realizadas concomitantemente, ou em duas reações separadamente, caracterizando o *Semi-Nested PCR*.

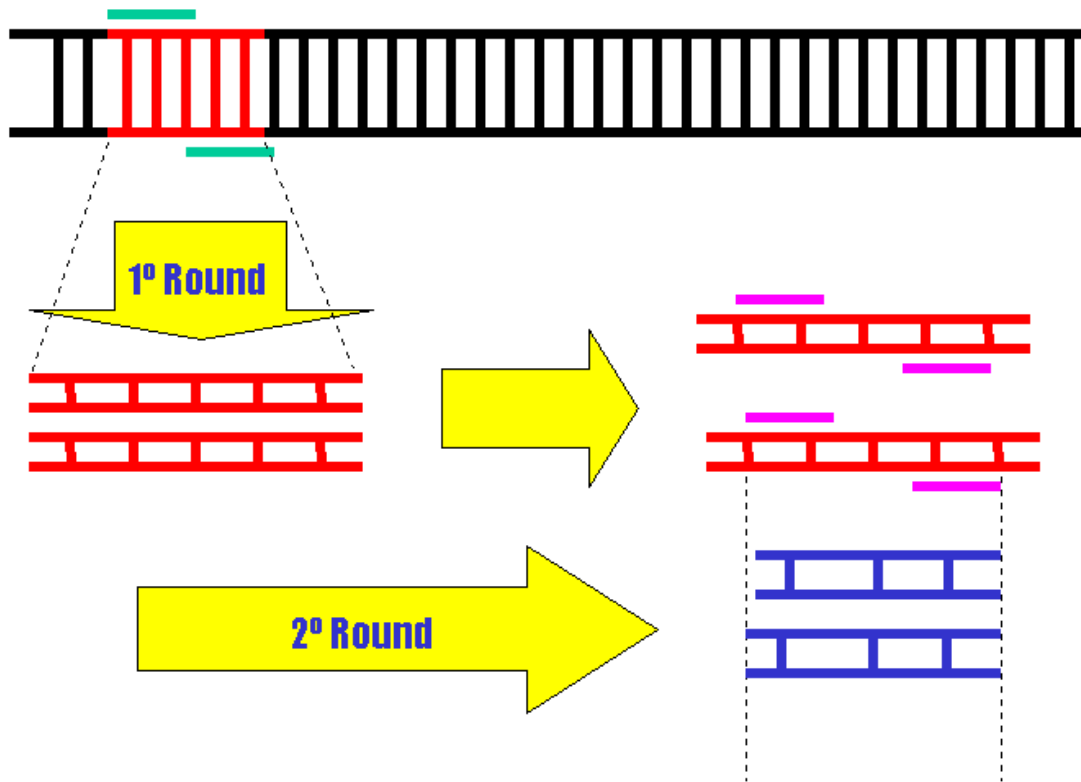


Fig. 5: Esquema de uma reação de *Nested PCR*. O produto da amplificação do 1º *Round* é utilizado com *template* no 2º *round*. No final das duas etapas, obtém-se um produto menor que o da primeira amplificação. Este tipo de reação tem como vantagem o ganho em especificidade e eficiência, uma vez que o DNA-molde do 2º *round* está em concentrações altíssimas, e os *primers* da segunda etapa têm menos chances de anelamento em seqüências inespecíficas, dada a redução do tamanho do molde.

PCR Competitiva: Além do DNA molde, é adicionado à reação um outro trecho de DNA, de seqüência, tamanho e concentração conhecidos (controle), cujas extremidades são complementares também aos *primers* que irão amplificar a seqüência-alvo. O resultado é a amplificação de dois trechos de DNA: a de interesse e a controle. Esta última, levando-se em conta a quantidade inicial e dados sobre a eficácia da reação serve de padrão para a quantificação do DNA-alvo. Em resumo, se conhecemos a quantidade final do fragmento controle e as condições da reação, podemos dizer o quanto de DNA-alvo foi amplificado. Esta técnica é utilizada principalmente em *kits* diagnósticos (Carga Viral de HIV).

Identificação dos produtos das reações

Eletroforese: Os ensaios de eletroforese se valem do princípio que determina que a carga global de uma fita de DNA é negativa. Portanto, uma solução que possua íons livres (eletrolítica) e que tenha moléculas de DNA em suspensão pode ser purificada aplicando-se uma dada voltagem. Ao final do processo as cadeias de DNA estarão próximas ao catodo (positivo), atraente de moléculas de carga negativa. No entanto, o foco da técnica é separar os fragmentos por tamanho, uma vez que a reação gera fragmentos de mesma extensão. A solução é “peneirar” o resultado da PCR por peneiras moleculares. As cadeias são “empurradas” através da peneira pela corrente elétrica, e de acordo com o tamanho dos furos dela, elas serão retidas ou liberadas. Na verdade, nos valem do fato de que cadeias maiores demoram mais tempo para passar pelos poros da “peneira”, e cadeias menores viajam mais rapidamente através dela. A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel. São os marcadores de tamanho molecular (*Ladders* = Escadas), que são misturas de trechos de DNA com tamanhos variáveis, normalmente equidistantes entre si. Por exemplo, um *Ladder* de 50bp quer dizer na prática que ele mostrará várias bandas, cada uma maior 50 pares de base do que a anterior (50bp, 100bp, 150bp, 200bp, 250bp...).

Existem dois modelos básicos de eletroforese: Baseada em géis de agarose ou em géis de poliacrilamida. As duas substâncias formam tramas de poros de tamanhos variáveis, possibilitando a separação dos fragmentos, que terá sua eficiência dependente da concentração do polímero e da intensidade da voltagem e amperagem aplicada. Em qualquer um dos casos, estas substâncias são dissolvidas numa solução-tampão eletrolítica, obrigatoriamente a mesma que recobrirá o gel na cuba de eletroforese e possibilitará a passagem de corrente elétrica (Tampão de Corrida). Para eletroforese de DNA, normalmente utiliza-se o TBE (Tris-Borato EDTA) e o TAE (Tris-Acetato EDTA) Quanto à aplicação das amostras no gel, é importante ressaltar que antes disso elas são misturadas a

uma outra (Tampão de amostra), que tem como função aumentar a viscosidade da amostra e assim impedir que esta comece a flutuar no tampão de corrida antes que a voltagem seja aplicada no sistema. Além disso, o tampão de amostra possui um corante, que possibilita a visualização do andamento da corrida. Usualmente, pode-se utilizar uma mistura de Azul de Bromofenol (Corante), Xileno-Cianol e Glicose (aumentam a viscosidade), dissolvidos no tampão de corrida apropriado para cada reação.

Apesar da sua versatilidade e relativo baixo nível de dificuldade de realização, a eletroforese convencional tem a desvantagem de identificar os fragmentos apenas quanto ao tamanho, e não quanto à seqüência.

Agarose: Polissacarídeo em forma de pó. Quando suspenso em solução aquosa e aquecido dissolve-se completamente, solidificando-se vagarosamente conforme a temperatura cai. Enquanto está em forma líquida, é colocado num molde que lhe dará o formato de um bloco quando resfriar. Enquanto isso são feitos pequenos furos (poços) em uma das suas extremidades, perpendicularmente ao seu comprimento com o uso de um “pente”; são os poços que receberão o produto da PCR.

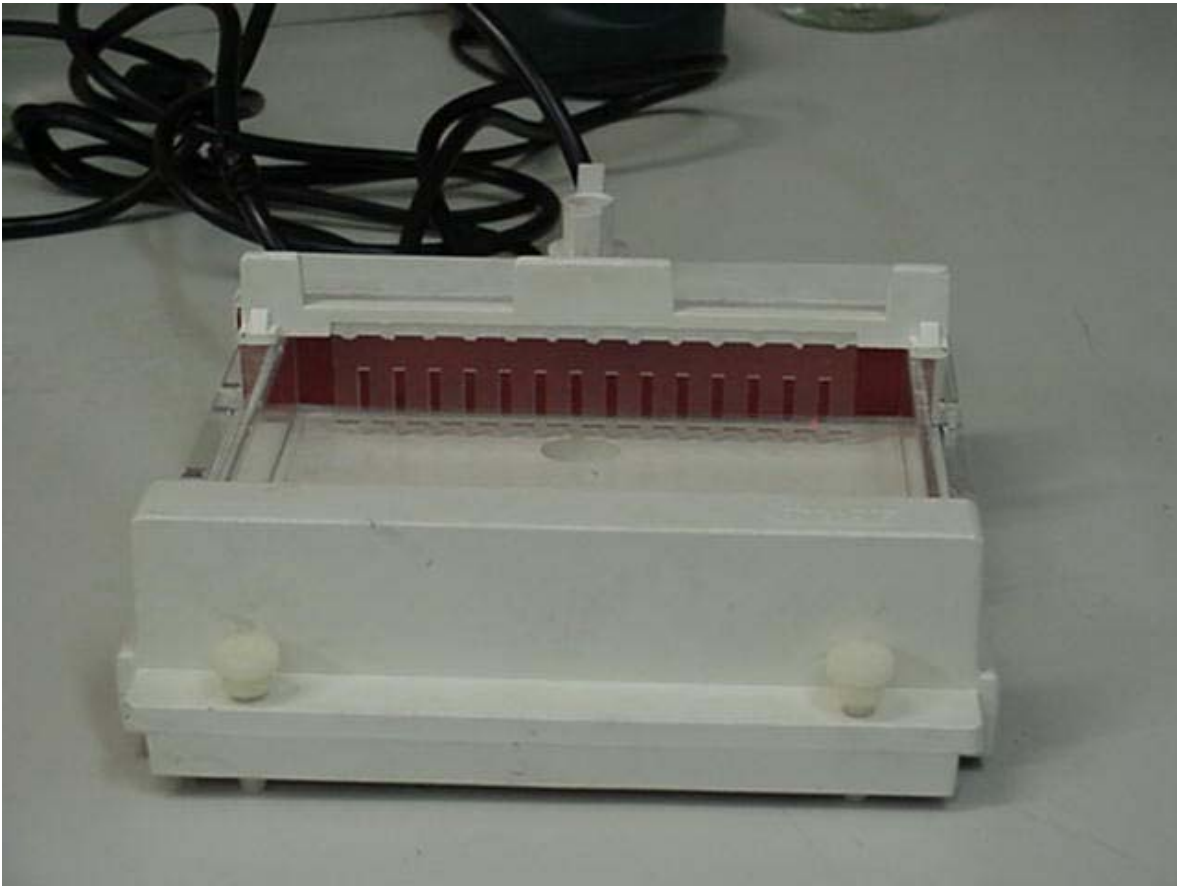


Fig. 6: Montagem de gel de agarose. A agarose fundida é despejada nesta cuba de montagem, onde é deixada até a polimerização. Na foto pode-se ver o pente, utilizado para a formação dos poços. Após o término da polimerização, o pente é retirado e em seu lugar ficam espaços cujo volume pode variar de 10 a 150 μ L, dependendo do volume de agarose e do sistema de montagem

Aplica-se uma voltagem entre as extremidades do gel que varia entre 10 e 200 V, e corrente de 50 a 3000mA. São utilizadas concentrações de 0,5 a 3% de agarose no gel. Quanto maior a concentração, maior a sua capacidade de distinguir fragmentos de tamanhos próximos, fator denominado DEFINIÇÃO. Por exemplo, um gel de agarose a 1% pode separar fragmentos com uma diferença de tamanho de 80 pares de bases, enquanto a 2,5% pode-se separar fragmentos com diferença de no mínimo 30 pares de bases.

A visualização dos produtos no gel após a corrida se dá pela reação de ligação do DNA com Brometo de Etídio. Este composto tem a capacidade de inserir-se nas fendas da cadeia de DNA e apresenta fluorescência quando excitado com radiação ultravioleta. Pode-se adicionar o EtBr (10 μ g/mL) no gel liquefeito antes da corrida ou levar o bloco a uma solução de EtBr com a mesma concentração e deixar descansar por alguns minutos.

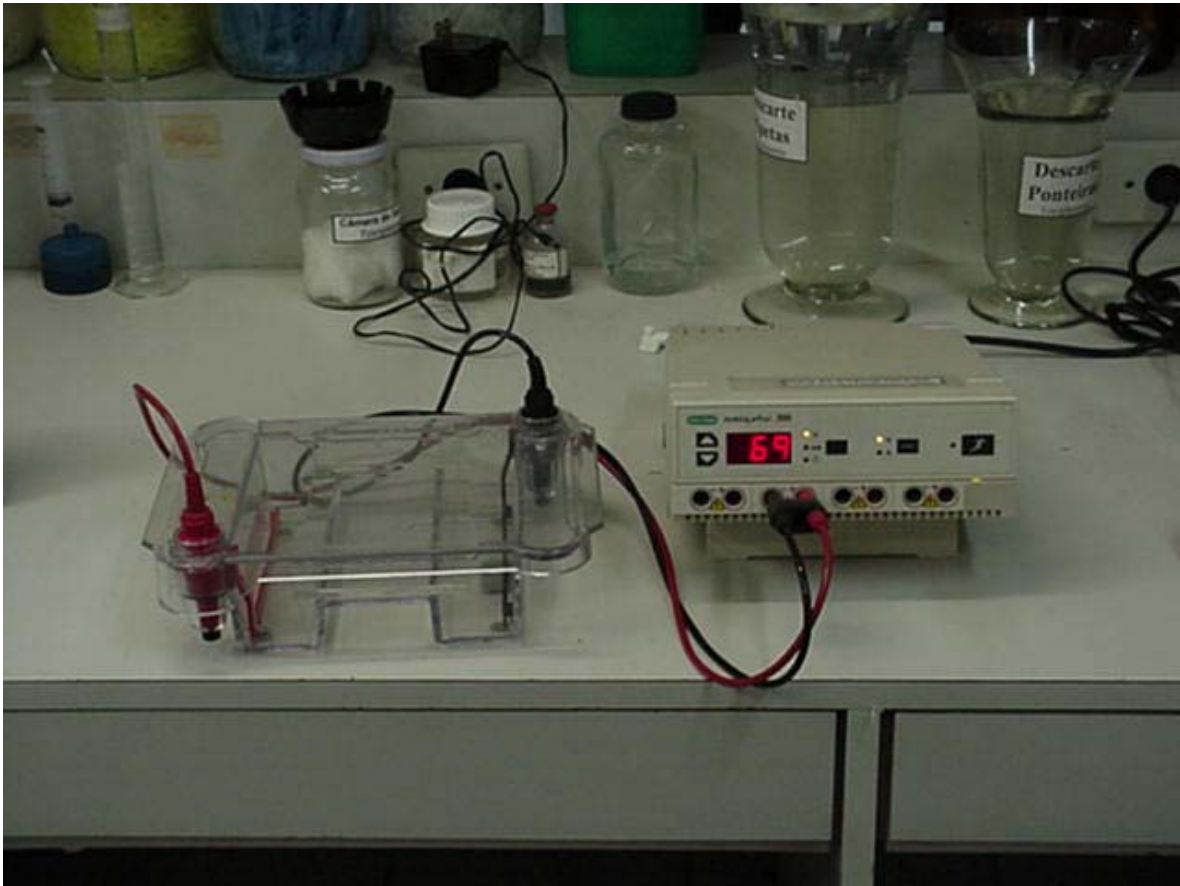


Fig. 7: Gel de agarose montado em cuba de eletroforese e sendo submetido à uma voltagem de 69V.

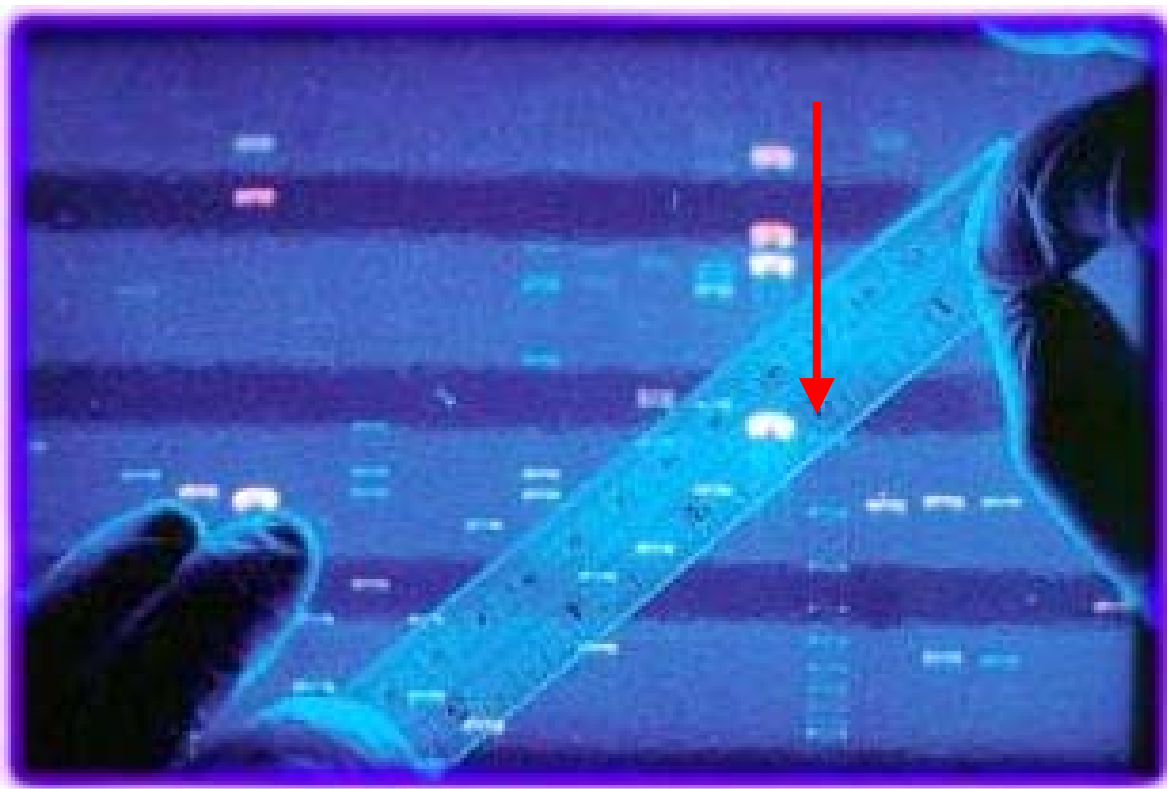


Fig. 8: Gel de agarose corado com Brometo de Etídio e visualizado num transluminador, aparelho que emite raios UV. As bandas podem ser identificadas como pequenas faixas fluorescentes. A seta mostra a corrida do padrão de peso molecular.

Poliacrilamida: Polimeriza-se a partir da reação da acrilamida (C_3H_5NO) com a Bis-Acrilamida (N,N'- Metileno-bis-acrilamida) em presença de persulfato de amônio e catalisada por TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamino). A mistura, dissolvida no tampão de corrida desejado, é posta rapidamente para polimerizar numa cuba de montagem semelhante à utilizada para agarose, mas orientada verticalmente. Também é posto um pente para a formação de poços.

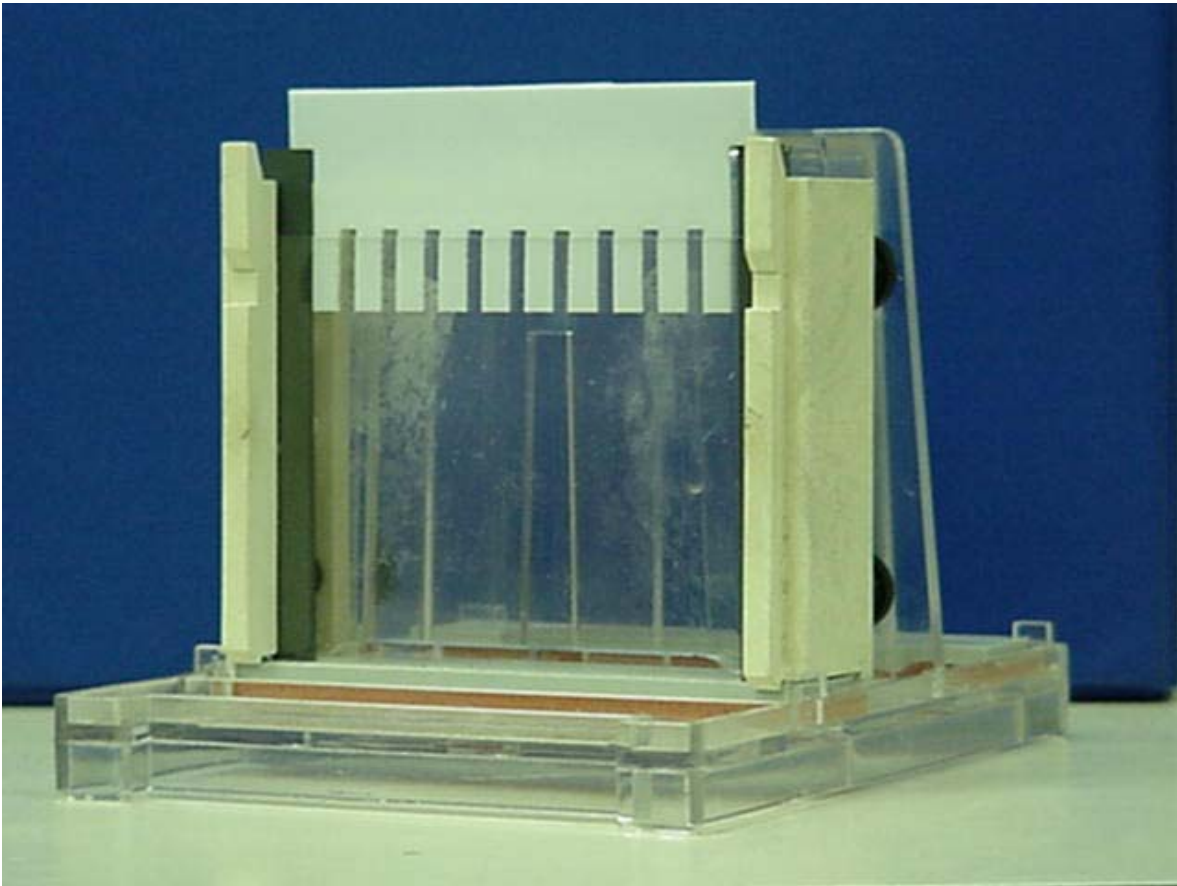


Fig. 9: Gel de poliacrilamida em polimerização. Pode-se visualizar o pente ainda inserido no sistema.

Após a polimerização, os procedimentos são os mesmos em relação a um gel de agarose: Cobertura pelo tampão de corrida na cuba de eletroforese, aplicação das amostras e do *ladder*, aplicação da corrente elétrica.

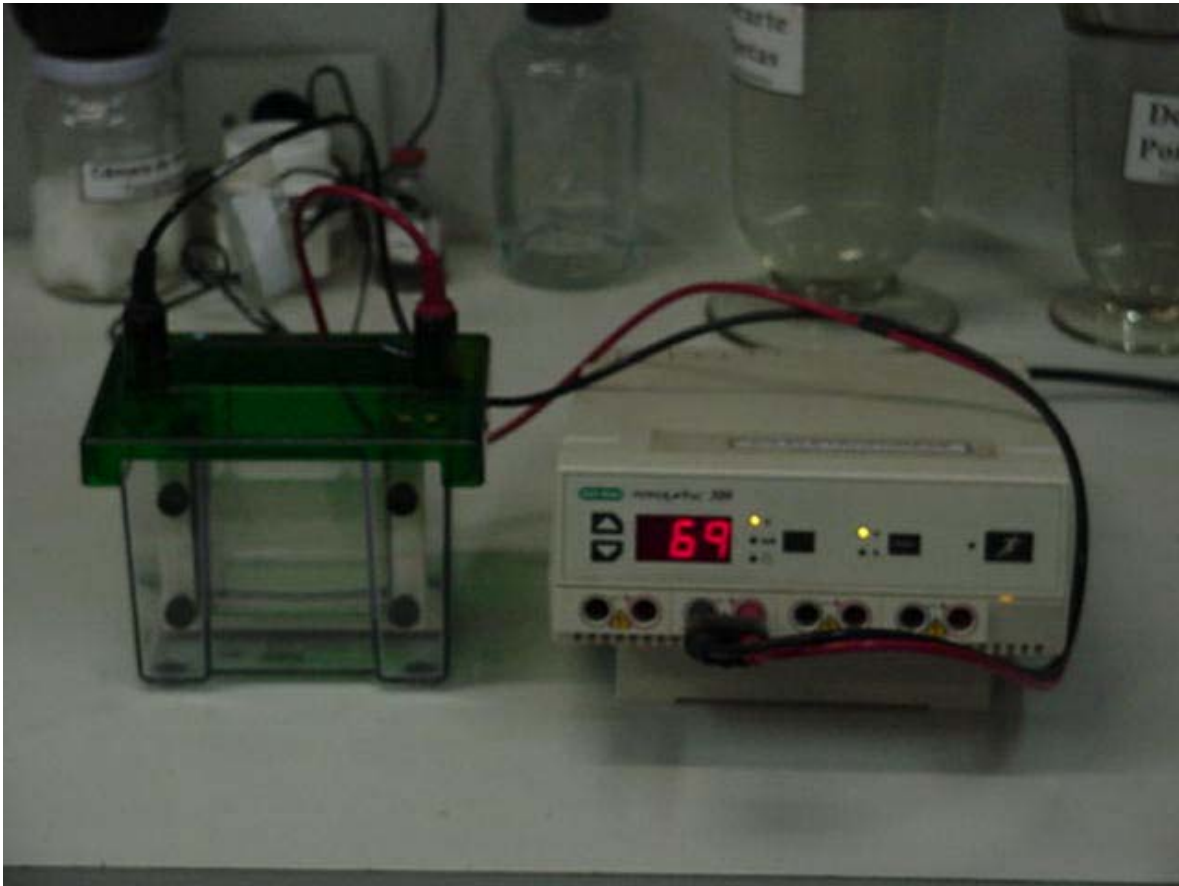


Fig. 9: Gel de poliacrilamida montado em cuba de eletroforese e sendo submetido à uma voltagem de 69V.

Normalmente, utiliza-se géis com concentrações de 4 a 25% de acrilamida. A poliacrilamida apresenta definição muito maior do que a agarose: um gel de 10% pode em certas condições separar fragmentos de DNA diferentes em tamanho por apenas um par de bases

A identificação dos produtos pode ser feita pela coloração com EtBr, porém o método mais utilizado é a impregnação do DNA contido no gel por nitrato de prata. Logo após a corrida o gel é fixado com uma solução de etanol e ácido acético, para impedir a eluição (forma borrões no gel) das amostras. Em seguida, é colocado por alguns minutos numa solução de nitrato de prata. Este composto escurece quando oxidado, o que é feito passando o gel para uma solução contendo hidróxido de sódio e formaldeído. A coloração por prata é de bem mais

fácil visualização do que a oferecida pelo EtBr, além de ser mais segura, levando-se em conta o fato de que este é altamente carcinogênico.

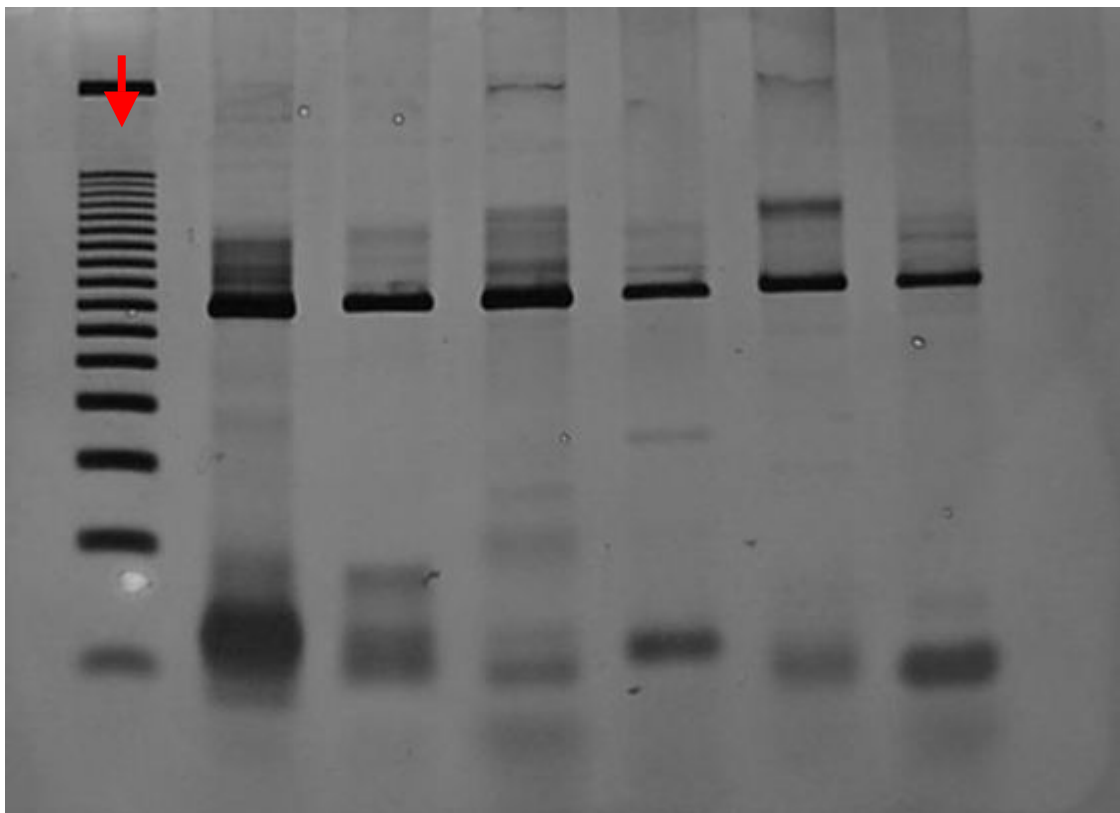


Fig. 8: Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Devido à alta sensibilidade do método de coloração, observa-se bandas inespecíficas e DNA não amplificado no pé da foto. A seta indica a corrida do *Ladder*.