

## **Anexo II – Cálculo da Tm e Ta dos primers**

Existem várias fórmulas disponíveis para o cálculo da  $T_m$  (melting Temperature). A equação 1 é válida para primers com menos de 14 bases.

$$T_m (^{\circ}C) = 2(A + T) + 4(G + C) \quad \text{Equação 1}$$

(Suggs *et al.*, 1981; Thein and Wallace, 1986)

Para primers de maior comprimento, utiliza-se:

$$T_m (^{\circ}C) = 64,9^{\circ}C + \frac{41^{\circ}C \cdot (G + C - 16,4)}{N} \quad \text{Equação 2}$$

Onde N = nº total de nucleótidos.

Como os primers usados neste trabalho têm entre 20 e 25 nucleótidos, utilizou-se a equação 2 para calcular a  $T_m$ . Para obter o valor da  $T_a$  (*annealing temperature*), subtraiu-se 5°C à  $T_m$ .

Primers	Sequência (5' → 3')	Nº de:				Nº nucleótidos	% G e C	Tm (°C)	Ta (°C)
		A	T	G	C				
$\alpha$ -Sense	AGA GGA ACC TGG GAG CTG TG	5	3	9	3	20	60,00	55,88	50,88
$\alpha$ -AntiSense	CGT ATT TGT AGT TTC CTG TAT TCT C	3	13	4	5	25	36,00	52,76	47,76
$\beta$ -Sense	TTC ACA GGC CCT TTG GAG ACG	4	5	6	6	21	57,14	56,31	51,31
$\beta$ -AntiSense	CTT GGG GGC CCG GGC TGC TG	0	4	10	6	20	80,00	64,08	59,08

Assim, para os primers da cadeia  $\alpha$ , a  $T_a \approx 48^{\circ}C$  e para a cadeia  $\beta$ ,  $T_a \approx 51^{\circ}C$ . Estes valores serviram como base para iniciação dos ensaios. Antes da otimização do PCR neste trabalho, a  $T_a$  óptima era de 60°C, tendo sido esta temperatura encontrada experimentalmente.

Aquando a otimização do PCR (neste trabalho), testaram-se temperaturas mais baixas que 60°C já que as  $T_a$  encontradas eram bastante mais baixas que a utilizada na altura.