

AMPLIFICAÇÃO DE DNA

(SIMULAÇÃO DE POLYMERASE CHAIN REACTION-PCR)

ATIVIDADE PARA SALA DE AULA

Ana Maria Bonetti^{1*}; Carlos Ueira Vieira²; Ana Carolina Silva Siquieroli¹

¹Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Genética, Campus Umuarama, Sala 2E22, 38 900-402 Uberlândia-MG, Brasil ; ²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, Grupo de Pesquisas em Abelhas/GPA, Av. André Araújo, 2936, Bairro Aleixo, 69 083-060 Manaus-AM

^{1*}Correspondência para Ana Maria Bonetti, ¹Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Genética, Campus Umuarama, Sala 2E22, 38 900-402 Uberlândia-MG, Brasil, ambonetti@hotmail.com

Palavras Chave: PCR, Amplificação, DNA

Introdução

A quantidade de DNA de uma amostra pode ser aumentada por clonagem em bactéria (à medida que a bactéria se multiplica, o DNA alvo multiplica-se também) ou por meio de uma reação chamada de Polymerase Chain Reaction - **PCR** (Reação em Cadeia da Polimerase) que ocorre fora de um ser vivo, em um equipamento chamado Termociclador. A PCR copia as duas fitas da seqüência de DNA desejada, aumentando a quantidade de DNA ou, como se diz em laboratório, amplificando o DNA alvo.

O processo envolve ciclos de variação na temperatura, de forma que , por **aquecimento**, as fitas de DNA são separadas; em seguida, a temperatura é **abaixada** para que os *primers* anelem-se ao DNA por complementariedade de bases. Novamente, a temperatura é **elevada** para que a enzima Taq DNA pol, em presença de outros fatores e dos dNTPs (nucleotídeos trifosfatados), copie a fita molde (que é o DNA que se deseja amplificar).

Objetivo

O objetivo dessa atividade é apresentar uma metodologia alternativa para a realização de uma aula prática sobre Genética Molecular, demonstrando como se processa a amplificação de DNA, por meio da simulação da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

(Polymerase Chain Reaction). Para desenvolvê-la, utiliza-se material bem simples.

MATERIAL:

· **fita dupla de DNA:** 02 tiras de cartolina ou papel cartão de 1m de comprimento por 5 cm de largura. Anotar nas fitas as bases nitrogenadas (veja Figura 1).

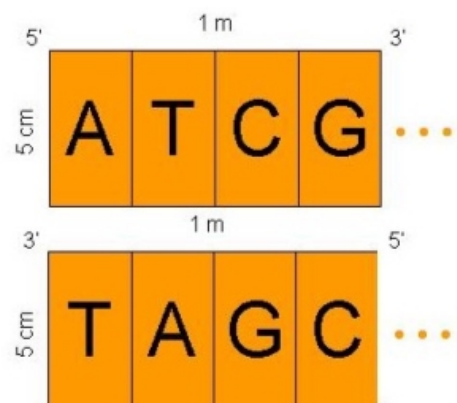


Figura 1.: Modelo para a fita dupla de DNA a ser utilizada na amplificação do DNA (completar a fita superior com as bases nitrogenadas que quiser e a inferior com suas complementares)

· **blocos de dNTPs** (nucleotídeos trifosfatados): corresponde às bases nitrogenadas que entram para a construção de uma nova fita de DNA. Recortar retângulos de 2,5 cm x 5 cm, em papel cartão. Anotar uma base nitrogenada em cada retângulo (Figura 2).

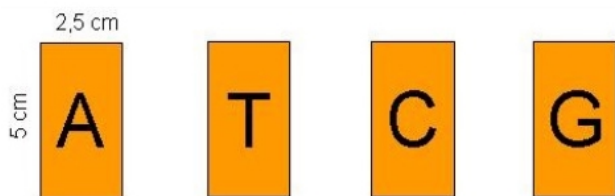


Figura 2. Modelo para blocos de nucleotídeos a serem utilizados na amplificação do DNA.

· **primers** (iniciadores): tiras de papel-cartão de 15 cm x 5 cm, com a seqüência dos *primers*. Exemplo na Figura 3.

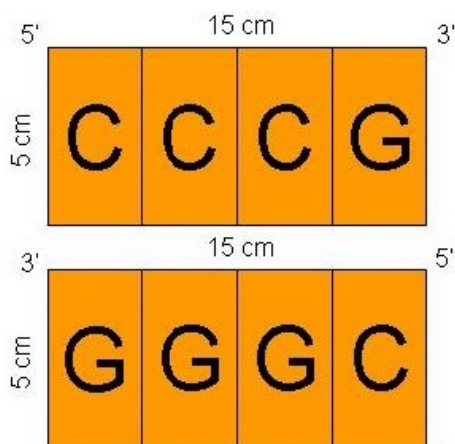


Figura 3. Modelo de *primer* (iniciador) a ser utilizado na amplificação do DNA (pode ser desenhado com maior número de bases).

Simulando o resultado do aquecimento, as fitas de DNA, que inicialmente estão pareadas (no chão ou sobre uma mesa) são separadas. Com o rebaixamento da temperatura, os *primers* anelam-se (ligar os *primers* às fitas já separadas). Com pequena elevação da temperatura, os desoxinucleotídeos vão sendo pareados um a um, nas fitas do DNA, por complementariedade das bases. Deve-se ir pareando os retângulos que representam os nucleotídeos, isso simula a atividade da Taq DNA polimerase, que vai processando o alongamento da nova fita até que novo ciclo seja iniciado e, novamente, ao ser elevada a temperatura, as fitas separam-se; ao rebaixamento da temperatura, os *primers* pareiam-se e, com outra elevação da temperatura, os desoxinucleotídeos vão sendo pareados. Assim, novas fitas de DNA são produzidas a cada ciclo.

A quantidade de DNA dobra a cada ciclo. Após 25 a 40 ciclos de amplificação (elevação e abaixamento da temperatura) são obtidas bilhões de cópias do segmento do DNA de interesse, material que pode, então, ser examinado com facilidade e ser utilizado para vários pro-

pósitos (identificar pessoas, analisar molecularmente animais, vegetais, identificar criminosos, etc).

Verificando o entendimento

Com o material que se tem em mãos, produzir 08 moléculas de DNA e conferir quantos ciclos foram feitos. Perguntar: para se obter 16 moléculas de DNA, quantos ciclos deveriam ter ocorrido?

SABENDO MAIS

Taq DNA pol: é uma enzima extraída de bactéria (*Thermus aquaticus*) e que suporta altas temperaturas, inclusive as temperaturas a que deve ser submetida no equipamento para que se processe a amplificação do DNA.

Primer: é uma seqüência de ácido nucléico (DNA ou RNA) que pareia suas bases à fita molde (DNA) por complementariedade (anelamento) para que sua extremidade 3'OH livre sirva de início para a nova fita de DNA que será sintetizada. Sem esse “ganchinho” do 3'OH do *primer*, o nucleotídeo do DNA não consegue entrar para dar início à nova fita.

Nucleotídeo: molécula composta por uma base nitrogenada, um açúcar pentose e um grupo fosfato; é a unidade estrutural dos ácidos nucléicos (DNA e RNA).

Desoxinucleotídeo: nucleotídeo que participa da formação da molécula de DNA

Em um experimento desse tipo, em laboratório, sempre deve haver um **Controle**, que é um tubo com todos os ingredientes necessários à amplificação, menos o DNA de interesse e no qual não deve aparecer DNA algum, ao final da reação. Essa é a forma de se garantir que o experimento não foi contaminado. Se não foi colocado DNA para amplificar e apareceu DNA ao final, de onde ele veio? Não foi do experimento, nem estava em questão a obtenção desse DNA, logo, foi uma contaminação, certamente, por falta de cuidado, de limpeza, de atenção e, se o experimento foi contaminado, deve ser começado novamente.

Bibliografia recomendada :

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T & MILLER, J.H. (2006). **Introdução à Genética**. Trad. de Paulo Armando Motta. 8ª ed., Rio de Janeiro-RJ, Guanabara Koogan

KREUZER, H. & MASSEY, a. (2002). **Engenharia Genética e Biotecnologia**. 2 ed., Porto Alegre-RS, ARTMED

LEWIN, B. (2001). **Genes VII**. Trad. Henrique Ferreira & Giancarlo Pasquali. Porto Alegre-RS, ARTMED EDITORAL TDA.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSSKY, S.L. & DARNELL, J. (2004). **MOLECULAR CELL BIOLOGY**. 5ª. ed., USA, W.M. FREEMAN AND COMPANY

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M.J. (2001). **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro-RJ, Guanabara Koogan