

# **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**

**BSc. Daniel Perez Vieira**

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

## **Aula 2 - Características das Reações e Padronização**

O advento da PCR foi certamente um dos maiores passos das Ciências Biológicas durante o Século XX. Sem a PCR dificilmente se conseguiria o seqüenciamento de genomas, a expressão de genes em sistemas recombinantes, o estudo de genética molecular, a determinação rápida da paternidade de alguns indivíduos, o diagnóstico rápido de doenças virais, entre outros processos. Como comparação, o período compreendido entre a infecção de uma pessoa por HIV e a capacidade de um método imunológico detectá-la (janela imunológica) é estimado entre 4 meses a 1 ano. Utilizando a PCR, este período pode ser reduzido para um valor entre 40 e 70 dias.

Ainda pode-se levar em conta os avanços tecnológicos indiretos impulsionados pela PCR: com o grande volume de amostras genômicas, a indústria computacional foi forçada a desenvolver servidores com maiores capacidades de processamento e armazenamento de dados para lidar com a estrondosa quantidade de dados obtidos em grandes projetos de seqüenciamento; técnicas de DNA recombinante foram revolucionadas após sua conjugação com a PCR; organismos transgênicos são mais facilmente gerados e sua presença facilmente detectada em amostras por PCR... A lista é enorme.

Sobre o custo, uma reação de PCR completa (extração de DNA+PCR+Eletroforese) hoje pode custar muito menos que uma reação sorológica, devido ao alto preço de alguns anticorpos comerciais. Análises de

receptores de membranas celulares, antes restritas à citometria de fluxo (altíssimo custo) podem ser feitas rapidamente e com baixos gastos por RT-PCR.

Por causa de sua alta sensibilidade, fácil realização e atual baixíssimo custo por reação, a PCR é adotada como *Gold Standard* (Padrão de Ouro), ou seja, como prova irrevogável em algumas situações. Por exemplo: Em ginecologia, quando os exames citológicos e colposcópicos detectam lesões causadas por HPV, o material é levado à análise molecular, a fim de se determinar se o vírus desta paciente tem potencial oncogênico ou não.

Por outro lado, a comunidade científica e as grandes indústrias farmacêuticas exigem que as reações de PCR sejam altamente específicas, de total eficiência e total reprodutibilidade. Portanto, para um protocolo padronizado atingir o *status* descrito acima deve, no mínimo, atender a estas condições.

Para garantir estes níveis de confiança, o biólogo molecular deve padronizar seu protocolo a fim de se obter a melhor performance possível. Produtos inespecíficos, ausência de bandas, contaminações DNA/RNA e RNA/DNA, impureza das amostras, são situações que podem ser resolvidas de maneiras muito simples tendo-se o conhecimento dos reagentes, processos e aparelhos utilizados.

### **Composição das reações**

**DNA Polimerase, Buffers (Soluções-Tampão) e  $MgCl_2$ :** A DNA polimerase escolhida deve sempre operar sob as condições de reação instituídas e mantidas pelos tampões específicos, além de ser ativada pela presença de um íon metálico específico, e de obrigatoriamente ser termoestável. A mais utilizada ainda é a *Taq*, porém cada vez mais pura e com maior atividade. Algumas variedades (*Gold*, da Perkin-Elmer, *Platinum*, da Life-Technologies) são vendidas em concentrações levemente maiores que o usual (5 ou 10 U/ $\mu$ L), apresentando maior eficácia.

Existem enzimas *Taq* de origem recombinante, de custo bem menor, mas não recomendadas para uso em PCR (destinadas à clonagem de vetores gênicos sem o uso de organismos vivos), apesar de apresentarem bons resultados em algumas reações. Devido à sua popularidade, a *Taq* é a DNA polimerase mais utilizada em reações convencionais; porém, em alguns protocolos seu uso é contra-indicado.

Esta enzima é classificada com *Non-Proofreading*, o que quer dizer que pode haver alguns erros na seqüência do fragmento final. Enzimas desta classe percorrem a fita de DNA apenas uma vez, dando chance de que algum erro durante a duplicação não seja reparado. Além disso, ela ainda adiciona uma adenina extra às extremidades 3' do DNA, o que pode dificultar o uso posterior do amplificado (inserção em vetores).

Para casos com estes, existem as enzimas da classe *Proofreading*, que além de percorrerem a fita mãe no mínimo 2 vezes (a enzima pode percorrer a cadeia tanto no sentido 5'-3' quanto no 3'-5), e em geral não adicionam nucleotídeos extras nas bordas das cadeias-filhas. A lista destas enzimas é vasta e cresce espantosamente, mas podemos ressaltar a *Pfu* (de *Pyrococcus furiosus*) e a *Tli* (de *Thermococcus litoralis*). Todas as enzimas listadas têm temperatura ótima entre 72 e 74°C, e meia-vida a 95°C em torno de 300 minutos, o que as torna apropriadas para PCR. Como são diretamente responsáveis pela atividade da enzima, os tampões e o MgCl<sub>2</sub> são considerados fatores críticos. Altas atividades levam a bandas inespecíficas ou inativação por baixa quantidade relativa de substrato; baixas atividades levam à ausência de produto, as duas situações regidas principalmente por essas duas soluções.

**Primers:** Antes das etapas experimentais, deve-se planejar cuidadosamente a seqüência e algumas características dos *primers*. Anteriormente concebidos por métodos manuais, hoje existem programas que “desenham” oligonucleotídeos e prevêem seu comportamento nas reações.

Além da complementaridade, um ponto importantíssimo da natureza deste reagente é o seu **Ponto de Fusão Médio**, denominado  $T_m$  (*Temperature of Melting*), que é a temperatura na qual metade dos iniciadores está anelada às fitas de DNA e a outra livre na solução.

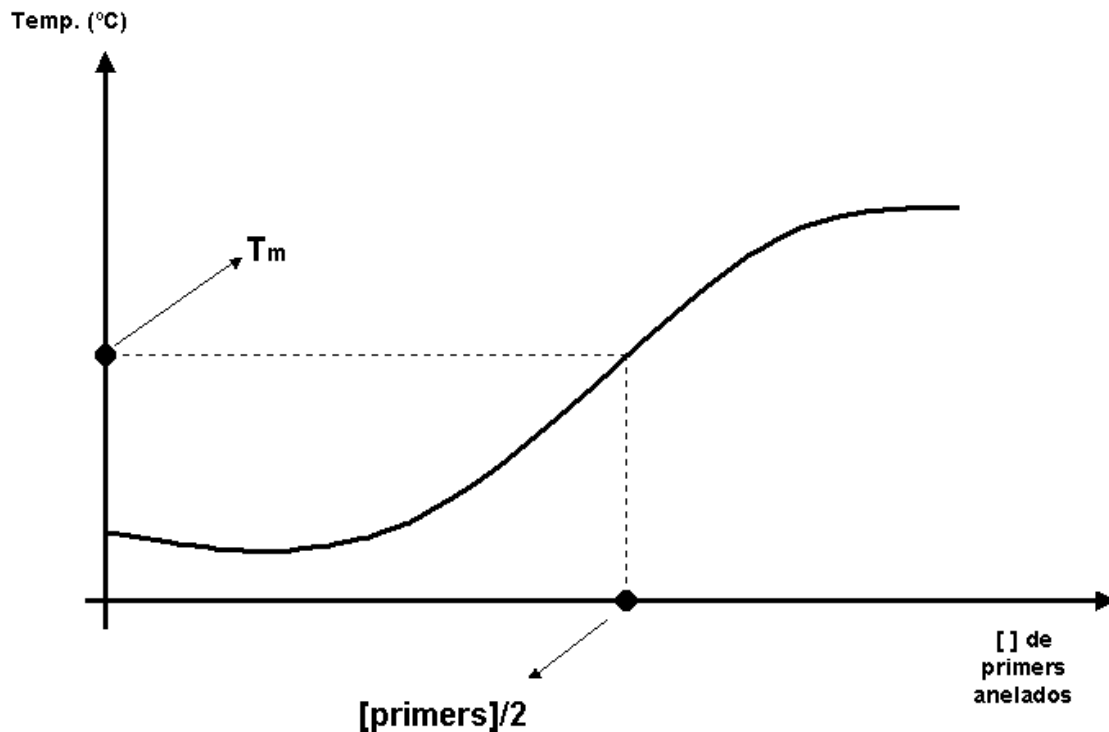


Fig. 1: Gráfico de determinação de  $T_m$ . Na temperatura indicada pela seta no eixo  $x$ , metade dos *primers* está anelada às cadeias de DNA-molde.

Para cada par de *primers* que é utilizado, um  $T_m$  diferente é determinado. Se utilizássemos uma temperatura em que todos os *primers* estivessem anelados, teríamos grande taxa de formação de *primer-dimers*, que nada mais são *primers* anelados entre si. A temperatura média garante que, enquanto metade deles está

nas cadeias-mãe, a outra metade está inteiramente disponível para o próximo ciclo. Os dois componentes do par (*Sense* e *Antisense Primers*) devem possuir  $T_m$  igual ou muito próximo para evitar alguns problemas na reação. A partir do valor de  $T_m$  podemos determinar o  $T_a$ , que é a temperatura ótima de reação do par de *primers*. Estas temperaturas são afetadas diretamente pela concentração do íon  $Na^+$  na solução (pode precipitar os *primers* para o fundo do tubo, prejudicando a cinética da reação; porém é necessário na manutenção do pH e dH da reação) e na presença de agentes adstringentes, que inibem o anelamento (formamida; DMSO=Dimetilsulfóxido; Glicerol sob certas condições).

A seqüência de bases dos *primers* deve ser conferida quanto à chance de formação de *Primer-Dimers* (anelamentos *Sense/Antisense*), *Self-Dimers* (anelamentos *Sense/Sense* ou *Antisense/Antisense*) e *Hairpins* (dobramentos da cadeia de um *primer*, fazendo com que ela se pareie consigo mesma).

**DNA Molde:** Sua concentração deve ser adequada às condições da reação. Produtos inespecíficos podem indicar excesso de *template* nas reações. O ideal é utilizar 5  $\mu$ L de uma solução de 5 $\mu$ g/mL de DNA dissolvido em água ou em algum tampão apropriado ( $TE$  = Tris-EDTA; HEPES; NaOH 0,8M em água, etc.). Estes tampões devem ser escolhidos com cuidado: EDTA pode inibir drasticamente a atividade das DNA polimerases se estiver em excesso (accepta íons metálicos), por exemplo. Portanto, o DNA preferencialmente deve ser diluído em água deionizada estéril, a menos que se pretenda estocá-lo por longos períodos de tempo; neste caso, tampões levemente alcalinos (pH 7,8 a 8,0) são indicados.

Contaminações com RNA ou DNA de outra amostra devem ser levadas em conta e evitadas ao máximo. Usualmente utiliza-se RNAses para a purificação do DNA, e DNAses para a purificação de RNA. Além disso, a adição de algumas etapas extra após a extração no sentido de purificar e dessalinizar a amostra de ácido nucléico é considerada medida de bom senso.

Apesar de ser relativamente termoestável, o DNA deve ser estocado a  $-20^{\circ}C$ , onde pode permanecer sem alteração perceptível por até 2 anos em tampão apropriado. Recomenda-se o armazenamento do DNA a  $-80^{\circ}C$  e nunca em nitrogênio líquido (temperaturas baixas demais fazem o DNA adsorver moléculas

de N<sub>2</sub> na sua superfície, impossibilitando o seu uso). Para RNA o armazenamento é obrigatório a -80°C.

As reações contém ainda dNTP's e água.

### **Extração de Ácidos Nucléicos.**

Anteriormente, a extração de DNA se resumia ao cozimento do material biológico por alguns minutos em banho-maria, adição de NaCl em altas concentrações (3 a 6M) e etanol, com alguns passos de centrifugamento. Apesar de render quantidades razoáveis de DNA, o *pellet* resultante ainda continha muitos restos celulares (membranas, lipídeos, etc.), o que poderia comprometer o resultado da PCR. Todos os principais protocolos atuais de extração de ácidos nucleicos seguem o mesmo esquema, otimizado: 1) Coleta, separação e lise do material vivo; 2) Separação da solução em fases e 3) Precipitação e lavagem do produto. Todos os reagentes devem estar preferencialmente gelados, e a centrífuga usada a 4°C.

**Coleta, separação e lise do material biológico:** A integridade do material extraído depende principalmente deste início de processo. Para remover fases dispensáveis, costuma-se usualmente centrifugar imediatamente após a coleta o material. Assim, uma amostra de células sanguíneas não terá traços significativos de plasma; uma suspensão fecal estará livre de partículas sólidas; uma amostra de urina ou de líquido se tornará livre de células. Cuidados especiais devem ser tomados com amostras com alta celularidade (sangue), grande quantidade de inibidores enzimáticos (urina), lipídeos (tecido nervoso) e proteínas (tecido hepático). Quanto ao sangue, durante a coleta não se pode usar heparina como anticoagulante, pois esta substância é forte inibidor das DNA polimerases, especialmente a *Taq*. A urina deve ser centrifugada e sofrer o mínimo de contato possível com a atmosfera para inibir a oxidação de certos componentes.

A lise consiste no tratamento das membranas celulares com detergentes (aniônicos, catiônicos ou zwitteriônicos). Normalmente utiliza-se o N-Lauroil-Sarcosino ou o SDS (*Sodium Dodecyl-Sulphate*). Assim, todo o conteúdo citoplasmático torna-se livre na solução. Para bactérias, que possuem parede celular, não se utiliza lise: soluções de altas concentrações de glicose alteram a osmolaridade extracelular e forçam a expulsão do citoplasma para o meio. Tecidos vegetais são tratados inicialmente com nitrogênio líquido, que petrifica a membrana celulósica ou formações como esclerênquima. Nesse estado, o material é triturado por esmagamento, e depois a lise é realizada.

Após a lise pode ocorrer a adição de sais caotrópicos em altas concentrações (4 a 8M), que inibem a formação de duplas-fitas e impedem que o DNA (ou RNA) fique preso em restos celulares. O Tiocianato de Guanidina ou a Guanidina-HCl são os compostos mais eficientes para este propósito. No caso de partículas virais, a etapa de lise não ocorre: os compostos de guanidina são suficientemente eficazes na quebra dos capsídeos.

Compostos caotrópicos são, portanto, altamente denaturantes e permitem o fracionamento total do material.

**Separação da Solução em fases:** Após fragmentar o material completamente, deve-se criar uma solução heterogênea, de modo que o ácido nucléico de interesse seja solúvel em apenas uma das fases. Utiliza-se então uma solução de fenol, dissolvido em TE e pH em torno de 8,0 para extrair DNA e 7,2 para RNA (o DNA é mais solúvel em meio alcalino; o RNA nem tanto). O fenol, solvente orgânico, não se mistura à água. Porém o DNA e o RNA são altamente solúveis em fenol, assim como os lipídeos. Para separar os lipídeos, adiciona-se clorofórmio à mistura. Em tecidos ricos em lipídeos adiciona-se aproximadamente 40% a mais de clorofórmio. A seleção entre DNA e RNA é feita pelo pH da solução, como dito acima. Adiciona-se sais, normalmente Acetato de Sódio e/ou de Potássio, para a precipitação do material. Após centrifugamento, obtém-se pelo menos duas fases: uma aquosa e uma fenólica. A fase fenólica contém o DNA; a aquosa, após centrifugamento, o RNA. Então separa-se a fração de interesse.

**Precipitação e lavagem do produto:** Adiciona-se isopropanol à fase recuperada na etapa anterior. Para a recuperação de RNA, recomenda-se incubação *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$  para otimizar a precipitação. Para DNA, centrifugamento a  $13000\times g$  por alguns minutos. Descarta-se o isopropanol e adiciona-se etanol, preferencialmente 70% e gelado, com a função de precipitar totalmente as cadeias de ácido nucléico em centrífuga. Etanol absoluto pode desidratar demais a amostra, dificultando a dissolução do produto final, além de não permitir a dessalinização completa da amostra (os acetatos são mais solúveis em água do que em etanol). Após centrifugamento, surge no fundo do tubo um *pellet*, variando do transparente ao branco. *Pellets* amarelados indicam impurezas, o que requer a repetição deste passo final. É o caso do tecido hepático, rico em proteínas e de difícil purificação.

A purificação adequada das amostras é de grande importância: traços de fenol, proteínas e sais são reconhecidamente complexantes das reações de PCR.

Após secagem, o material é ressuspenso como descrito acima e quantificado.

Utiliza-se a espectrofotometria por UV de 260nm como padrão.

### **Relações absorbância/concentração**

**dsDNA: 1 A<sub>260</sub> - 50mg/mL (0,15mM)**

**ssDNA : 1 A<sub>260</sub> - 33mg/mL (0,1mM)**

**ssRNA : 1 A<sub>260</sub> - 40mg/mL (0,12mM)**

A absorbância a 280nm também é medida. Sua relação com A<sub>260</sub> é usada para determinar o grau de pureza da amostra. Para DNA, a relação A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> deve estar entre 1,7 e 1,9; para RNA entre 1,8 e 2,0.



## PCR

Na verdade, cada reação possui suas próprias características quanto à concentração de reagentes e condições de temperatura. No entanto, durante a padronização podemos adotar um ponto de partida, ou *standard protocol*. Partindo destes parâmetros, ajusta-se as condições de reação para a otimização dos resultados.

**Concentração de Enzima:** Recomenda-se concentrações de 0,4 a 1U para cada 25 $\mu$ L de solução final. Outras concentrações podem ser utilizadas em casos especiais (*LD-PCR = Long Distance PCR = PCR* que amplifica grandes fragmentos de DNA, como vetores inteiros). No entanto, deve-se observar as especificações de cada fabricante e de cada produto (a enzima é adequada para PCR ?; qual a concentração (em U/ $\mu$ L)?; existe alguma condição especial para operação?). Algumas opções podem ser consideradas, como *Hot-Start*, *Taq Beads*, óleo mineral, anticorpos anti-*Taq*, etc. Assume-se que a *Taq* convencional permaneça ativa mesmo depois de 40 ciclos na reação. Para reações mais longas, recomenda-se o uso de outra enzima ou uma concentração levemente maior.

**dNTP's:** Utiliza-se uma solução estoque de 10mM em água e pH 7,0 de todos os dNTP's utilizados (ATP, TTP, CTP e GTP) em concentrações iguais (salvo em alguns casos). Adiciona-se à reação uma quantidade suficiente para se obter uma concentração final entre 20 e 200 $\mu$ M, dependendo também do tamanho do segmento que se quer amplificar e da duração da reação. Normalmente a concentração final de deoxinucleotídeos na reação é ajustada para 25 $\mu$ M. Altas concentrações de dNTP's podem afetar a especificidade dos *primers*, pareando-se a eles.

**MgCl<sub>2</sub>:** Obrigatório para o funcionamento da enzima, o MgCl<sub>2</sub> é encontrado na solução de reação em concentrações em torno de 0,5 a 2,5 mM. Como todo íon, pode afetar as temperaturas de denaturação das fitas de DNA e de anelamento de *primers*. Além disso, altas concentrações são responsáveis pelo aparecimento de produtos inespecíficos, formados por aumento excessivo da atividade da polimerase e pela formação de *primer-dimers*.

É importante que a presença de quelantes de íons, como o EDTA, podem alterar a concentração do magnésio livre na reação.

**Outros Componentes:** Os tampões de reação, fornecidos juntamente com as polimerases, possuem uma grande diversidade de componentes, cujo efeito não pode ser desprezado. Normalmente, os tampões possuem um pH a 20°C entre 8,3 e 8,8. Possuem *Tris* (Tris(hidroximetil)aminometano), importante para o tamponamento, NaCl, KCl, e outros reagentes descritos anteriormente. Deve-se observar as concentrações de íons: até 50mM de NaCl e/ou KCl pode facilitar o anelamento dos *primers* (sabe-se que concentrações de KCl maiores que isso inibem a atividade das polimerases).

Quando se trabalha com seqüências ricas em G e C, torna-se mais difícil a denaturação das fitas, devido à presença de ligações de alta energia. O simples aumento de temperatura para mais de 95°C não é recomendável (denaturação dos dNTP's, redução da atividade enzimática, alteração excessiva do pH da solução). Portanto, podemos utilizar um agente denaturante, como o DMSO (Dimetilsulfóxido), que ajuda na denaturação das fitas. Utiliza-se uma concentração final de 0,1 a 10% deste reagente na solução. Concentrações acima de 10% inibem drasticamente a atividade da enzima (DMSO é um solvente orgânico que em altas concentrações destrói as ligações da molécula da enzima).

### **Duração dos ciclos de temperatura:**

Descrição da programação do termociclador passo a passo

- I) *Denaturação inicial:* 4 minutos a 95°C é suficiente para a grande maioria dos casos.
- II) *Denaturação:* 1 minuto a 95°C
- III) *Anelamento:* 1 minuto operando na temperatura de anelamento específica do *primer*, podendo ser aumentada até 90 segundos.
- IV) *Extensão:* Temperatura ótima da enzima. Para a *Taq*, utiliza-se 1 minuto a 72°C, podendo ser aumentada até 2 minutos de acordo com a quantidade utilizada, o número de ciclos e o tamanho do produto desejado.
- V) *Extensão Final:* Após o término dos ciclos, costuma-se acrescentar um passo de 4 minutos a 72°C, como oportunidade adicional para a polimerase agir
- VI) *Final:* Programa-se o termociclador para um *hold*, de 0 a 4°C, para manter as amostras conservadas até o momento de estocagem

Informações sobre desenho de *primers* e a padronização das temperaturas de anelamento serão discutidas posteriormente.