



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Sequenciamento de DNA e PCR

Prof. João Carlos Setubal

PCR

- Polymerase chain reaction
- Reação em cadeia da polimerase
- É um processo **tecnológico**
- Ou seja, inventado por seres humanos para atingir objetivos específicos nossos

Qual polimerase?

- DNA polimerase

Polimerases de DNA: As enzimas que sintetizam DNA

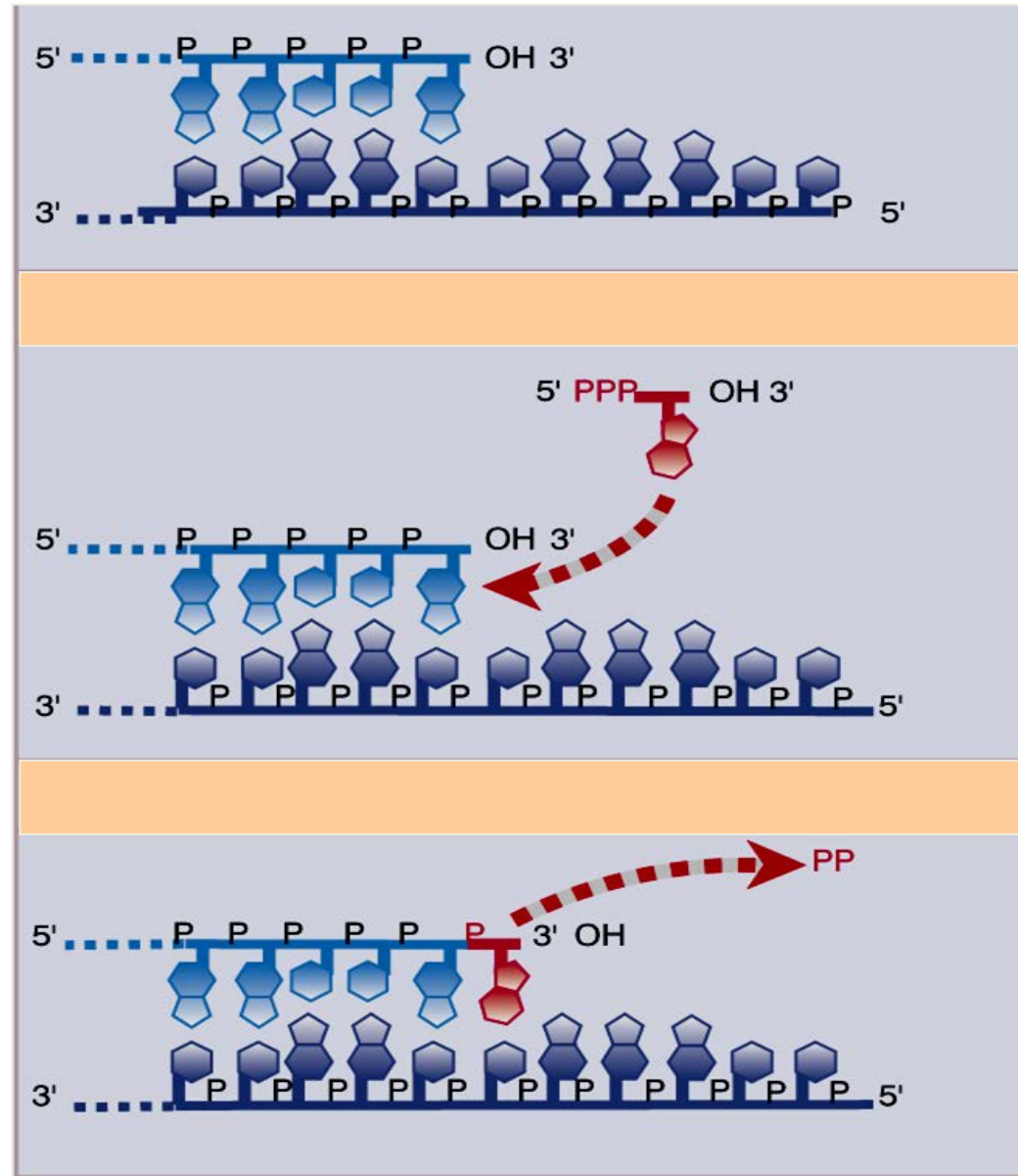
- A síntese de DNA ocorre pela adição de nucleotídeos a extremidade 3'OH da cadeia em crescimento.

- A DNA polimerase requer um *primer* (iniciador) e um molde

- O precursor da síntese é desoxirribonucleosídeo 5' trifosfato

- Sentido da síntese sempre é 5' → 3'

- A replicação é um processo extremamente fiel. As DNA-polimerases tem atividade revisora



O processo de PCR

- Procura **imitar** o processo de **replicação** de DNA
 - o que explica o uso da DNA polimerase
- Objetivo é aumentar (“**amplificar**”) a quantidade de uma certa sequência de DNA de interesse
 - com mais DNA, é possível fazer mais coisas com esse DNA
 - uma dessas coisas é **determinação de presença/ausência**
 - se houver amplificação ⇒ **presença**
 - se não houver amplificação ⇒ **ausência**
- Técnica inventada na década de 80
- Seu inventor ganhou o prêmio Nobel em 1993
 - Kary Mullis (1944 – 2019)

É um processo de crescimento exponencial

- Como na lenda do jogo de xadrez...



- 1 grão na primeira casa
- 2 grãos na segunda casa
- 4 grãos na terceira casa
- ...etc
- Quantos grãos na última casa?

$$2^{n-1}$$

$$2^{63}$$

$$\sim 10^{19}$$

$$1 \text{ trilhão} = 10^{12}$$

10 milhões x 1 trilhão

Ingredientes para PCR

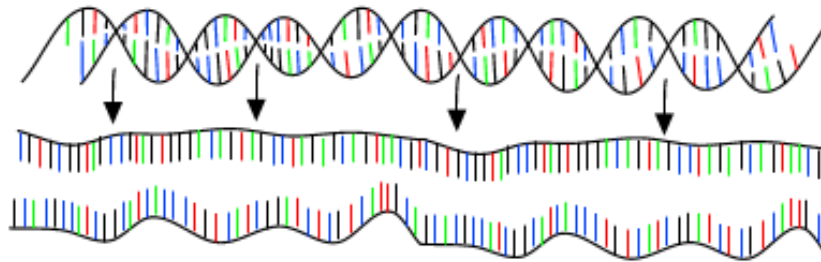
- O DNA **molde** que contém a região do DNA que se deseja amplificar (o alvo)
- Dois **primers** que são complementares às pontas 3' da fita senso e da fita anti-senso do DNA alvo
- Polimerase Taq que funcione a **70 °C**
- *Deoxinucleosídeos trifosfato* (dNTPs) ou seja, nucleotídeos contendo grupos trifosfato
- Tampão (um ambiente químico adequado para ação da polimerase)
- Cations e ions de magnésio e potássio

Ciclos do PCR

- A ideia é fazer o DNA (e os ingredientes) passarem **várias vezes** por **3 passos** (cada conjunto de 3 passos é um **ciclo**)
 1. Passo de **desnaturação**, em que DNA **fita dupla** passa a ser de **fita simples**
 2. Passo de **anelamento**, em que os primers se acoplam aos DNAs de fita simples
 3. Passo de **extensão** do DNA, quando a replicação de fato ocorre

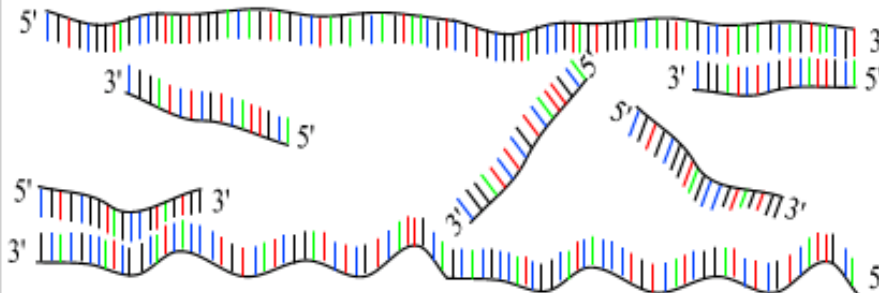
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

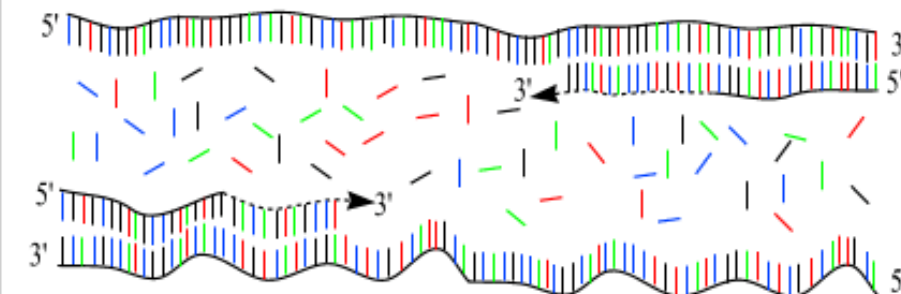
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

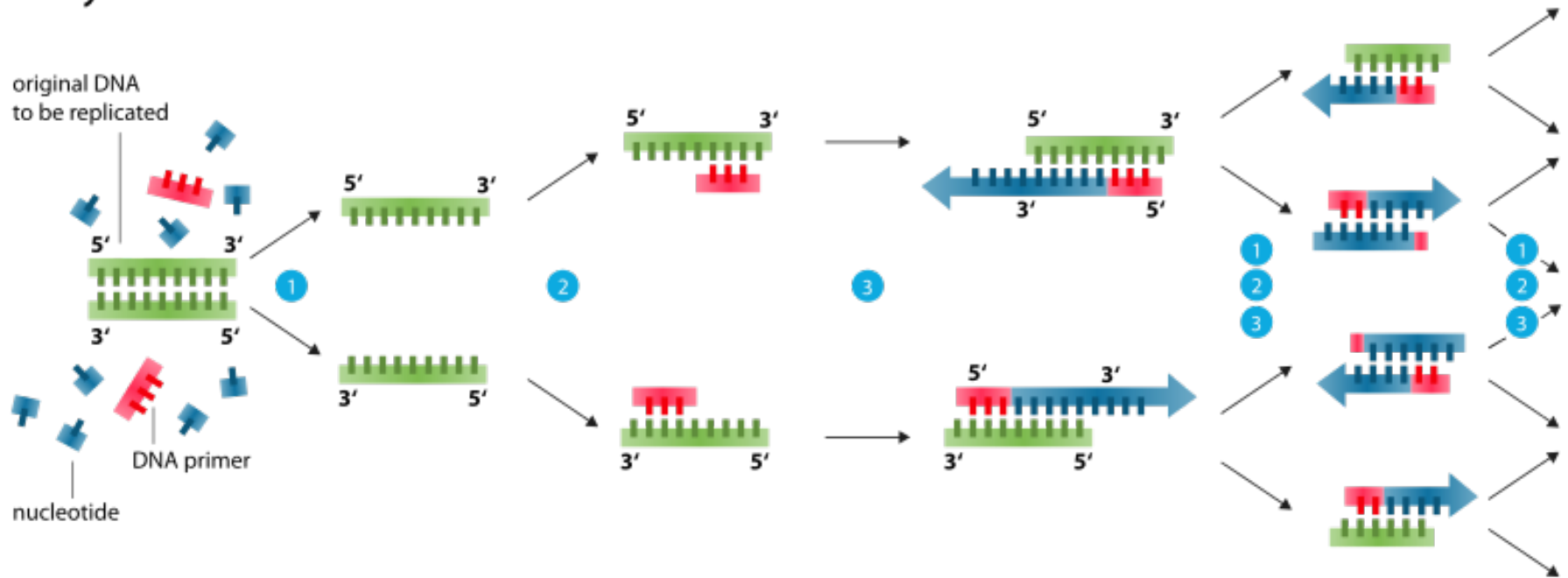
2 minutes 72 °C

only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

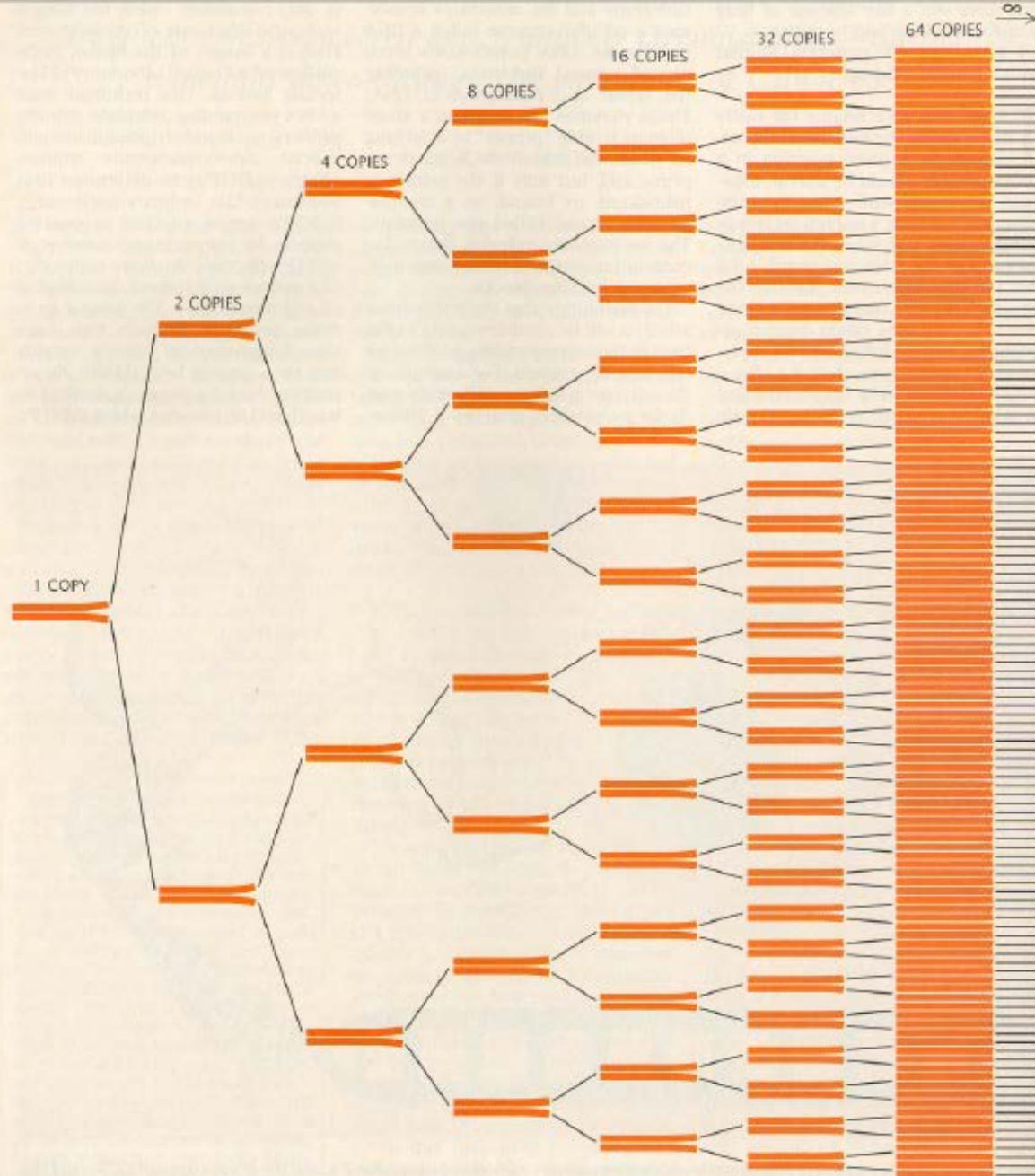
- Matematicamente, se começássemos com **uma única molécula**, teríamos ao final de 30 ou 40 ciclos
 - Entre 2^{30} e 2^{40} moléculas

Polymerase chain reaction - PCR



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

Fonte: wikipedia



POLYMERASE CHAIN REACTION is a simple technique for copying a piece of DNA in the laboratory with readily available reagents. Because the number of copies increases exponentially, more than 100 billion can be made in only a few hours.

Neste site vocês podem ver animações interativas de PCR

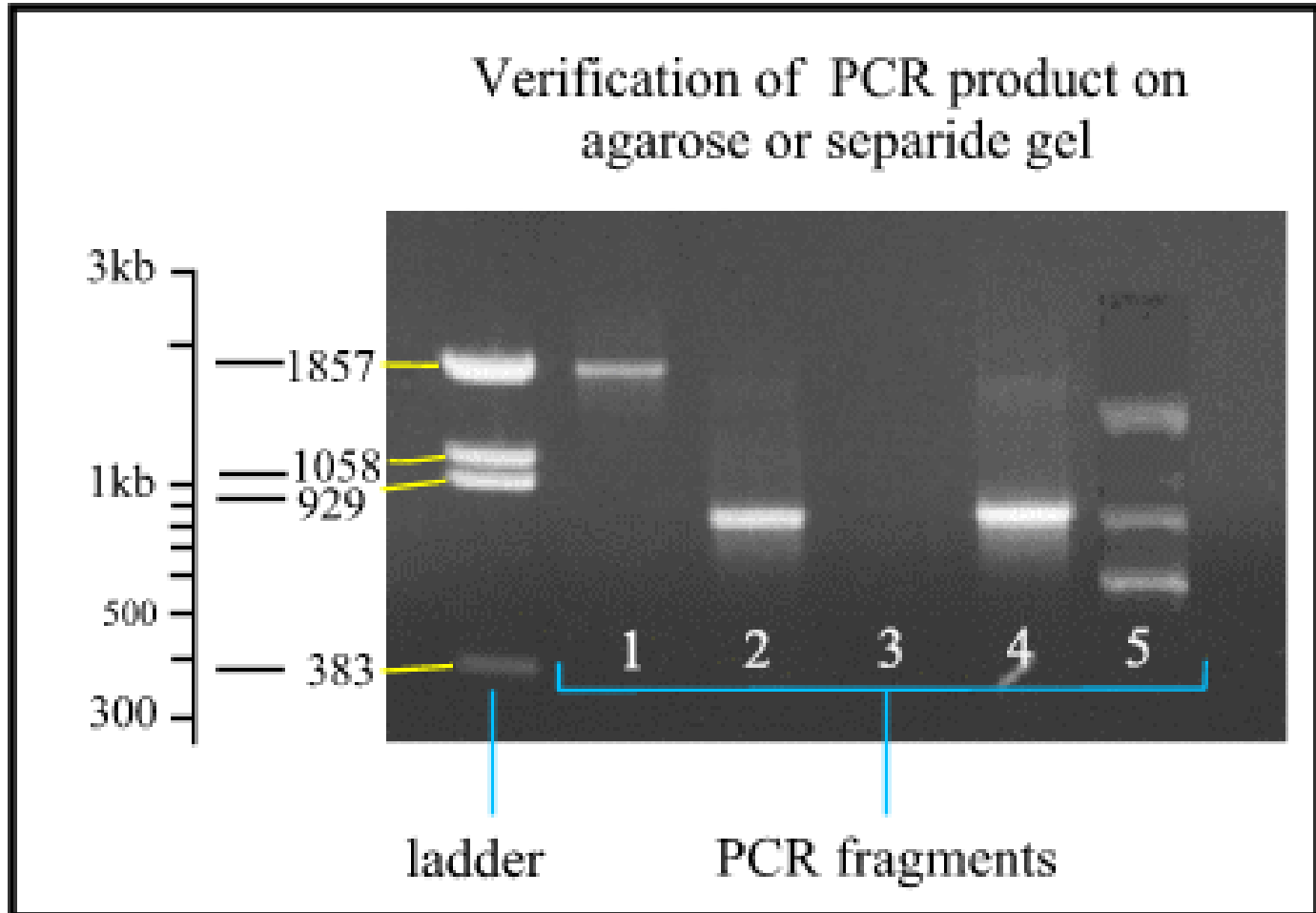
<https://dnalc.cshl.edu/resources/animations/pcr.html>

PCR se faz por máquinas



termocicladores

Nem sempre PCR dá certo



Aplicações

- Aumentar a quantidade de DNA para sequenciamento
- Diagnóstico de **doenças genéticas**
- Diagnóstico de **doenças infecciosas**
 - **COVID-19**
- Identificação de assinaturas genéticas, como em **testes de paternidade**
- **Filogenia de espécies** por pequenos trechos de DNA

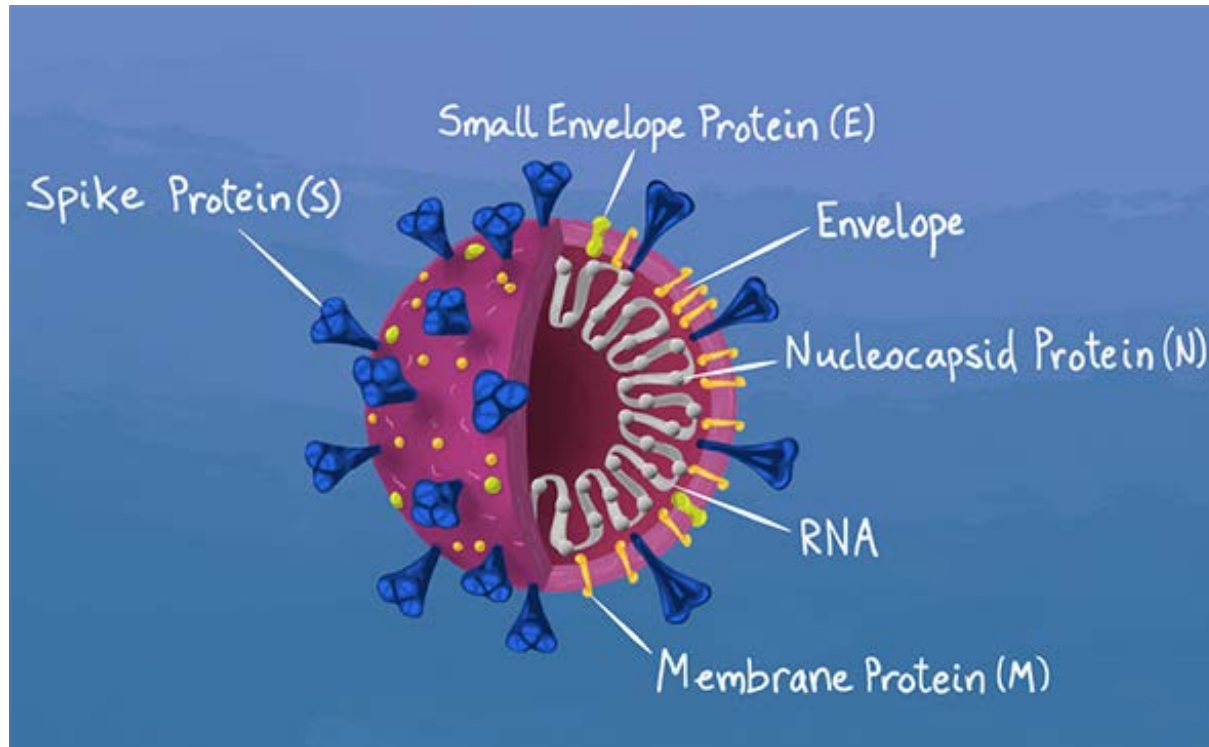
Há uma certa confusão de nomenclatura

Technique	Abbreviation
Polymerase chain reaction	PCR
Reverse transcription polymerase chain reaction	RT-PCR
Real-time polymerase chain reaction	qPCR
RT-PCR / qPCR combined technique	qRT-PCR

Covid-19

- SARS-CoV-2 é um vírus de RNA
- Para detectar a presença do seu RNA é preciso usar RT-PCR
 - RT \Rightarrow **reverse transcription** (transcrição reversa)
 - transforma RNA em DNA
 - veremos esse processo com mais detalhe em aula futura

Teste de antígeno para Covid-19



Detecta a presença da proteína N do vírus; é completamente diferente de PCR

Sequenciamento de DNA

- PCR aumenta (amplifica) a **quantidade** de um certo fragmento de DNA
- em alguns casos sabemos exatamente qual é a sequência do fragmento esperado
- em outros casos, sabemos o “jeitão geral” da sequência, mas esta pode ter variações em relação ao “template” (por exemplo, mutações)
- em outros casos ainda, não sabemos a sequência; sabemos apenas que ela deve estar entre os 2 primers que foram desenhados
- Nesses casos, como **saber a sequência** desse fragmento?

DNA é microscópico

- como saber a composição de DNA?
- não existe microscópio suficientemente poderoso que permita simplesmente “ler” a molécula, percorrendo-a de uma ponta à outra
- métodos **indiretos** são necessários
- todos eles tem que **fragmentar** o DNA para obter resultados (caso já não esteja fragmentado)

Método Oxford Nanopore para sequenciamento de DNA

Hole genome analysis

Nanopore sequencing

DNA double helix

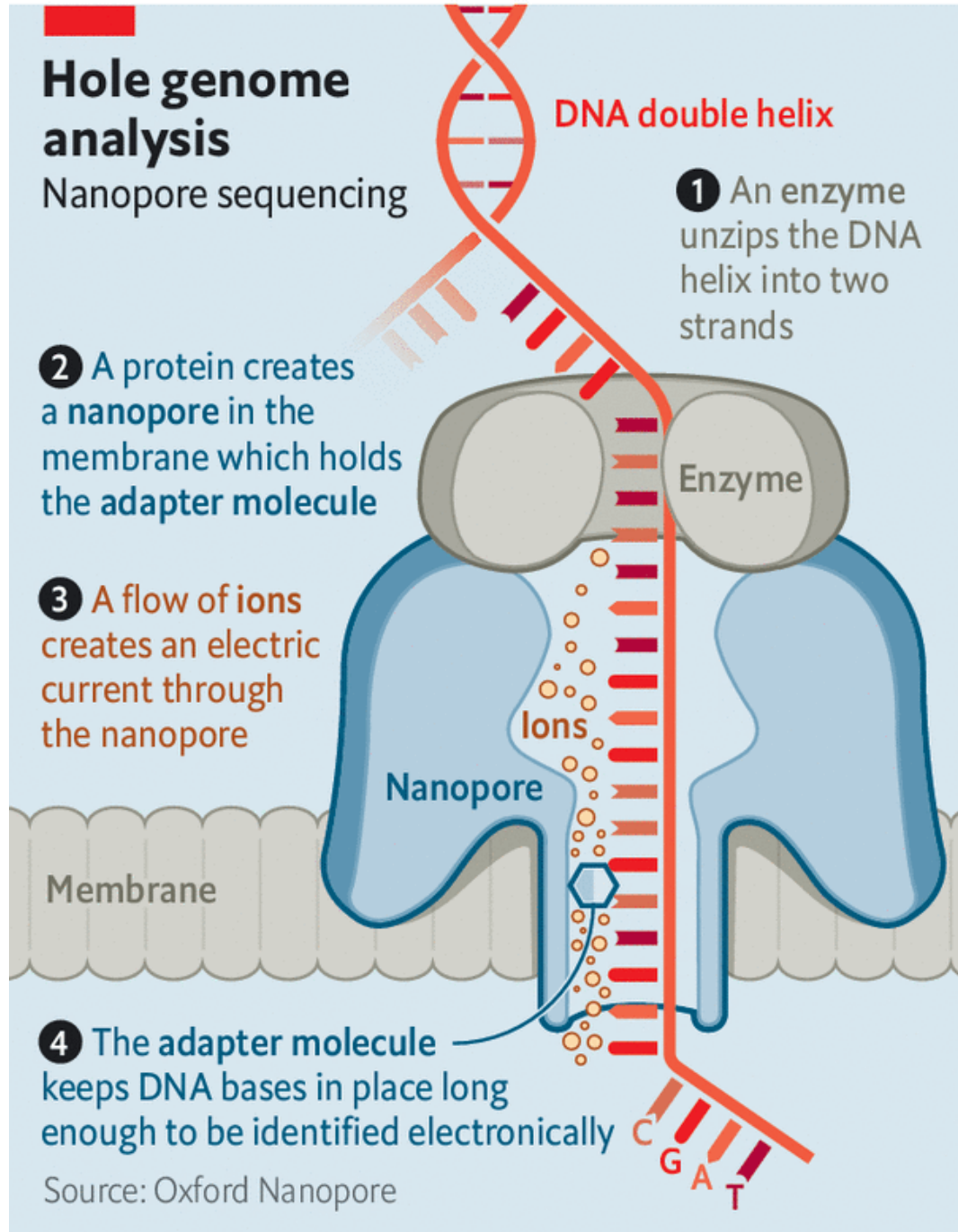
1 An enzyme unzips the DNA helix into two strands

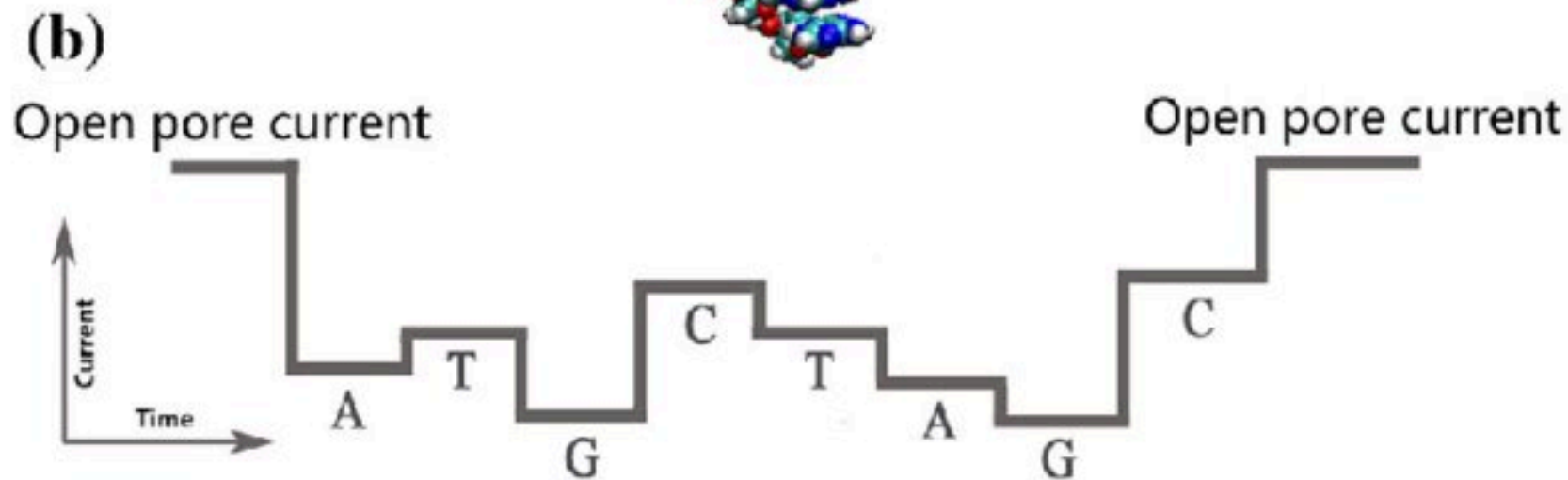
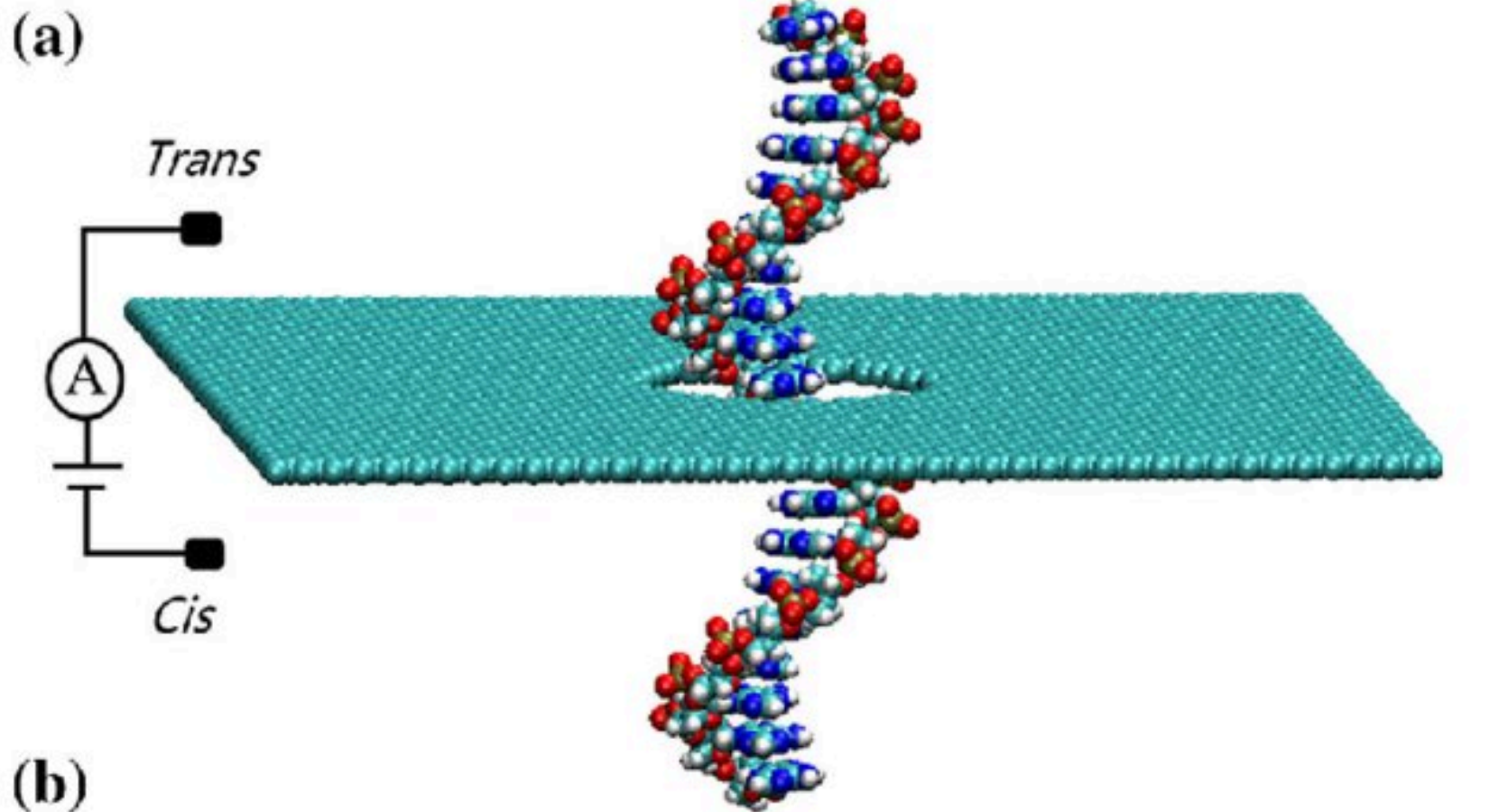
2 A protein creates a nanopore in the membrane which holds the adapter molecule

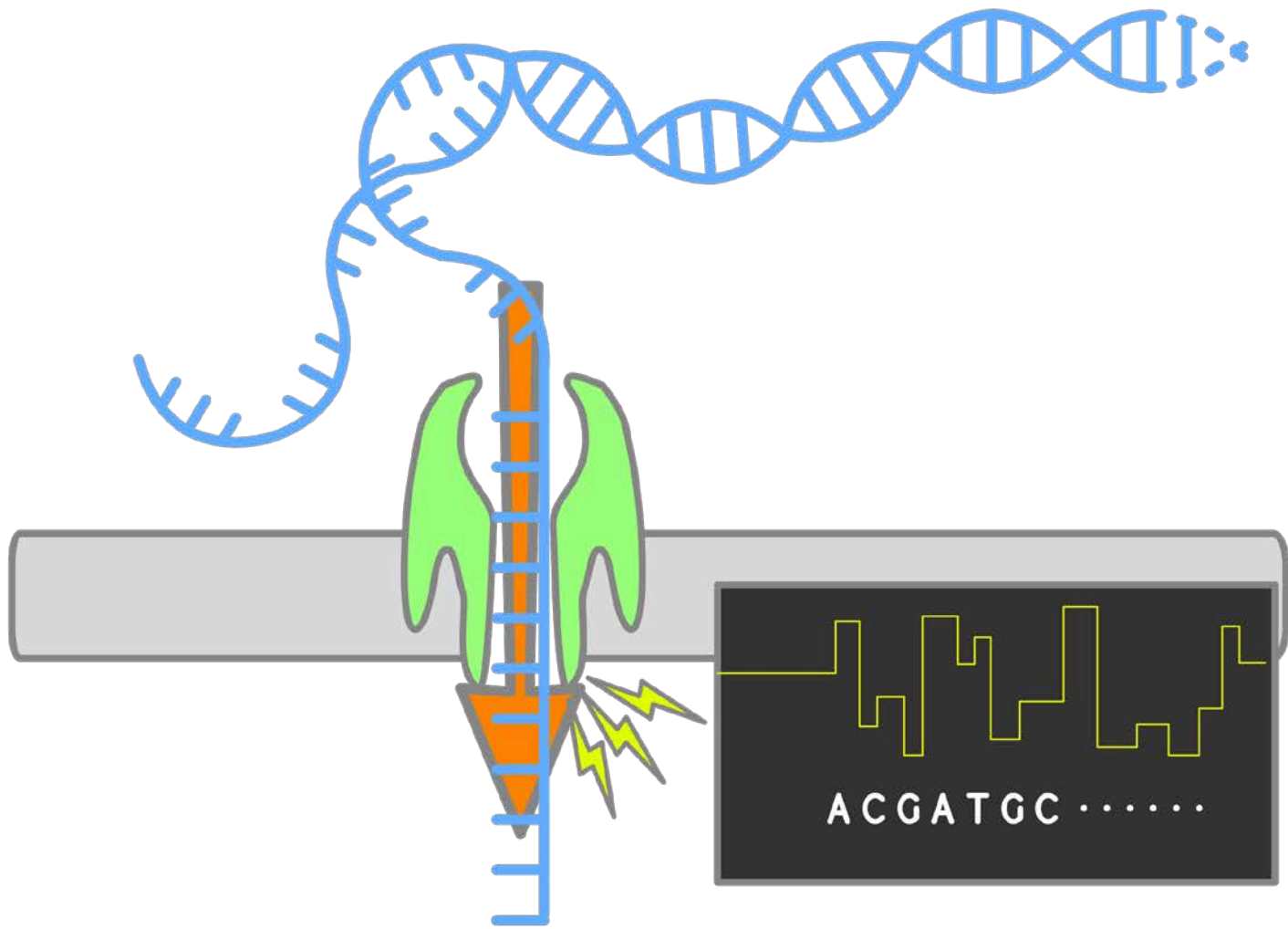
3 A flow of ions creates an electric current through the nanopore

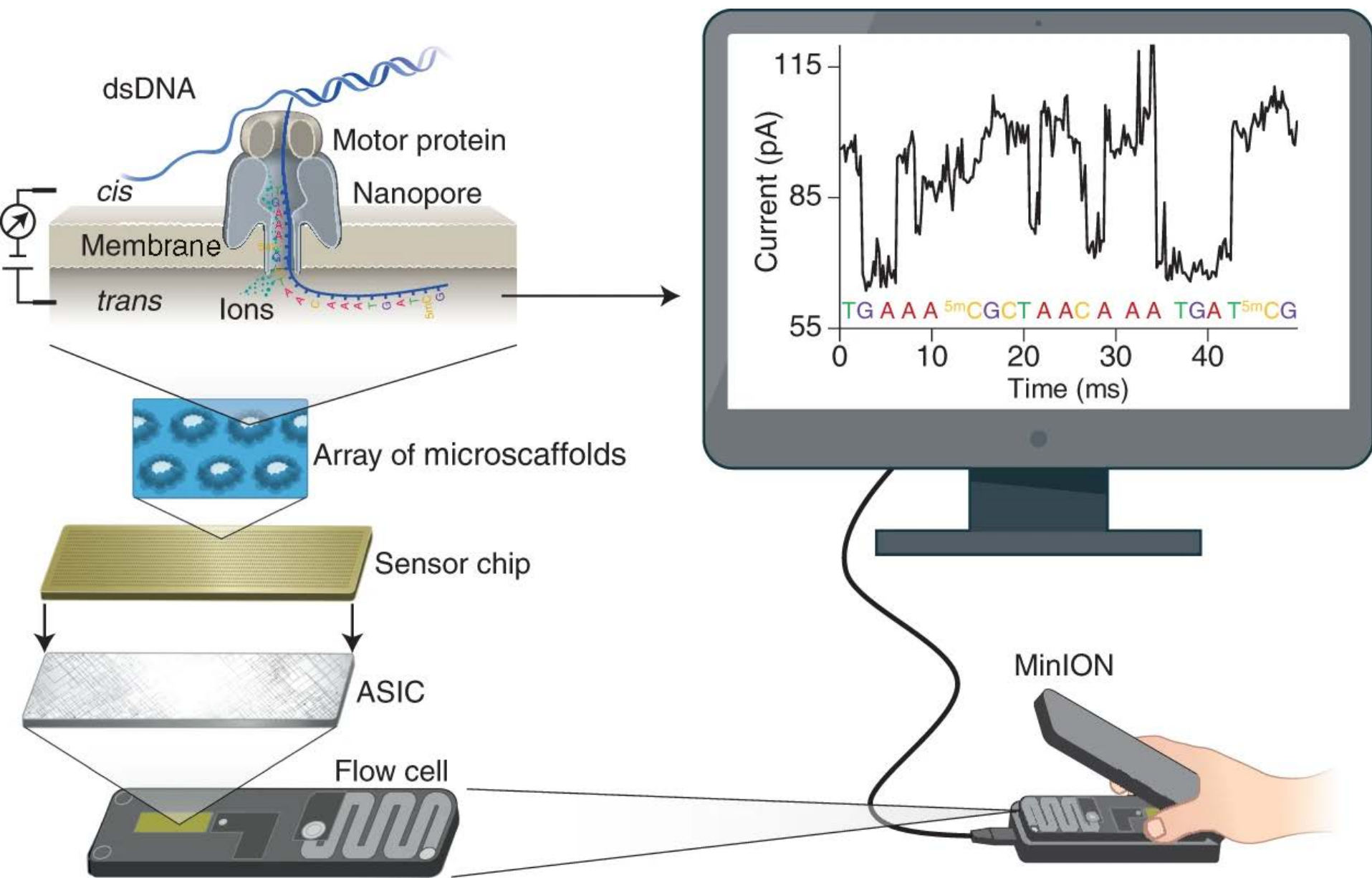
4 The adapter molecule keeps DNA bases in place long enough to be identified electronically

Source: Oxford Nanopore









video

- <https://youtu.be/E9-Rm5AoZGw?feature=shared>

Tecnologias atuais de sequenciamento

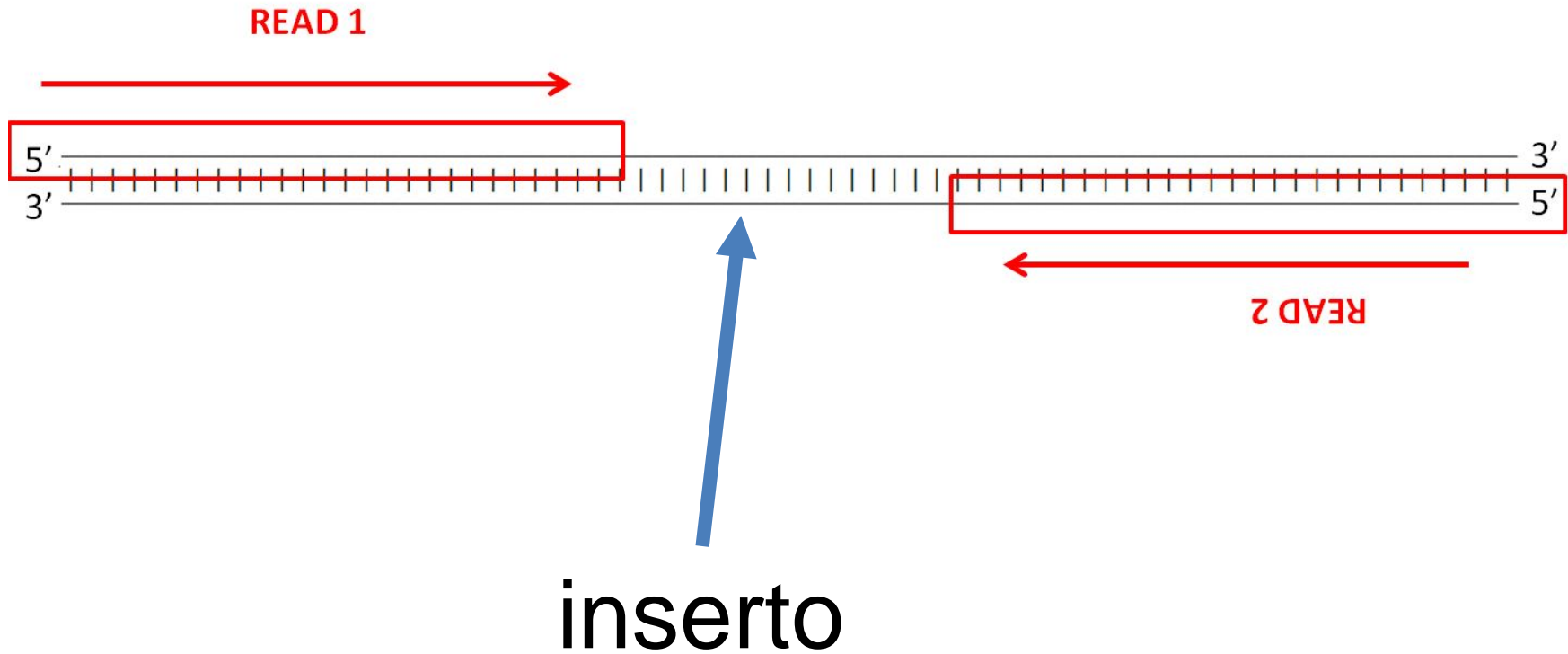
- Illumina
 - sequenciamento por síntese
 - líder de mercado
- Pacific Biosciences (PacBio)
- Oxford Nanopore

Illumina

máquina	tamanho de read (bp)	número de reads por corrida (milhões)
iSeq	2 x 150	4
miniSeq	2 x 150	25
miSeq	2 x 300	25
nextSeq	2 x 150	400

acurácia: **99,9%**

Paired-end reads



PacBio

- leituras podem chegar a 100 kbp
- acurácia: 99,9% (modelo mais recente)

Oxford Nanopore

- tamanho do read depende de escolhas do usuário
- de alguns kbp até 500 kbp
- acurácia: 95%



1997

The ABI Prism 3700 /3730

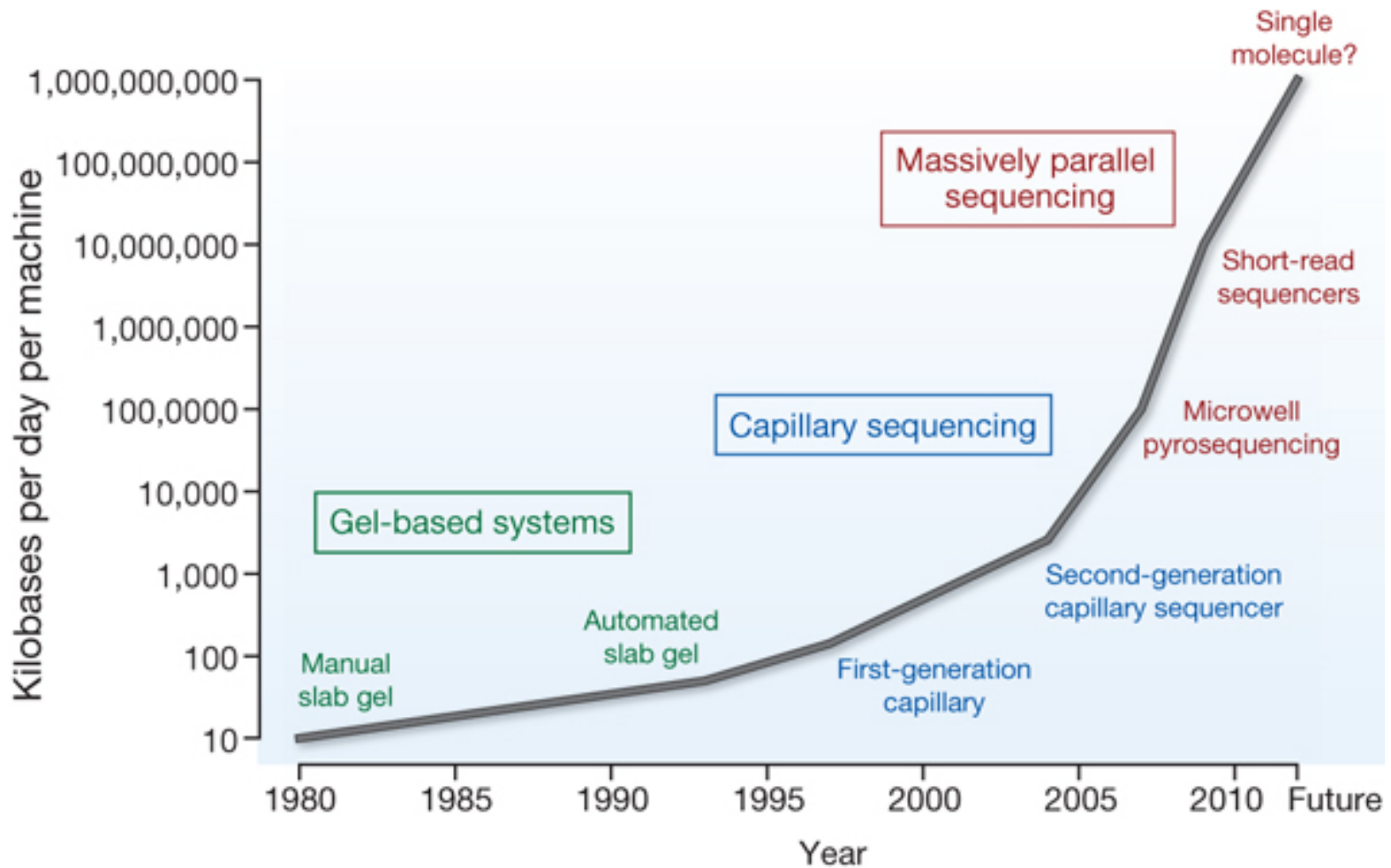


2017

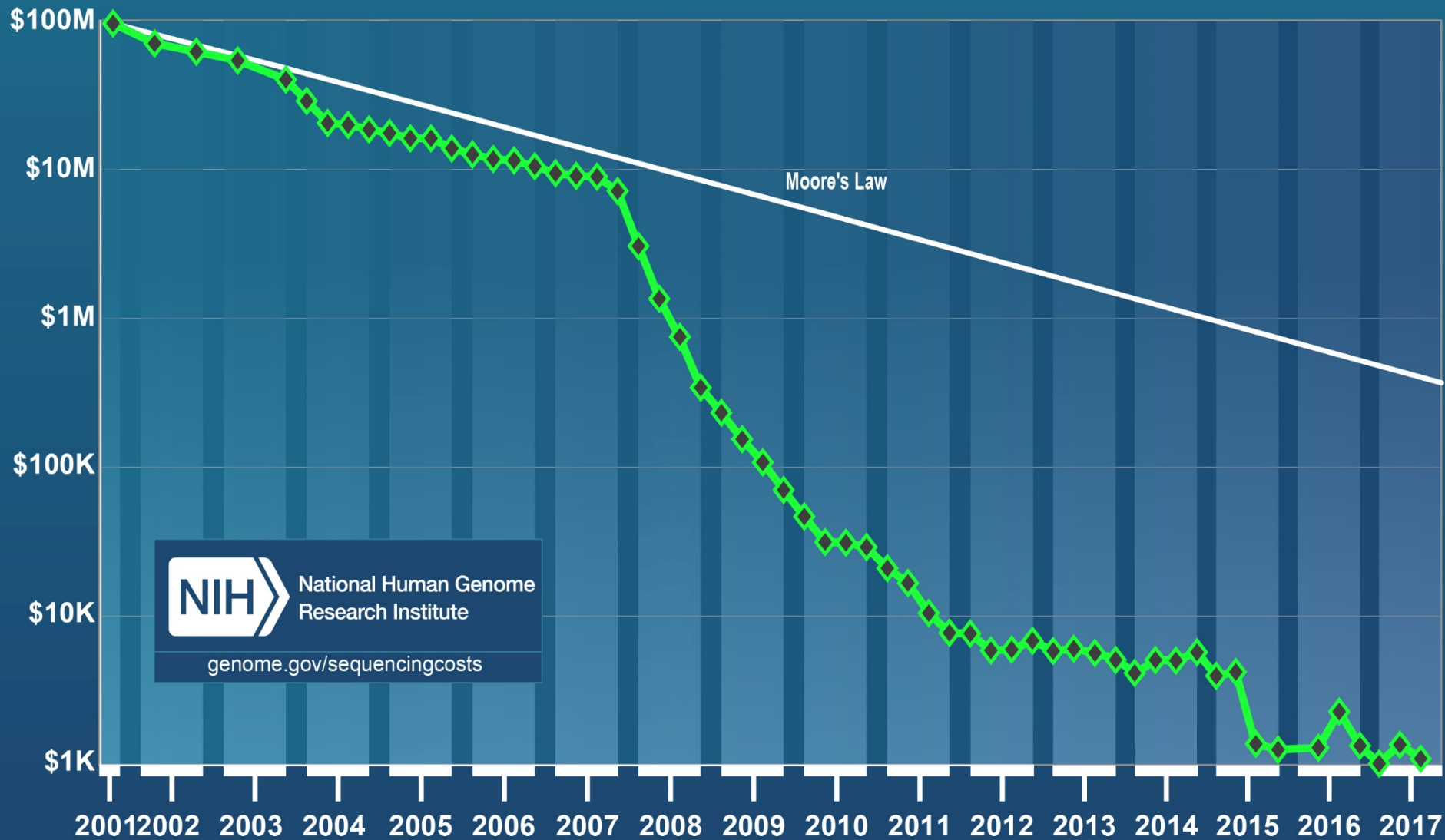
oxford nanopore minION



Evolução da tecnologia de sequenciamento de DNA



Cost per Genome



Como obter genomas inteiros?

- Por montagem

Como os genomas são sequenciados

DNA genômico



Fragmentação



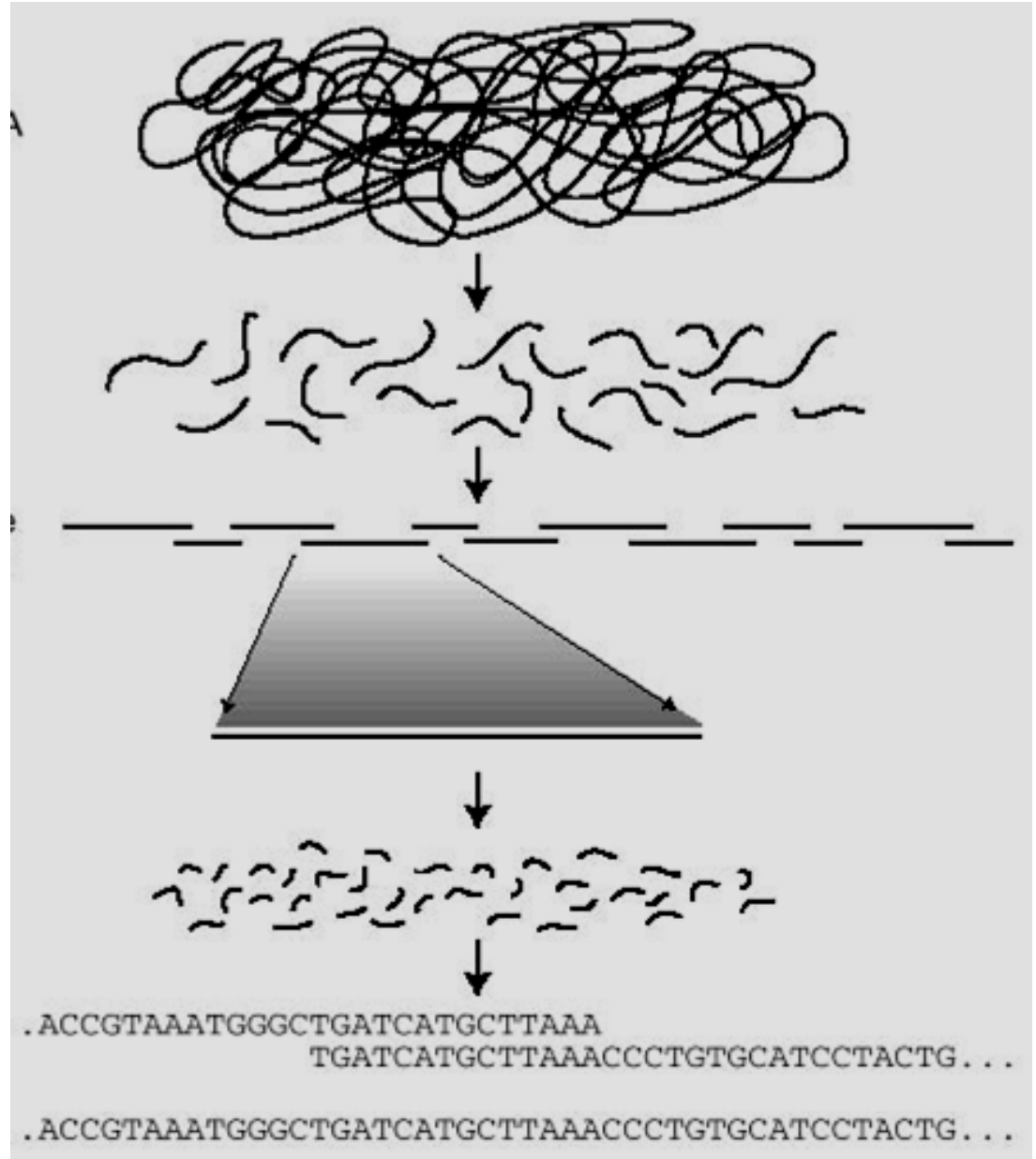
Amplificação
dos fragmentos



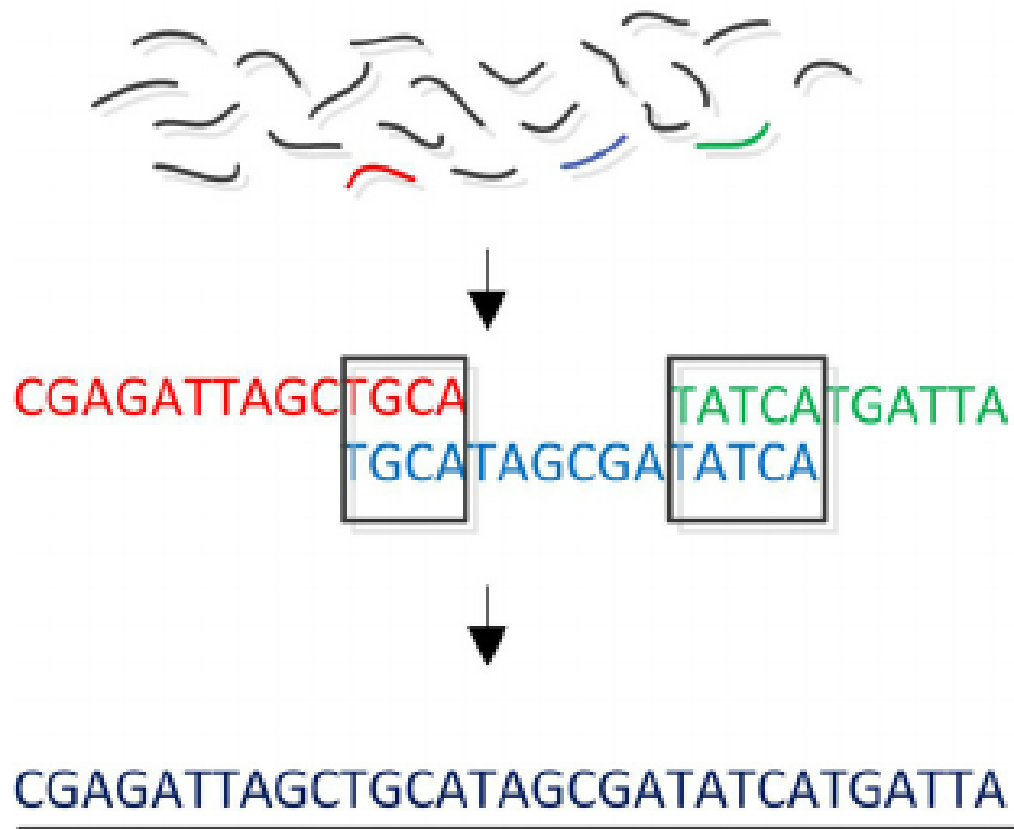
Sequenciamento



Montagem (*in silico*)



Montagem



Pergunta

- se sequenciamento pode ter erros, como atingir a sequência correta?
 - dica: a **montagem ajuda**

Aplicações de sequenciamento

- **Medicina**

- Genoma humano

- Primeiro sequenciamento

- ano 2000, a um custo de 3 bilhões de dólares

- Hoje

- Centenas de milhares de genomas foram sequenciados

- Custo abaixo de mil dólares

- Transcritoma humano

- Diagnóstico de doenças infecciosas

- Medicina personalizada

- Agricultura, pecuária, veterinária, ecologia, criminalística, antropologia, arqueologia, etc

Testes genéticos baseados em PCR e/ou sequenciamento são cada vez mais comuns

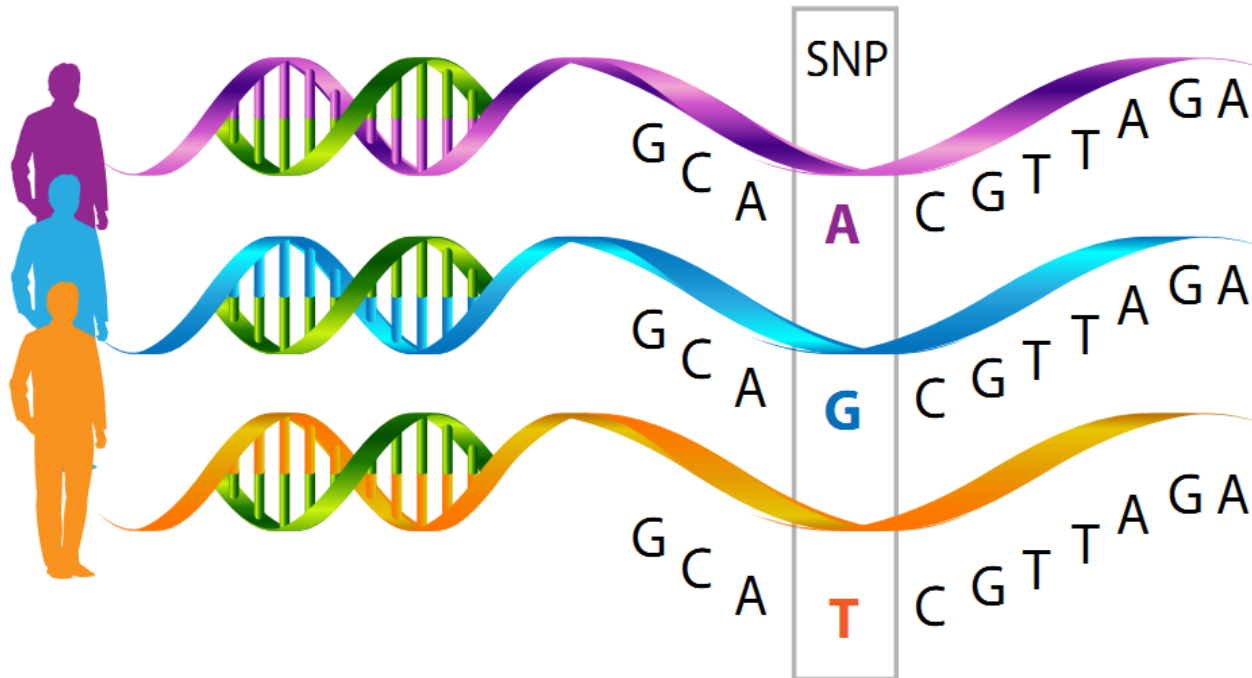
- genes associados a doenças
- intolerância à lactose
- exoma
- etc

Ministério da saúde do Reino Unido
planeja sequenciar **5 milhões de**
genomas humanos nos próximos 5
anos

3 de outubro de 2018

SNP

- Single Nucleotide Polymorphism
- polimorfismo de um único nucleotídeo



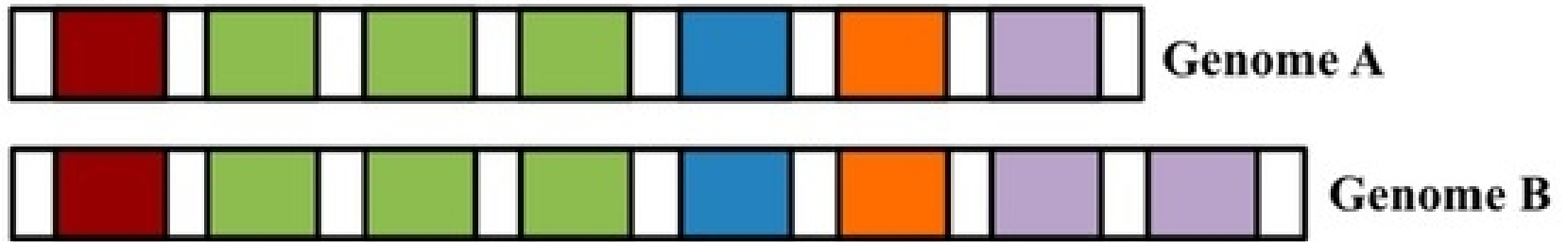
Outras variações

- **indel** = INsertion / DELetion
 - trechos pequenos de DNA inseridos ou removidos num genoma quando comparado com outro
- **número variável de repetições**
 - CNV = copy number variation

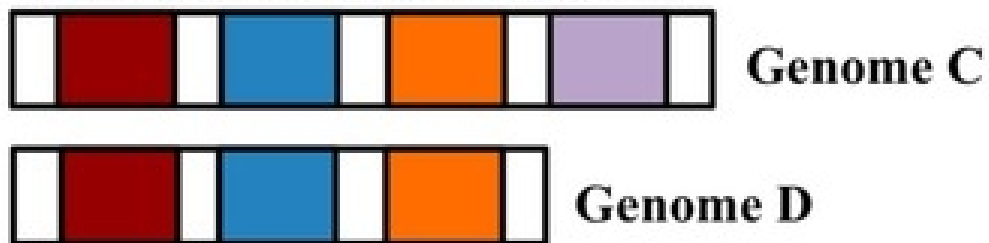
a. Normal reference



b. Copy number variation



c. Presence absence variation



Haplótipo

- São blocos de variações que caracterizam populações
 - as variações são **herdadas** “em bloco”

Sequenciamento e comparação de seqüências genômicas de indivíduos

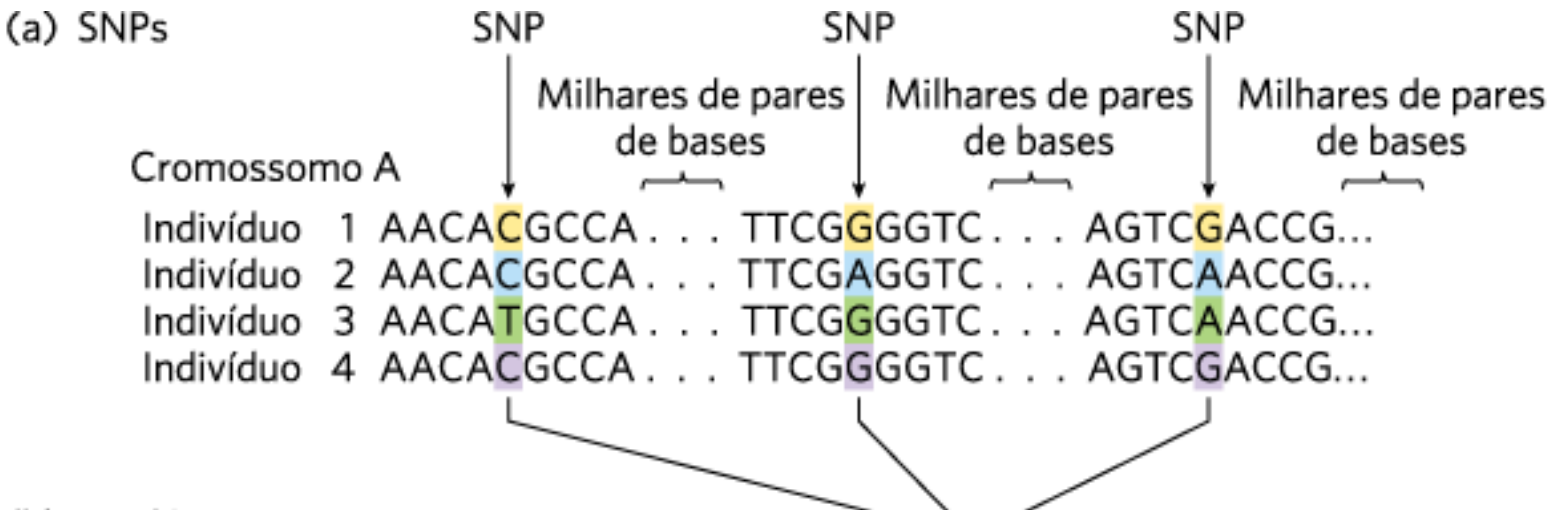
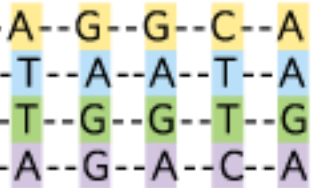


FIGURA 8-7 Identificação de haplótipos. (a) SNPs são identificados em amostras genômicas, e (b) grupos de SNPs são compilados em um haplótipo. Os SNPs irão variar na população humana geral, assim como nos quatro indivíduos fictícios mostrados aqui. Contudo, os SNPs escolhidos para definir um haplótipo frequentemente serão os mesmos na maior parte dos indivíduos de uma população em particular. (c) SNPs que definem haplótipos (SNPs marcadores) podem ser utilizados para simplificar o processo de

identificação do haplótipo de um indivíduo (sequenciando 3 em vez de 20 *loci*). Se as posições mostradas forem sequenciadas, uma seqüência ATC pode ser característica de uma população nativa de um local do nordeste da Europa, enquanto GTC pode ser encontrado em uma população na Ásia. Múltiplos haplótipos deste tipo são utilizados para traçar populações humanas pré-históricas. Ver texto para detalhes. [Fonte: Adaptada de International HapMap Consortium, *Nature* 426:789-796, 2003.]

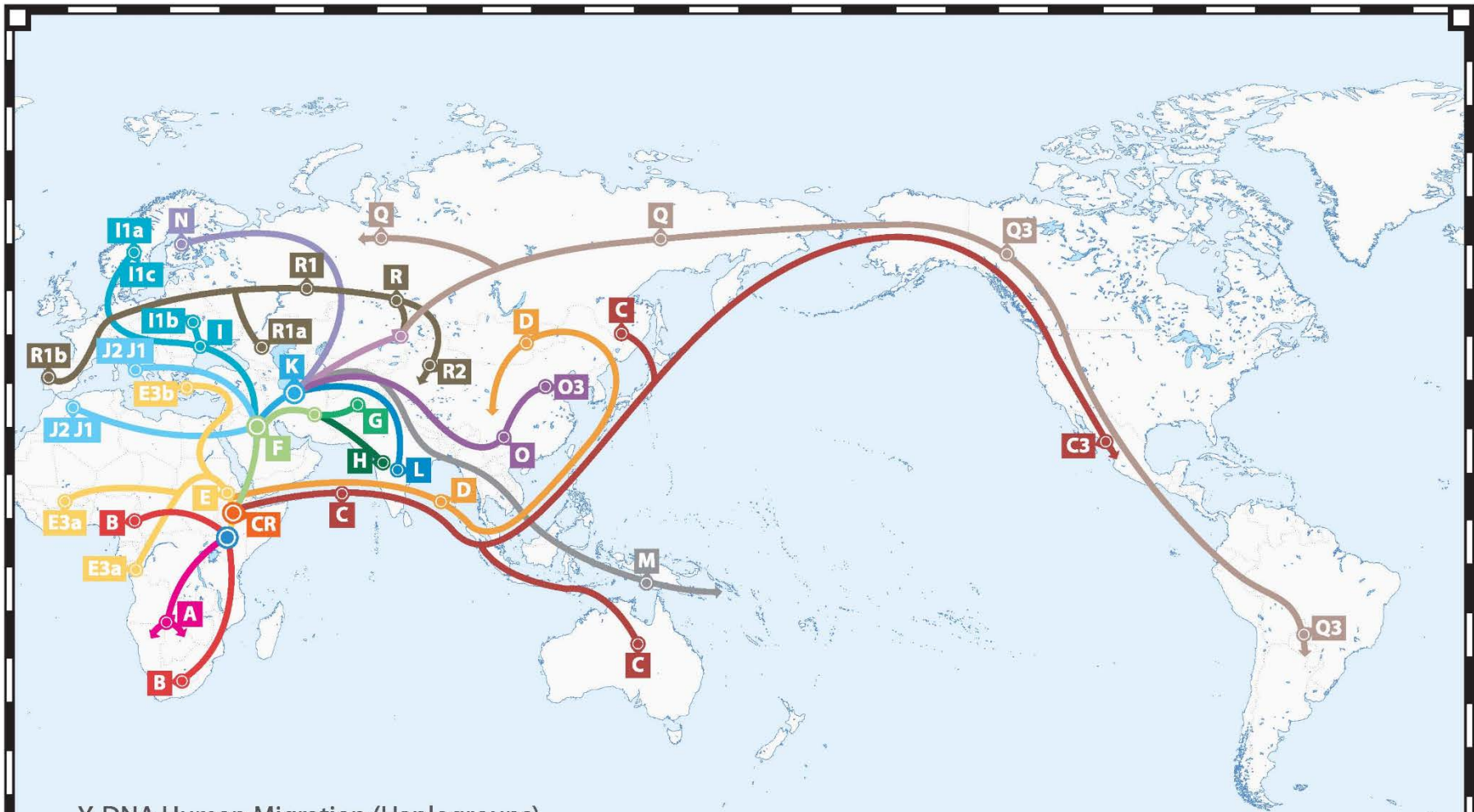


(c) SNPs marcadores



Identificação de **SNP** (polimorfismo de único nucleotídeo) em genomas. Grupos de SNPs marcadores são compilados em um haplótipo e podem ser utilizados para identificação de indivíduos pelo sequenciamento de regiões definidas de seus genomas.

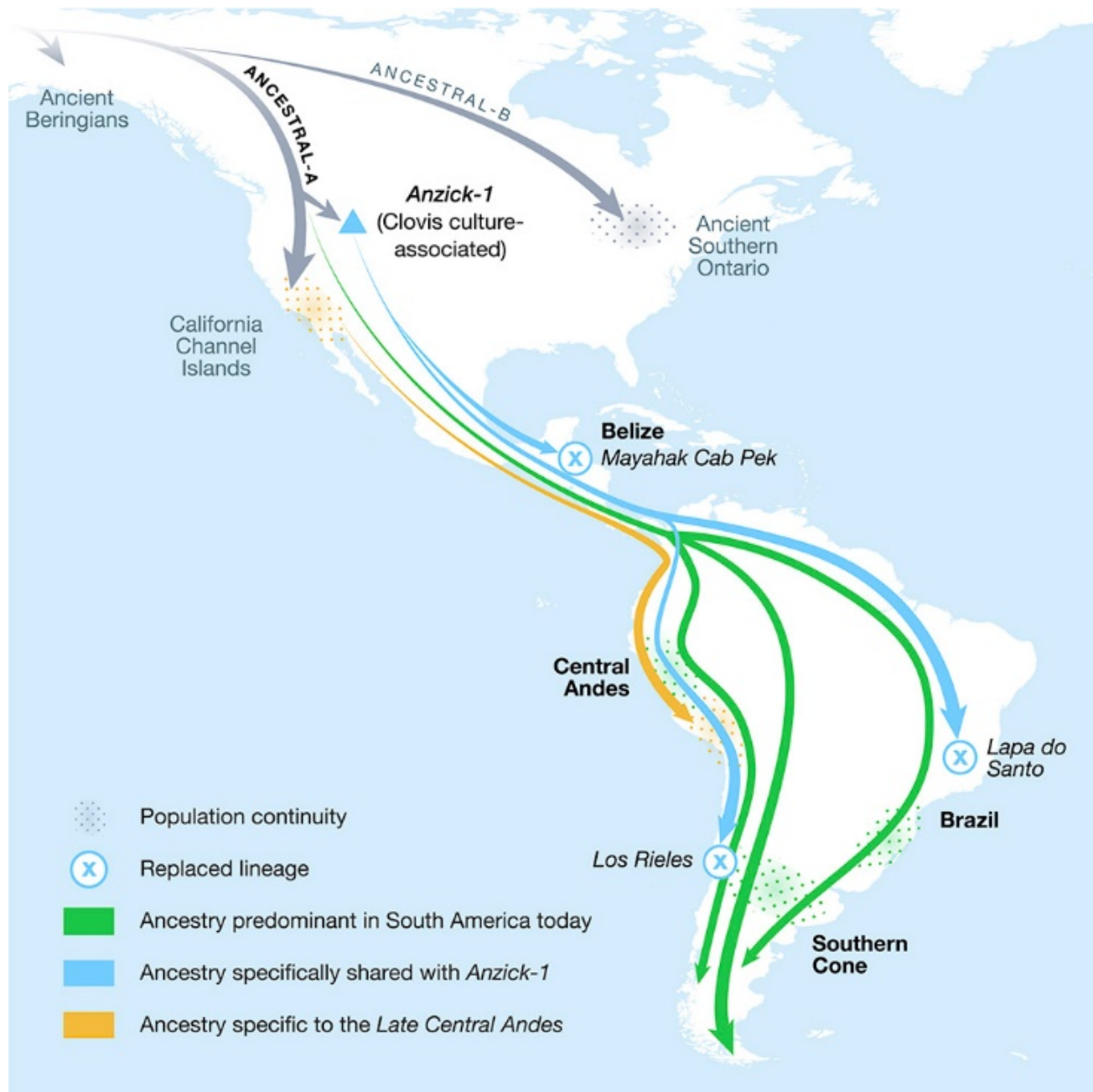
O sequenciamento de genomas ou trechos de genomas de diferentes indivíduos de diferentes grupos étnicos em diferentes regiões do mundo tem permitido **a reconstrução das grandes migrações do ser humano pelo planeta**, remontando há milhares de anos atrás. Nos próximos 2 slides apresento duas dessas reconstruções



Y-DNA Human Migration (Haplogroups)

Thousands of Years Ago

A	60	I	25	O	35
B	50	J1	25	O3	10
CR	50	J2	20	P	35
D	50	G	20	Q	20
C	50	H	30	Q3	10
E	50	K	40	R1	30
E3a	20	L	30	R1a	10
E3b	30	M	10	R1b	25
F	45	N	10		



Medicina personalizada (ou medicina de precisão)

- **tamoxifen** é uma droga que costumava ser prescrita para mulheres com câncer de mama
- observação empírica: **não funcionava** para **65% das mulheres**
- motivo: mulheres com uma **mutação no gene CYP2D6** não conseguem produzir **a proteína que processa a droga**
- hoje em dia: verifica-se por PCR + sequenciamento se a paciente tem essa mutação (antes de receitar a droga)

PCR ou sequenciamento?

- Embora essa pergunta seja comum, ela está **mal formulada**
- PCR é amplificação
- para sabermos o que contém a molécula amplificada, temos que **sequenciá-la**
- Então na verdade a pergunta deveria ser:
 - PCR de um pedaço seguido de sequenciamento desse pedaço
 - ou
 - sequenciamento do genoma inteiro?

Resposta

- PCR depende de molécula alvo, previamente conhecida (por exemplo, um gene de interesse)
- PCR+sequenciamento da molécula alvo é muito **mais barato** do que sequenciamento do genoma inteiro
- Mas sequenciamento do genoma inteiro fornece **muito mais informação**