

# Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações

**BSc. Daniel Perez Vieira**  
(*Protozoologia-IMTSP/ Laboratório de Biologia Molecular-IPEN*)

## **Aula 3 - Análise dos produtos: Qualitativa e Semi-Quantitativa**

A análise dos resultados das reações de PCR é feita normalmente utilizando protocolos diversos de eletroforese, como já dito anteriormente. O registro dos padrões de bandas obtidos, de forma fotográfica ou digital, é o que nos fornece os resultados brutos que serão analisados a partir do enfoque a ser usado.

A grosso modo, existem dois tipos de PCR: a Qualitativa e a Quantitativa.

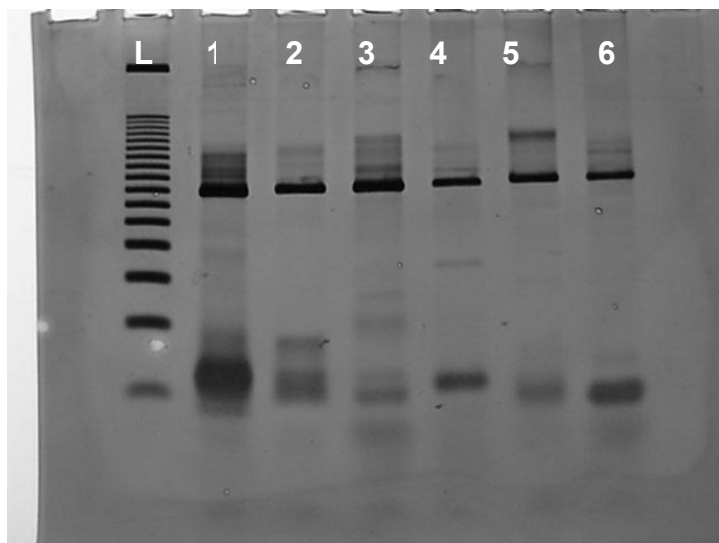
### **PCR Qualitativa**

O enfoque qualitativo fornece como resultado final um conceito novo sobre a amostra utilizada, baseado na presença ou não do produto amplificado no gel. Portanto, existem apenas dois resultados, o positivo e o negativo. Devido à sua alta especificidade e sensibilidade, as reações de PCR estruturadas não admitem resultados inconclusivos.

No entanto, para poder afirmar que um resultado é negativo ou não, deve-se ter a certeza de que a ausência de bandas é devido à ausência de DNA molde, e não à falhas na reação. Para tanto, deve-se considerar utilizar um CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO nas reações. As bandas-controle nas reações de PCR são geradas a partir da amplificação de uma seqüência que obrigatoriamente existe no material analisado, e preferencialmente em uma única cópia. Vários genes são utilizados para amostras de roedores e de humanos sendo os genes da  $\beta$ -globina,

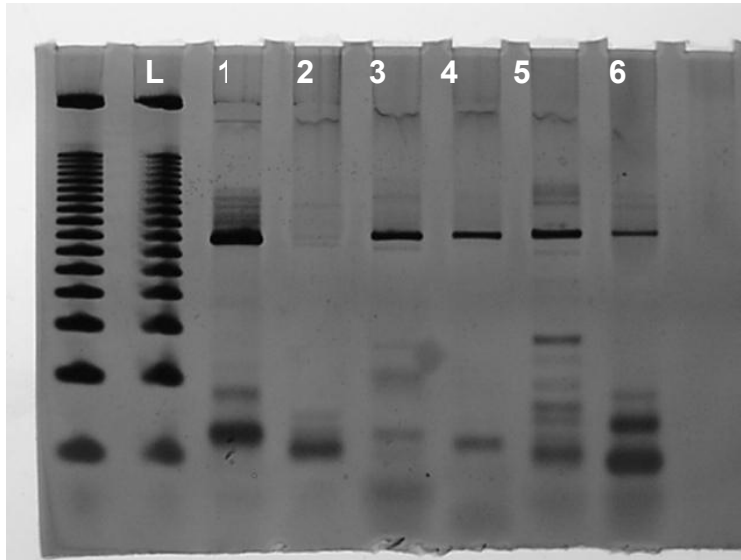
$\beta$ -actina, e da GAPDH os mais usados. O resultado será dado em função do aparecimento da banda controle: se esta é observável no gel, o resultado (seja ele negativo ou positivo) pode ser dado como conclusivo.

**Exemplo 1:**



A foto acima representa as bandas geradas pela amplificação de 5 diferentes receptores de membrana de macrófagos de camundongo (*Lanes 2 a 6*) A *lane L* indica o padrão de peso molecular e a 1 indica o a banda controle, resultado da amplificação do gene da  $\beta$ -actina. Como a banda controle está nítida, o resultados das reações para a detecção dos receptores foram considerados positivos, pois além das bandas estarem presentes no gel, o controle mostra-se positivo também, confirmando os resultados.

### Exemplo 2:



Este gel mostra produtos da amplificação dos mesmos receptores da figura acima. O controle também está presente, o que indica a fidelidade da reação. Neste caso, a amostra 2 foi considerada negativa para a PCR.

### PCR Quantitativa

Em alguns casos, a análise qualitativa já foi realizada, ou não necessita de realização. Nestas situações, é mais importante determinar o QUANTO de DNA foi amplificado em comparação a um padrão. Este padrão pode ser novamente um simples controle de amplificação (*Semi-Quantitative PCR*, a ser visto em melhores detalhes posteriormente), ou uma seqüência de DNA exógeno introduzido na reação em quantidades conhecidas e cuja seqüência também é amplificada pelos *primers* da seqüência-alvo, com a diferença de produzir um tamanho de bandas diferente (*Competitive PCR*)

Recentemente introduziu-se o conceito de *Real-Time PCR*, que é uma PCR que utiliza *primers* e dNTP's marcados por compostos fluorescentes. O diferencial desta reação, no entanto, é a utilização de termocicladores especiais que além de realizar os ciclos de temperatura, possuem leitores de fluorescência que fornecem

dados sobre a quantidade de DNA formada durante a reação. Cada nucleotídeo fluoresce um determinado comprimento de onda, que é captado pelo leitor do termociclador e os dados são analisados por um computador. Os resultados são gráficos como os da figura abaixo.

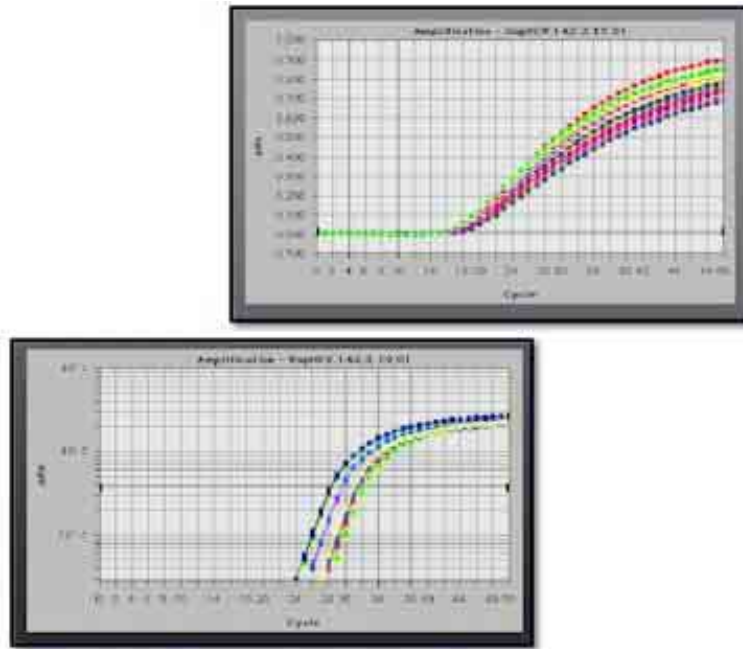


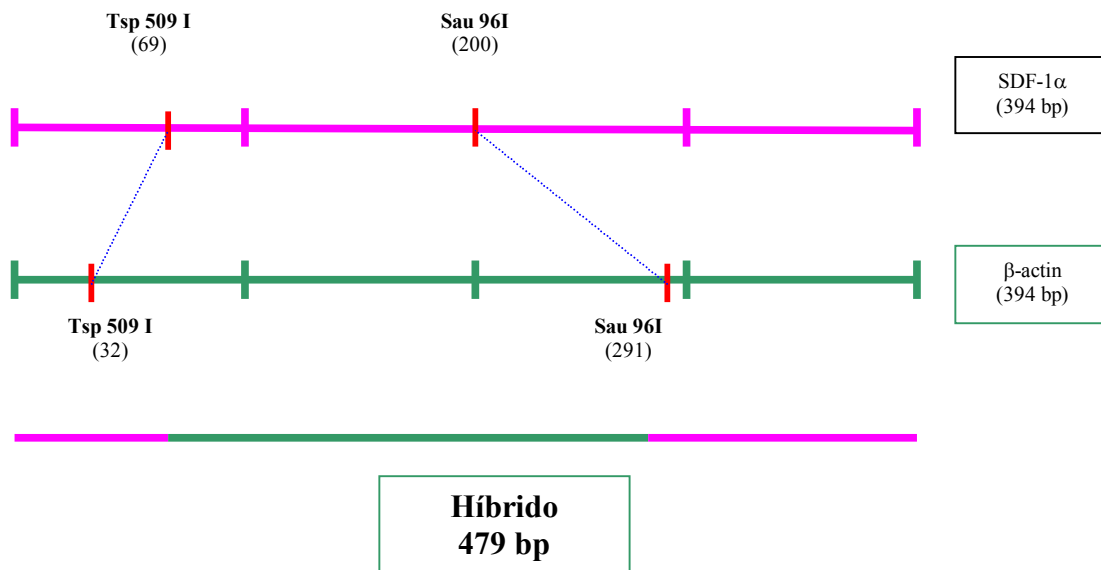
Fig. 1: Gráfico de quantificação de produtos de PCR em termociclador do tipo *Real Time*. O gráfico mostra quantidades absolutas de DNA em função do tempo, durante a PCR.

A quantificação precisa do produto final de PCR costuma ser algo um tanto complicado. Inicialmente, tentou-se extrair o DNA presente nas bandas e determinar a sua concentração, porém os procedimentos de extração utilizados se mostraram pouco confiáveis para isso (muita perda de material).

### **Competitive PCR:**

Na PCR competitiva, uma seqüência exógena ao material compete por ligações com a enzima e anelamentos com os *primers* com a seqüência-alvo. Normalmente, este fragmento é construído, inserindo-se as mesmas regiões de anelamento do *primer* na seqüência-alvo nos flancos de uma outra seqüência qualquer, com o cuidado de o produto final deste DNA construído seja distinguível

do produto-alvo pelo tamanho em pares de base da banda obtida. Em esquema da construção de um fragmento como este pode ser visualizado abaixo:



Neste caso, usou-se enzima de restrição para cortar dois fragmentos de DNA: o do gene SDF-1 $\alpha$  (alvo) e o do gene da  $\beta$ -actina. Após a digestão com a enzima, os fragmentos das bordas de SDF-1 $\alpha$  podem ser unidos com o interior do fragmento da  $\beta$ -actina, formando um híbrido de tamanho maior (cerca de 80pb), porém amplificável pelos *primers* específicos de SDF-1 $\alpha$ .

Este híbrido é adicionado na reação em quantidades pré-determinadas, e após a amplificação as bandas no gel são quantificadas quanto à sua densidade óptica em programas de densitometria de imagem. Este método é utilizado em alguns *kits* de detecção de certas doença virais, usados rotineiramente em laboratórios clínicos e bancos de sangue.

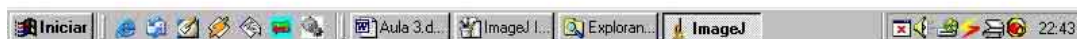
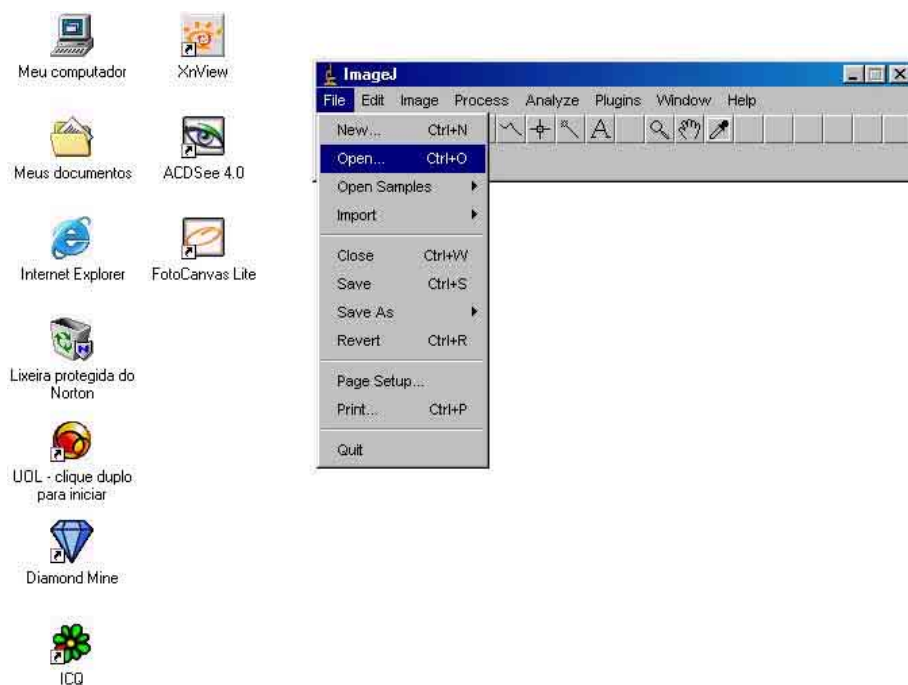
### **Semi-Quantitative PCR:**

Funciona da mesma forma que a competitiva, com a diferença que a seqüência controle não é adicionada, e sim um produto da amplificação de uma seqüência controle.

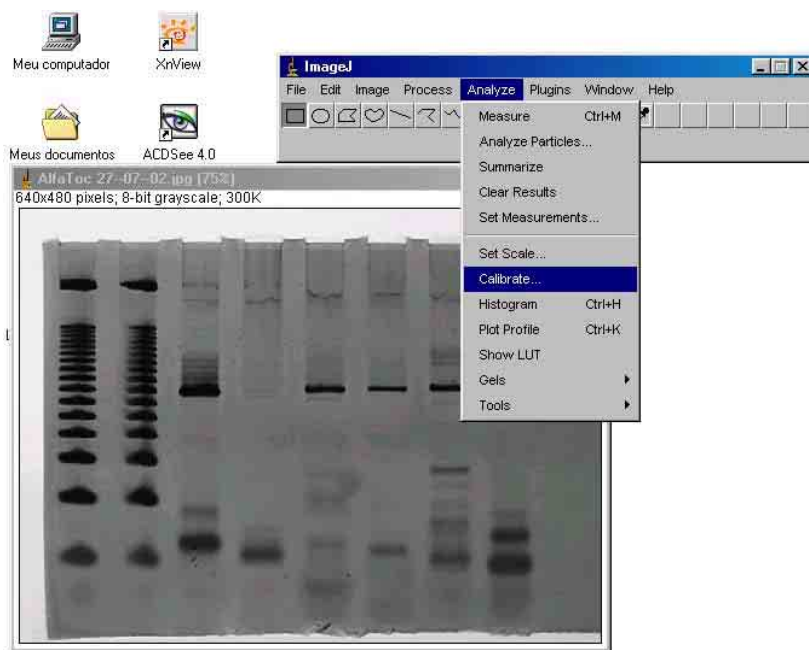
A técnica parte do princípio que, se o controle de amplificação é uma seqüência que também vai ser amplificada sob as mesmas condições da seqüência-alvo, ele pode ser utilizado com parâmetro de quantificação dos produtos de PCR. Após a eletroforese, o gel é registrado eletronicamente (por *scanner* ou fotografia digital), e as bandas são analisadas também por programas de densitometria óptica. Talvez o programa mais popular desta série seja o **ImageJ** (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Trata-se de um programa de código aberto e de graça, disponível na Internet. O ImageJ faz a densitometria das bandas obtidas, contando cada micropono de tonalidade escura na foto. Deste modo, traça-se uma relação entre a densidade óptica da banda da seqüência-alvo e a densidade óptica da banda controle.

O programa gera uma curva, cujos picos representam as regiões de maior densidade óptica e, portanto as regiões que apresentam bandas. Então, deve-se isolar este pico com as ferramentas adequadas oferecidas pelo programa, e obter o valor numérico de cada pico (o programa utiliza equações integrais simples para transformar os picos em valores). A partir deste ponto, o que se tem a fazer é dividir o valor de cada banda da(s) seqüências-alvo pelo valor da banda controle.

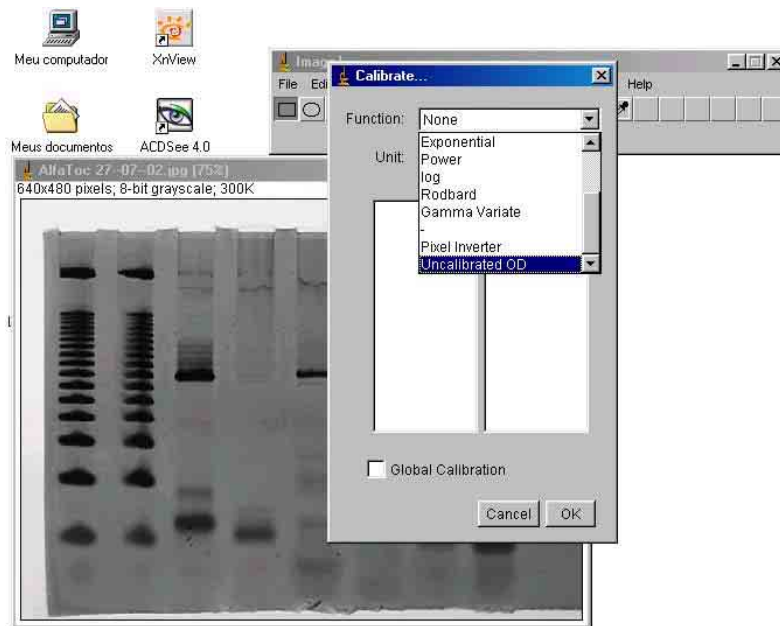
## Utilização do ImageJ



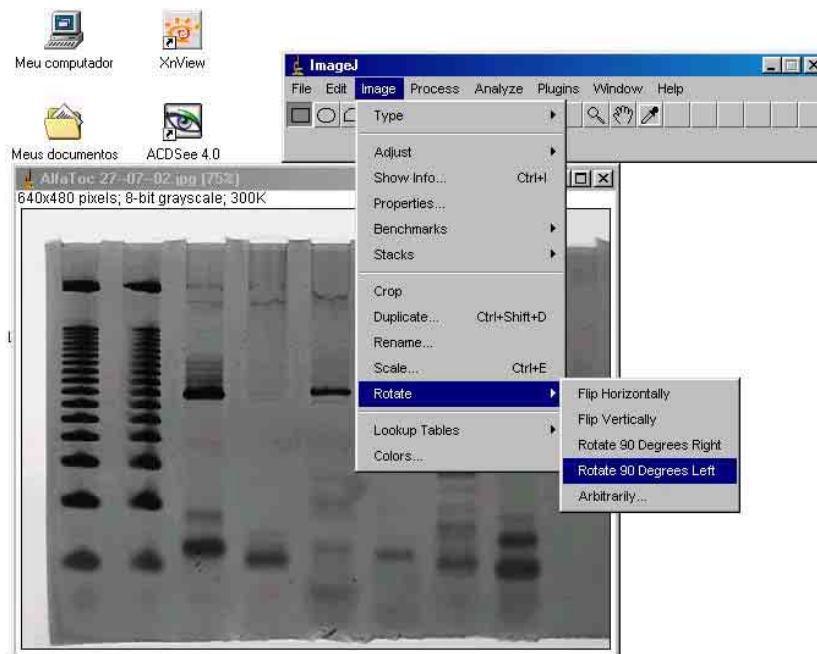
- I) **Abrir uma foto de algum gel (qualquer formato de imagem: \*.bmp, \*.gif, \*.jpeg, \*.tiff, etc.**



## II) Calibrar a escala de medição de densidade óptica

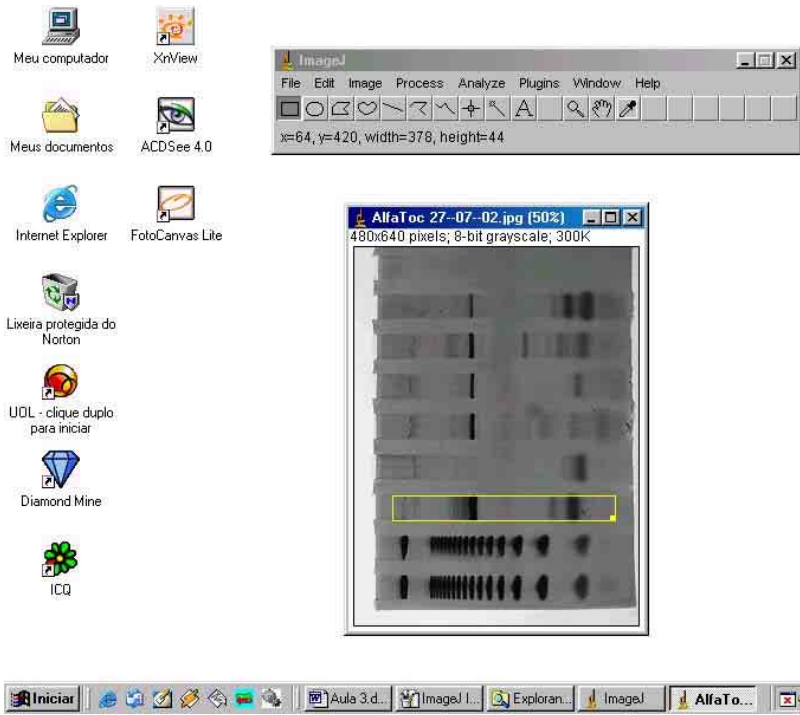


## III) Escolher “Uncalibrated OD”. O programa mostrará uma função plotada sob a forma de curva; pode-se desprezá-la simplesmente fechando a sua janela.

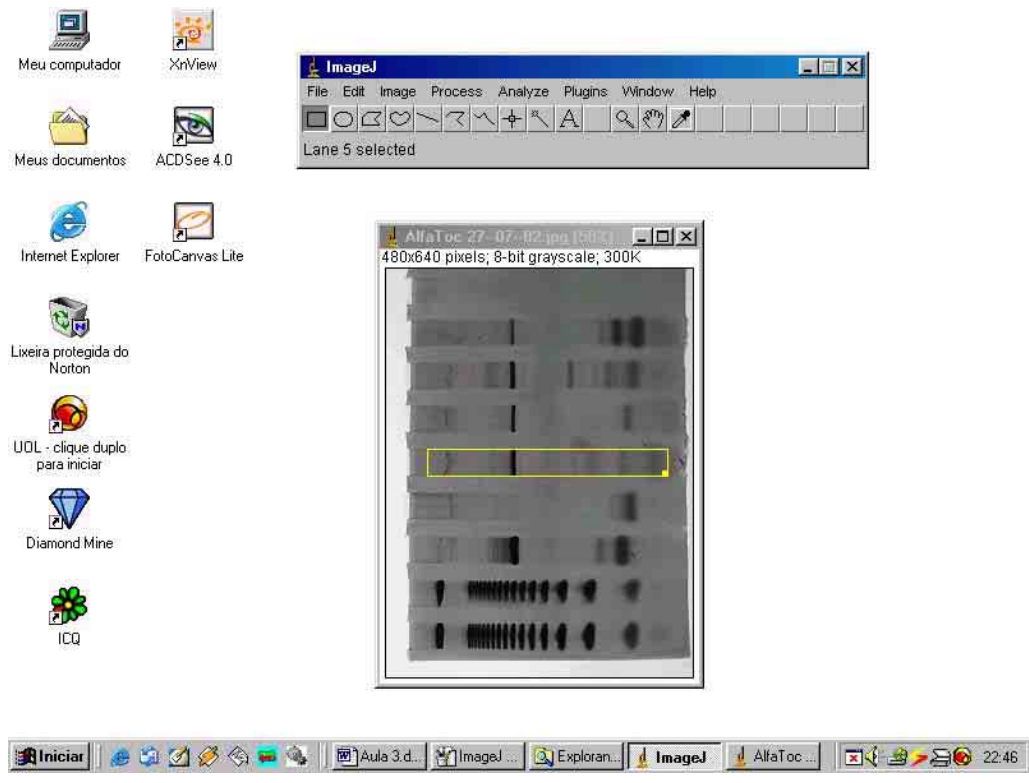


## IV) Rotacionar a figura 90° para a esquerda (o programa não aceita *lanes* verticais)

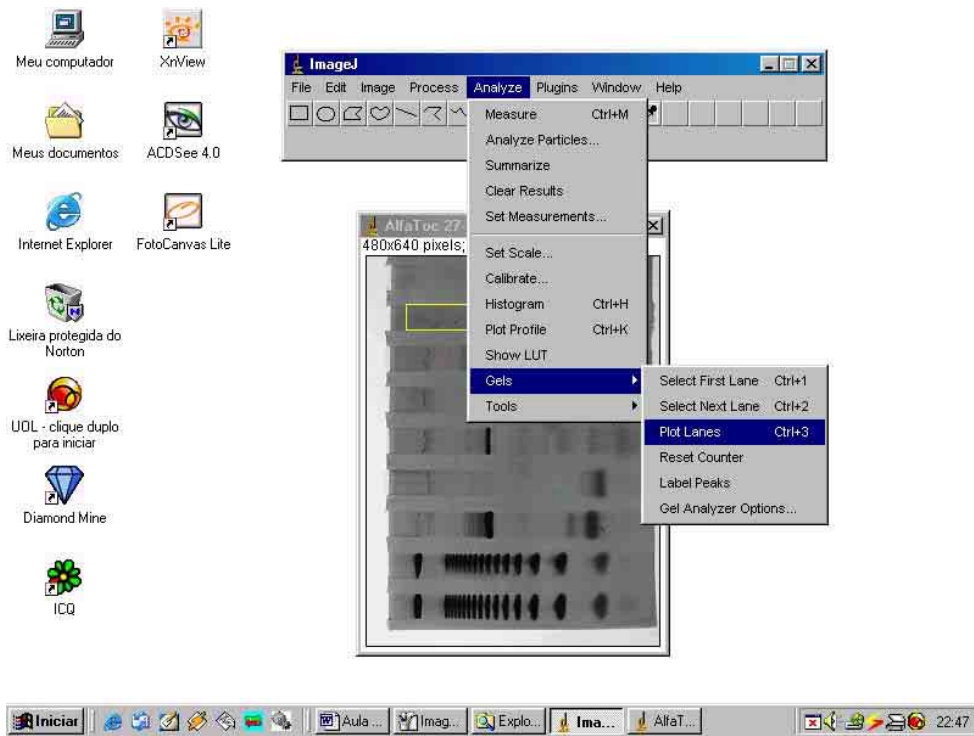




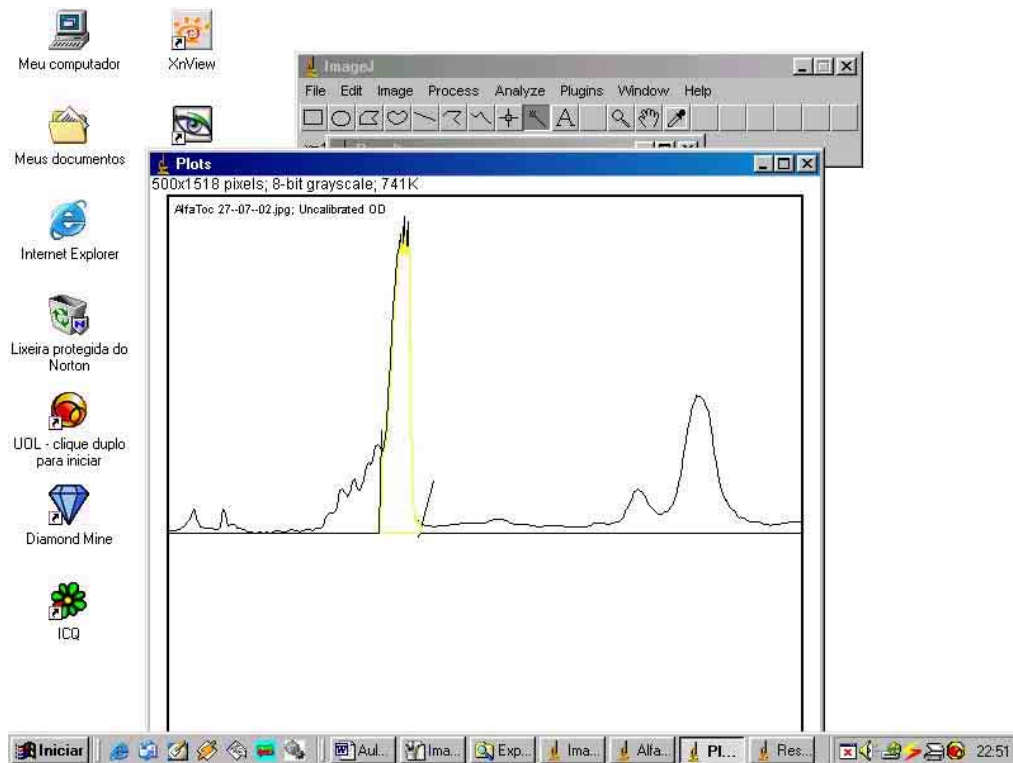
V) Com a Ferramenta retângulo, marcar a *lane* do controle de amplificação e teclar **Ctrl+1**



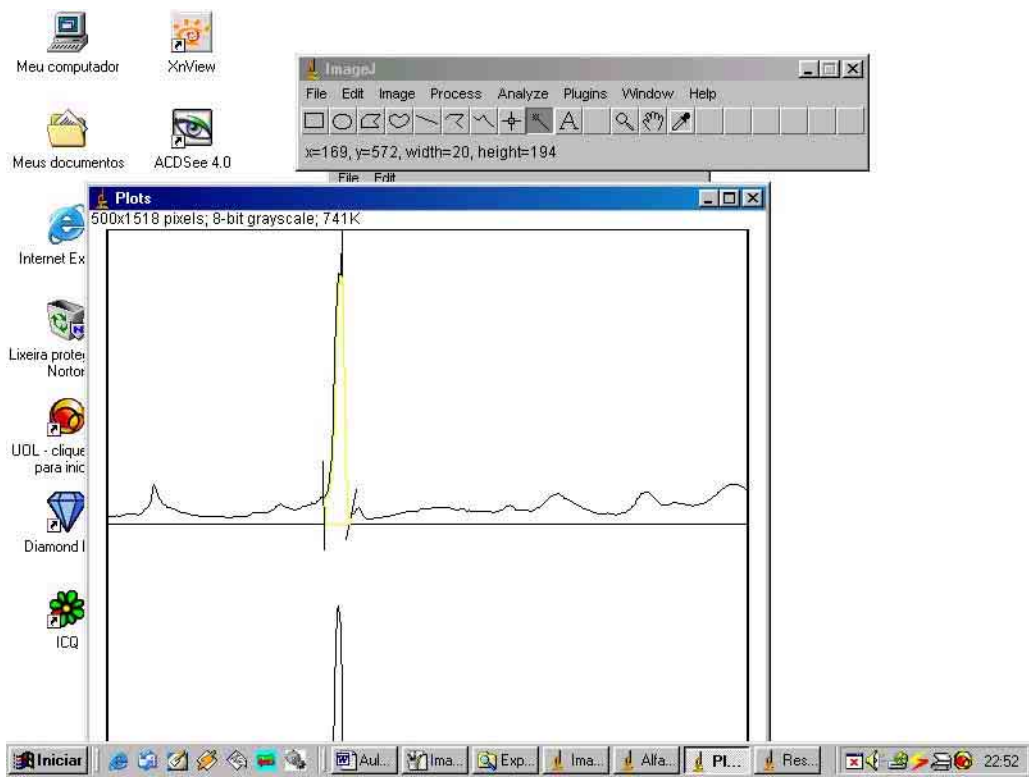
VI) Marcar as outras *lanes* deslocando a seleção e teclando **Ctrl+2**



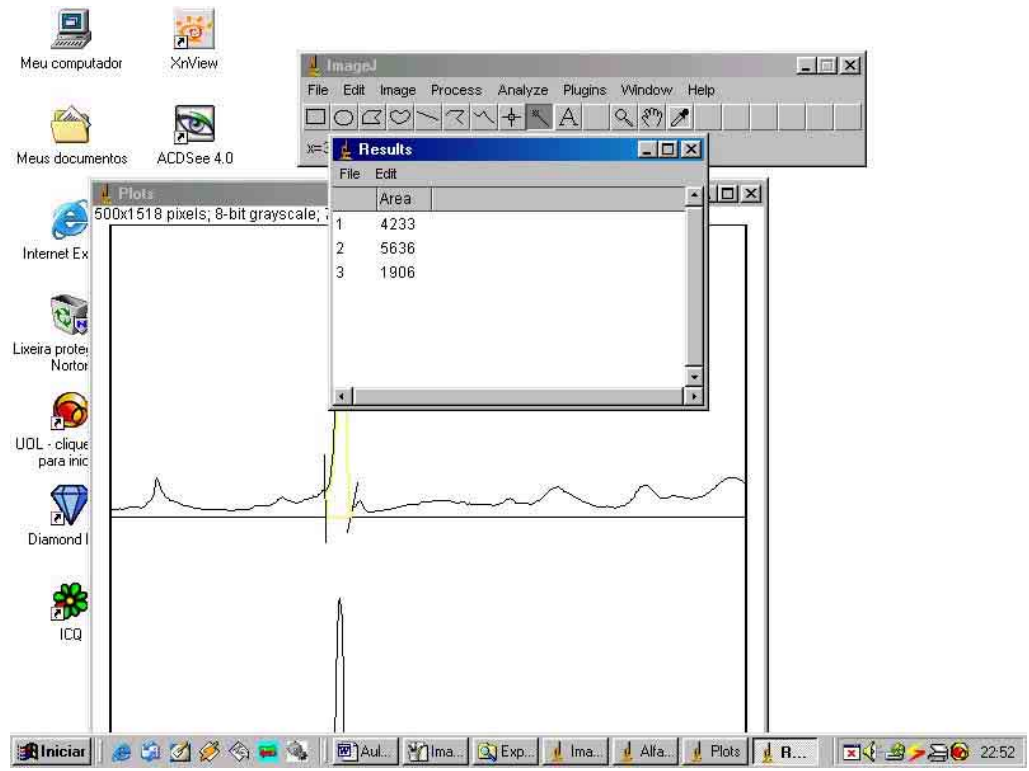
**VII) Acessar o menu “Plot Lanes” ou teclar Ctrl+3**



**VIII) Com a ferramenta linha, isolar o pico correspondente à banda de interesse. No caso mostrado, trata-se da banda controle.**



IX) Fazer o mesmo com as outras bandas (Dica: Selecionar a *lane* do padrão de peso molecular pode ajudar a encontrar o pico que corresponde à banda de interesse)



- X) Os valores mostrados pela janela “Results” são as integrações das curvas, ou seja, sua “tradução” em valores numéricos. A partir daí, basta usar o valor medido para a banda da seqüência-alvo e dividir pelo valor obtido na medição da banda-controle. O resultado é um valor relativo, de unidades de densidade óptica da amostra em relação às unidades da amostra. Valor arbitrário (Sem unidade).