

5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Adelita Carolina Santiago

Gisele Batista Veneroni

Luciana Correia de Almeida Regitano

A reação em cadeia da polimerase nada mais é do que a replicação *in vitro* do DNA. Foi desenvolvida na década de 1980 por Karry Mullis, que conseguiu pela primeira vez amplificar pequenos fragmentos de DNA. Em 1988, foi descoberta uma enzima DNA polimerase termoestável, isolada de *Thermus aquaticus*, permitindo que este processo ganhasse automação (Saiki, 1988).

O impacto deste método foi enorme, pois possibilitou facilidade, rapidez, versatilidade na manipulação de ácidos nucleicos, o que tornou a técnica poderosa e imprescindível em grande parte dos procedimentos realizados atualmente. É utilizada, por exemplo, na realização de seqüenciamento, como diagnóstico de doenças, detecção de mutações pontuais, entre outros.

Esta técnica envolve três etapas: desnaturação do DNA pelo calor entre 94-95°C, anelamento de *primers* à seqüência alvo em fita simples, atuando de 3 a 5°C abaixo da temperatura de *melting* (35 a 60°C) e uma etapa de extensão do *primers* anelados por uma DNA polimerase termoestável (72 a 78°C)

Alguns componentes são essenciais para que ocorra a PCR:

1. presença de uma DNA polimerase termoestável, como por exemplo, *Taq* (*Thermus aquaticus*) a ou *Tfl* (*T. flavus*);
2. presença de um par de *primers*, oligonucleotídeos que funcionam como ponto de início da polimerização;
3. cátions divalentes, como MgCl₂;

4. deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), com quantidades iguais de dATP, dCTP, dTTP e dGTP;
5. DNA molde, podendo ser fita simples ou fita dupla;
6. Tampão para manutenção do pH, geralmente entre 8,3 e 9 à temperatura ambiente.

5.1. PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DO MICROSSATÉLITE BMS1617

1. Retirar o DNA do freezer e deixar à temperatura ambiente
2. Lavar as mãos e colocar luvas
3. Limpar a bancada com álcool 70%
4. Marcar os tubos ou identificar a placa. Deve-se criar um registro das amostras que serão amplificadas no caderno de laboratório
5. Preparar o Mix de PCR.

Mix de PCR

Reagente	[] do estoque	[] de uso	Vol. (1 amostra)	Vol. (___ amostras)
H ₂ O	-	-	8,235 µL	
Tampão*	10X	1X	1,25 µL	
MgCl ₂ *	20mM	1,5mM	0,94µL	
dNTP	20mM	0,2mM	0,125µL	
Primer F	5µM	0,1µM	0,25µL	
Primer R	5µM	0,1µM	0,25µL	
Taq	5U/µL	1U	0,2µL	
TOTAL			11,25 µL	

* Sempre verifique se o tampão contém ou não MgCl₂. Caso já contenha, não há necessidade de acrescentar. Acrescente o volume correspondente ao MgCl₂ no volume de água.

5.2. PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA TIREOGLOBULINA

1. Retirar o DNA do freezer
2. Lavar as mãos e colocar luvas novas
3. Limpar a bancada
4. Tirar o DNA, o gelinho e reagentes (menos a Taq) do freezer
5. Marcar os tubos ou identificar a placa
6. Preparar o Emix

	1 X	_____ X
H₂O Milli Q	15,54 µL	_____ µL
10x PCR Buffer	2,5 µL	_____ µL
MgCl₂ (20mM)	2,44 µL	_____ µL
dNTP (20mM)	0,25 µL	_____ µL
Pr up (5 µM)	0,82 µL	_____ µL
Pr down (5 µM)	0,82 µL	_____ µL
Taq (5u / µl)	0,13 µL	_____ µL

6. Distribuir 22,5µL do Emix / tubo ou poço (se for placa de PCR), sempre sobre um gelinho
7. Distribuir 2,5µL DNA / tubo ou poço (se for placa de PCR)
8. Colocar as amostras em um termociclador, escolher o programa correto para amplificação: Programa RFLP55.

Programa : RFLP55

