



Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética

Atividades de Laboratório

2º Semestre 2024

Docente:

Felipe Chambergo (fscha@usp.br) - <https://sites.usp.br/lbbp>

Monitores:

Augusto Roldan Gonçalves - augusto.roldan@usp.br

Henrique dos Santos Hernandes - hernandesrique@usp.br

Servidores não-docentes:

Tec. Pedro Manoel dos Santos - pedroms@usp.br

Créditos: 4

Período: Quinta-feira (14h00 -18h00), Laboratório de Biotecnologia – Edifício A2, 1º andar

USP - 2024

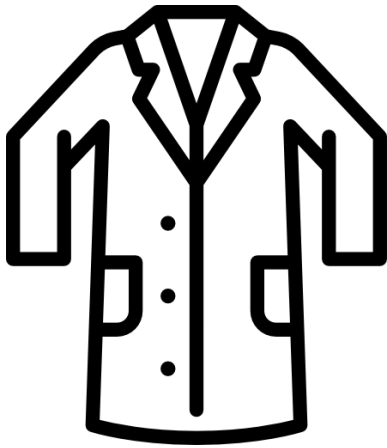
Aviso

Atividades no laboratório poderão ser gravadas e/ou fotografadas. Eventuais imagens captadas poderão ser armazenadas e utilizadas para veiculação e/ou divulgação na mídia em geral, escrita, falada, televisiva ou eletrônica de difusão e transmissão por qualquer meio de comunicação, pela Coordenação do Curso de Biotecnologia, em território nacional ou internacional. Cede-se pelo(a) discente, a título gratuito, autorização que abrange todos os direitos relacionados à veiculação de imagem e som.

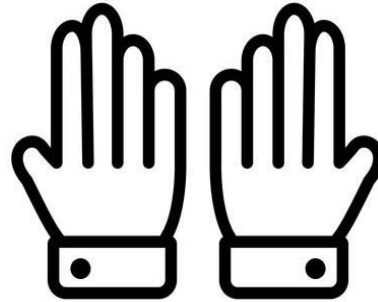
Objetivos

- a) Contribuir para o desenvolvimento de habilidades técnicas, quali e quantitativas, relacionadas às bases da Engenharia Genética para o estudo de biomoléculas: DNA, RNA e proteínas;**
- b) Propiciar um ambiente de trabalho de ensino e pesquisa laboratorial;**
- c) Despertar no aluno raciocínio científico e crítico, capacitando-o a integrar o conhecimento adquirido, para explorar o potencial fisiológico e molecular dos seres vivos em relação aos processos biotecnológicos.**
- d) Aumentar o interesse pela pesquisa desenvolvida em laboratório.**

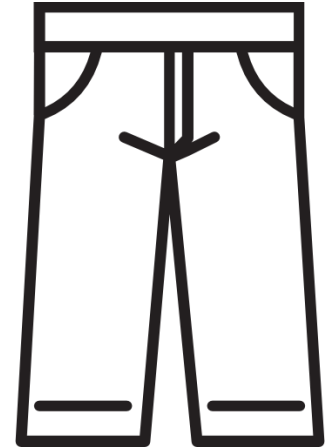
POR RAZÕES DE SEGURANÇA É OBRIGATÓRIO



**Avental abaixo do joelho e
de mangas compridas**



Luvas



Calça comprida



Cabelo preso



Sapato fechado

Obrigatório uso de jaleco de mangas compridas em bom estado.

A não observação desse item implica em falta do estudante e impossibilidade de realização da atividade prática do período.

Normas durante as atividades no laboratório:

- Utilizar de forma adequada e, em todo momento, avental e, durante o trabalho, luvas.
- Seguir as indicações e orientações dos monitores, do técnico e do professor.
- Utilizar, de forma adequada e com supervisão do monitor ou professor, reagentes, material e equipamentos.
- Descartar reagentes e material usado em local específico.
- Manter a ordem em todo momento, não consumir alimentos, bebidas ou fumar no laboratório.
- Limpar e cuidar do material utilizado e da bancada de trabalho.
- Em caso de dúvida, solicitar esclarecimentos ao monitor ou ao professor.
- Todo material biológico ou contaminado, antes de ser descartado, deverá ser esterilizado por autoclavagem.

Avaliação

Formas: Relatório de atividades de laboratório + monografia, Seminário e prova escrita.

Critérios:

Médias das notas de:

- 1) Relatório de atividades de laboratório, Grupo (10%) +
- 2) Seminário, Grupo (10%) +
- 3) Prova escrita individual (80%).

A aprovação será obtida quando a nota for igual ou superior a 5,0; nota entre 3 e 4,9 habilita o aluno a fazer **prova** de recuperação; nota abaixo de 3, leva à reprovação. Os alunos serão avaliados pela frequência em todas as atividades da disciplina.

Norma de Recuperação: Os alunos que tiverem média entre 3 e 4,9 e frequência acima de 75% terão o direito de fazer prova escrita de recuperação. A soma da média final mais a nota da prova de recuperação deve ser igual a dez para o aluno ser aprovado.

Estratégias Didáticas

Atividades laboratoriais e aulas expositivo-dialogadas.

DATA	Atividade	Docentes
08/08	Apresentação da disciplina e do laboratório. Regras e conduta no laboratório. Organização dos grupos Instruções para as atividades: Relatório, Seminários, Prova. Treino de manuseio de pipetas e pipetagem (exercício)	Felipe
15/08	Análise de Bioinformática: ferramentas computacionais (sequência de aminoácidos, <u>cDNA</u> e desenho de primers)	Felipe
22/08	Extração de DNA genômico (células eucarióticas e procarióticas), <u>plasmidial</u> e Proteínas	Felipe
29/08	Amplificação de Ácidos Nucleicos: PCR (DNA polimerase) e RT-PCR (Transcriptase reversa). Quantificação espectrofotométrica de biomoléculas	Felipe
02-07/09	Recesso Escolar - Semana da Pátria	
12/09	Separação de biomoléculas por eletroforese: Análise em gel de agarose/poliacrilamida	Felipe
19/09	DNA recombinante: Sistemas Procarióticos: Vetores de Clonagem e Expressão. Enzimas utilizadas em Clonagem molecular. Transformação de células competentes	Felipe
26/09	Seleção de clones recombinantes (Resistência à antibióticos) Confirmação dos clones positivos (PCR) Eletroforese em gel de agarose	Felipe
03/10	Proteína Recombinante: Crescimento bacteriano e indução para expressão de proteína recombinante	Felipe
10/10	Proteína Recombinante: Lise bacteriana e Análise das proteínas por SDS-PAGE Determinação de atividade enzimática	Felipe
17/10	Purificação de Proteína Recombinante e Determinação de atividade enzimática: Enzima Acetil Esterase: Purificação e atividade	Felipe
24/10	Determinação de atividade da enzima fosfatase alcalina Determinação de atividade da enzima acetil <u>esterase</u>	Felipe
31/10	Determinação de atividade enzimática por <u>Zimograma</u> Atividade Enzima Catalase Aplicação Biotecnologia	Felipe
07/11	BioLinker	Felipe
14/11	Seminários	Felipe
21/11	<u>Imunodeteção</u> de proteínas I (Western Blotting)	Felipe
28/11	<u>Imunodeteção</u> de proteínas II (Western Blotting)	Felipe
05/12	Prova Escrita de laboratório Entrega do relatório de laboratório - Grupo	Felipe

Bibliografia básica

1. Ausubel, Frederick M, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith. Current Protocols in Molecular Biology. 2003. Kevin Struhl (eds.) John Wiley & Sons, Inc.
 2. Dixit, R; Bisen, K; Kumar, A; Borah, A e Keswani, C. .LAB MANUAL ON MOLECULAR BIOLOGY, First Edition : 2016. ISBN : 978-81-909182-7-5, Published by : Media Associates J-281/86, Kartar Nagar, Delhi-110053, India.
 3. Green, Michael R., Howard Hughes Medical Institute, University of Massachusetts Medical School; Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition). 2012 • 2,028 pp., ISBN 978-1-936113-42-2
 4. Wilson, K and John Walker (Eds). Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 2010. 7th ed. Cambridge University Press The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK. ISBN 978-0-521-51635-8 (hardback)
 5. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4th Edition, www.molecularcloning.org. Cold Spring Harbor Protocols, www.cshprotocols.org (WEBSITE).
- Leitura de artigos.
 - Protocolos fornecidos pelos fabricantes dos kits e reagentes utilizados nas atividades práticas.

MOLECULAR CLONING NEW EDITION

A Laboratory Manual

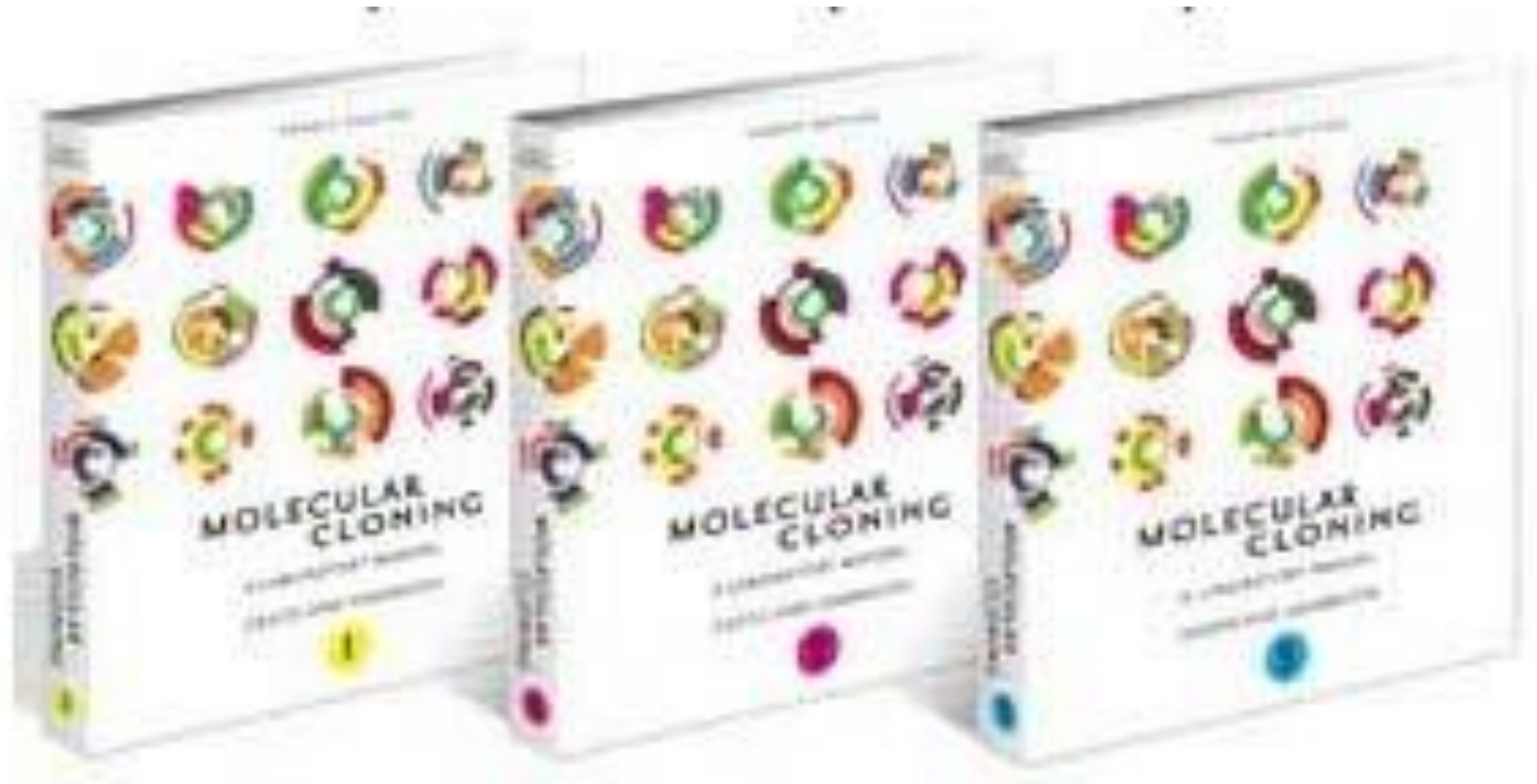
By Michael R. Green and Joseph Sambrook



Cold Spring Harbor Laboratory Press

A Book Preview Site for Molecular Cloning 4th Edition

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)



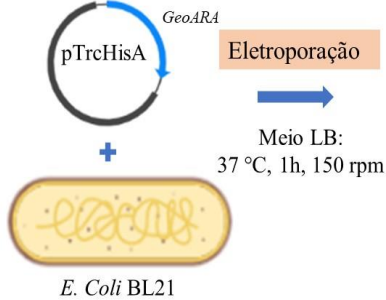
Relatório de atividades de laboratório: Cada grupo deverá entregar, no dia 05/12/2024, relatório correspondente **as atividades práticas desenvolvidas**, contendo: **breve introdução sobre o tema, objetivos, resultados, discussão/conclusão e bibliografia conforme norma ABNT.**

Formação dos Grupos

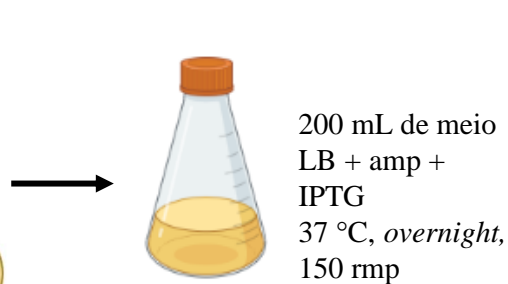
8 grupos de 6/7 estudantes

Biodiversidade

1 Transformação e Seleção



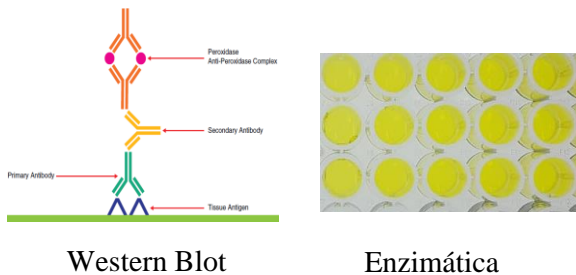
2 Produção da Proteína



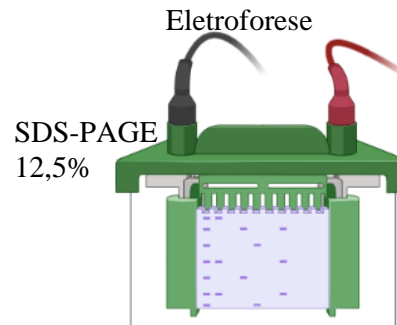
3 Lise celular



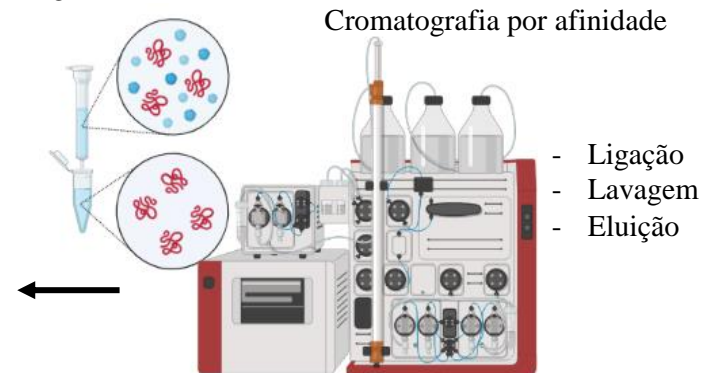
6 Análise de atividade



5 Análise da purificação



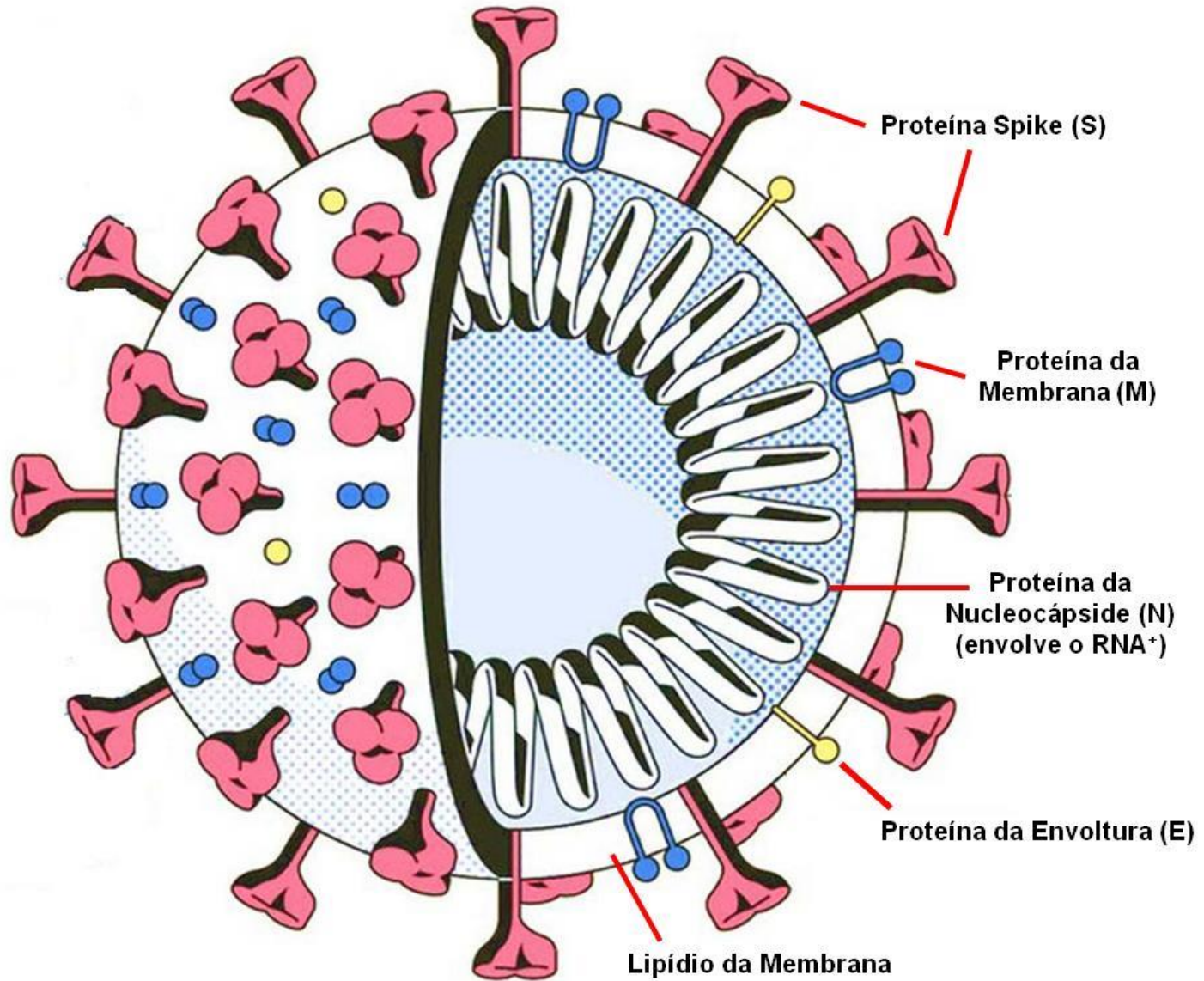
4 Purificação



Aplicação Biotecnológica

Regulação
Ética
Comercio

SARS-CoV-2

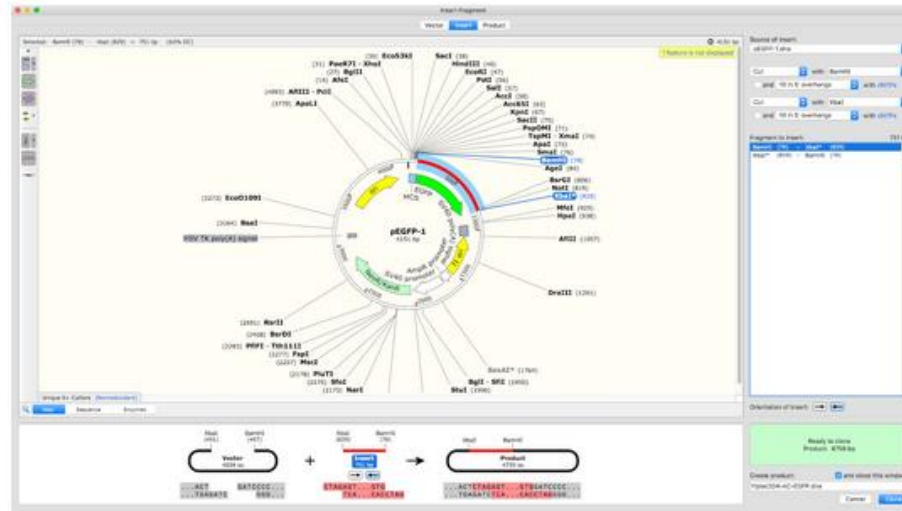


SnapGene Viewer

<https://www.snapgene.com/>

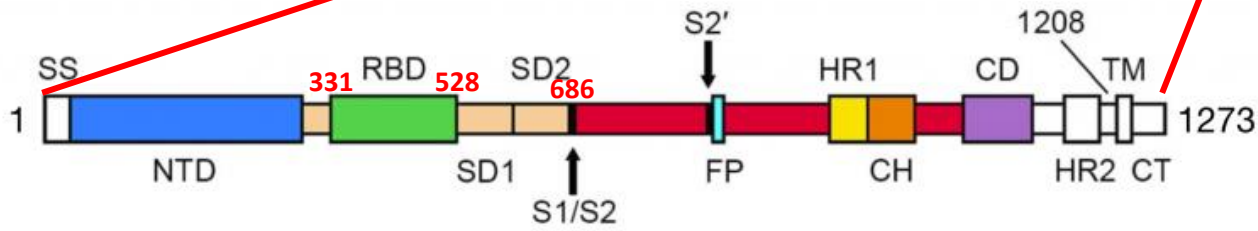
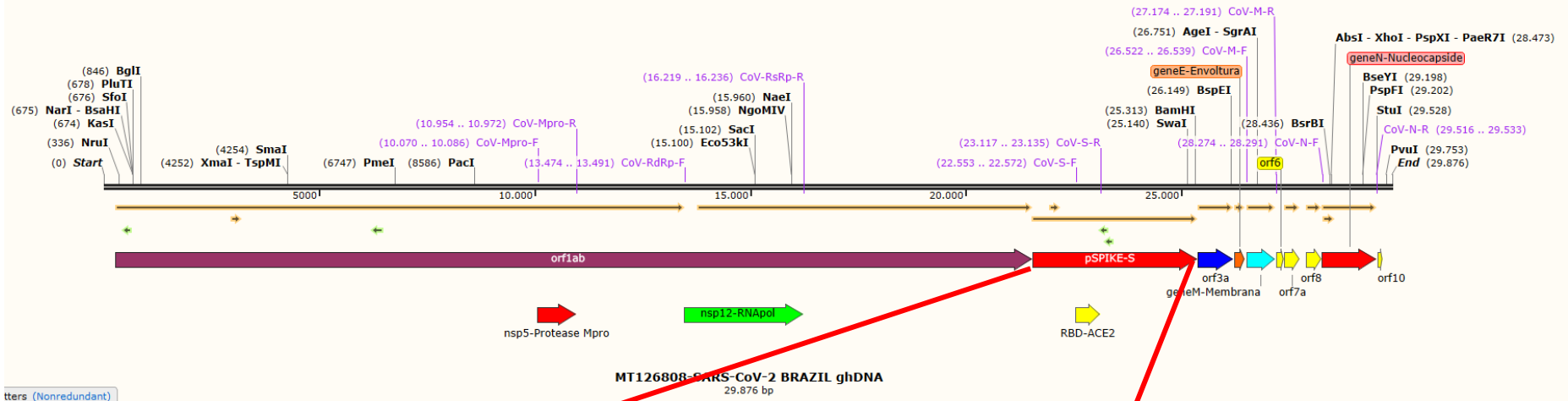
Beyond the Basics of Molecular Cloning

SnapGene is the most popular cloning tool for a reason. It's fast, smart and extremely user-friendly



- Intuitive technology identifies design flaws in cloning procedures so they can be corrected
- Simulate standard PCR using your own primers, or allow SnapGene to design them automatically
- Specialised cloning tools ensure fast accurate construct design for all major molecular cloning techniques

GenBank: MT126808 SARS-CoV-2 - Brasil



SS - signal sequence
 NTD - N-terminal domain
 RBD - receptor-binding domain
 SD1 - subdomain 1
 SD2 - subdomain 2
 S1/S2 = S1/S2 protease cleavage site
 S2' = S2' protease cleavage site

FP = fusion peptide
 HR1 = heptad repeat 1
 CH = central helix
 CD = connector domain
 HR2 = heptad repeat 2
 TM = transmembrane domain
 CT = cytoplasmic tail

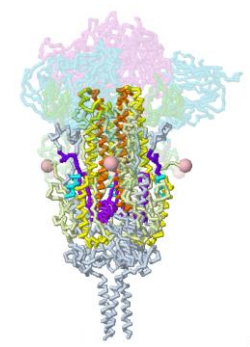
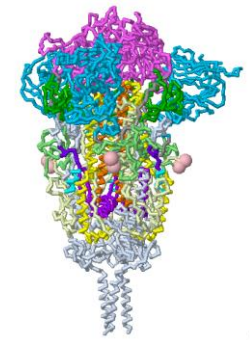


Figure adapted from Wrapp et al. 2020

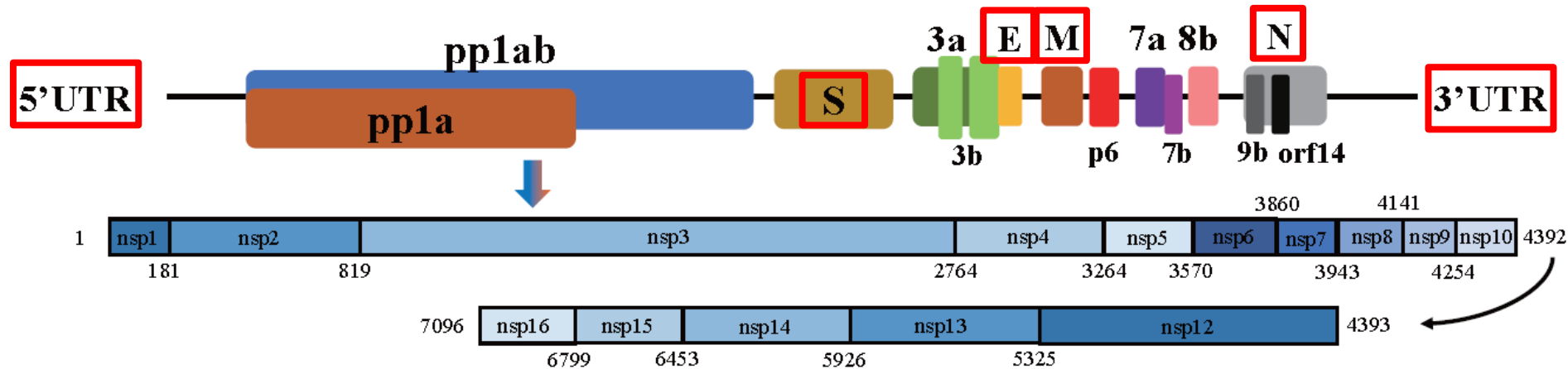
Jmol

Jmol

SARS-CoV-2 Genoma

A

IVDC-HB-01/2019 (~29.8kb)



O genoma **de ~30 kb**, codifica para **~14 ORFs**, com a seguinte ordem:

5' - UTR 265 nucleotídeos (nt)-ORF1ab (codifica 16 proteínas não estruturais, nsp) - proteína Spike (**S**) - ORF3a-ORF3b-proteína do envoltório (**E**); proteína da membrana (**M**)-ORF6-ORF7a--ORF7b- ORF8-proteína do nucleocapsídeo (**N**)---ORF9b-ORF9c-ORF10(14)-229 nt UTR **-3'**

Os genes S, E, M e N codificam proteínas estruturais, sendo a proteína S a responsável pela ligação ao receptor Enzima Conversora da Angiotensina 2 (ECA 2) em humanos.

SARS-CoV-2 Genome and Proteins

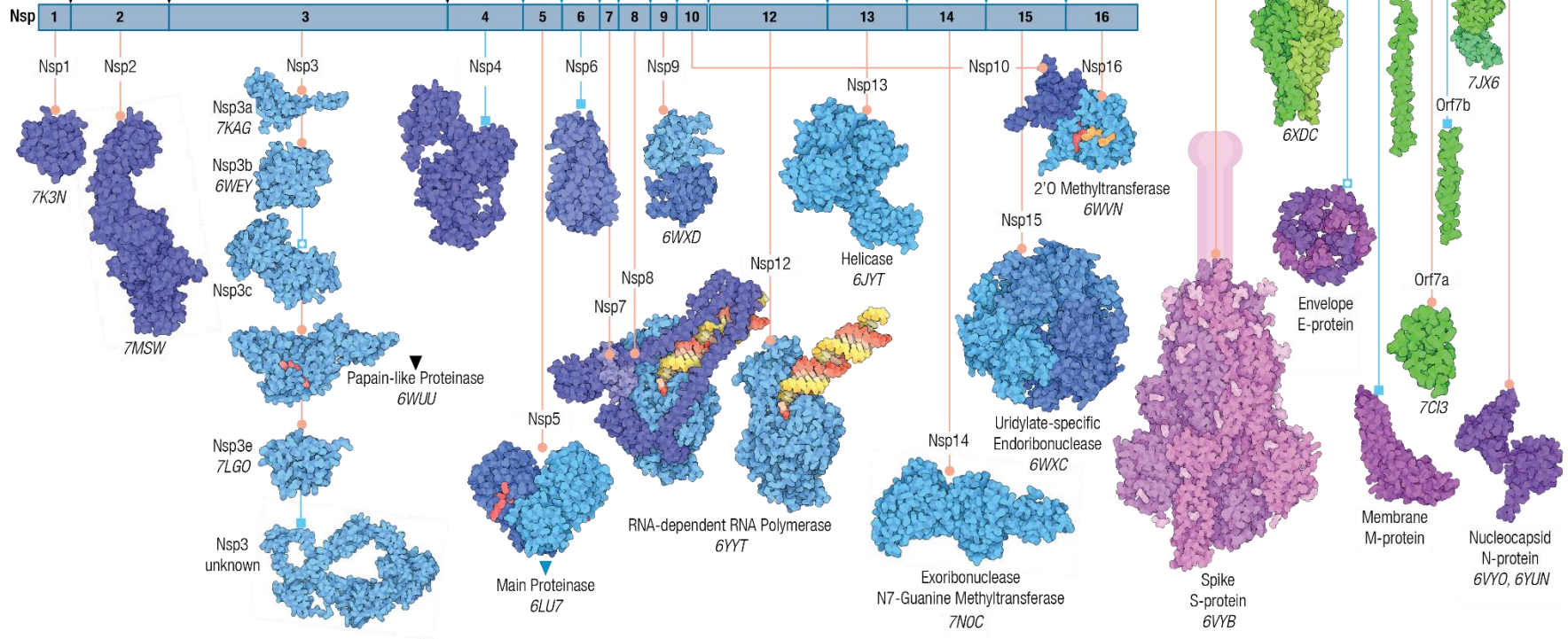
Genome Position



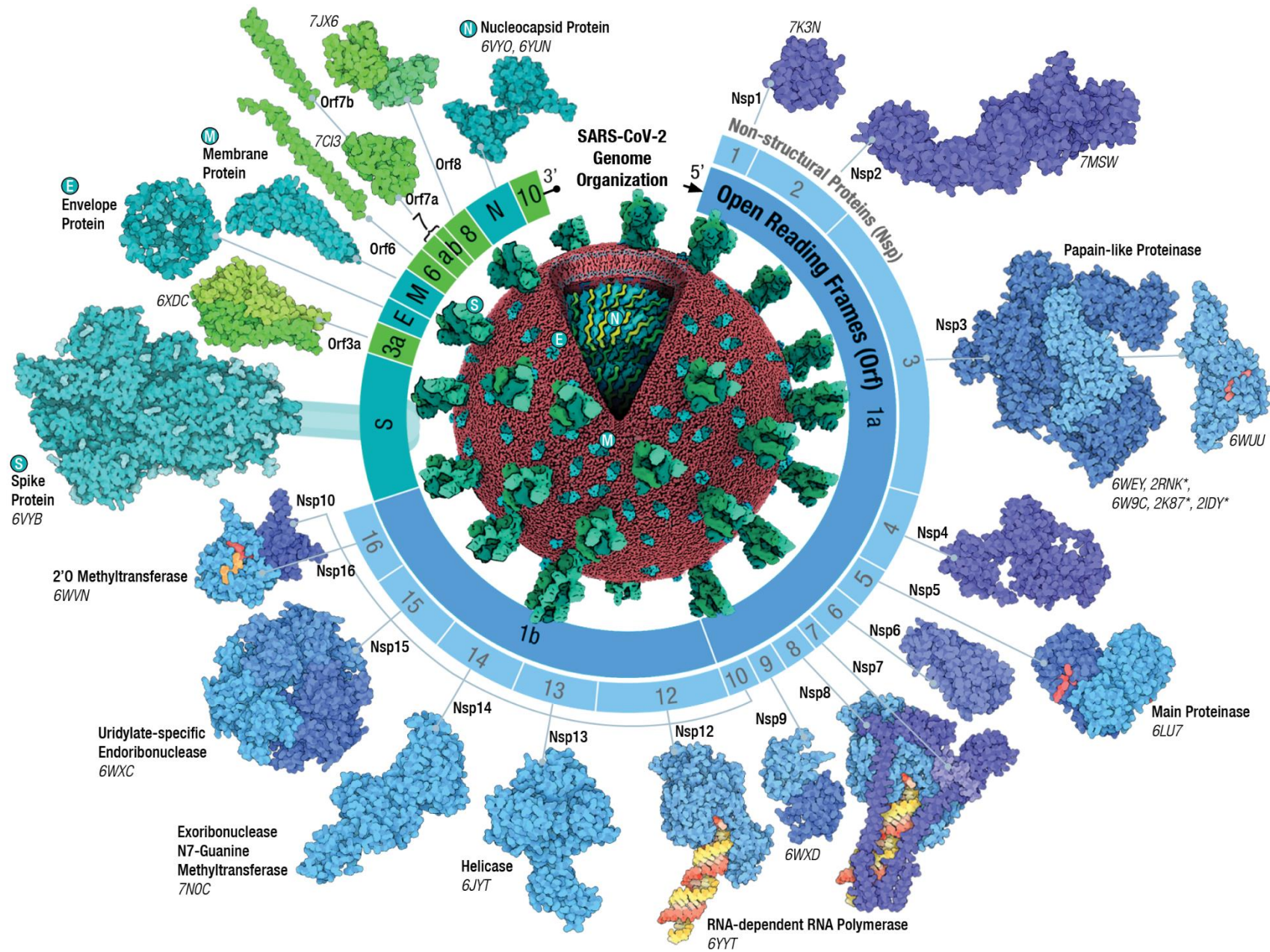
Open Reading Frames (Orf)



Non-Structural Proteins (Nsp)



| Experimentally-determined SARS-CoV-2 structure with PDB ACCESS CODE provided
| De Novo model
| Homology model
| © Denotes N7-methyl Guanine Cap
| AAAAA Denotes Poly-A Tail



SARS-CoV-2 - Transdução

Protein	Mol. weight (kDa)	Seq. similarity with SARS-CoV	Description
Nsp1	19.8	91.1%	Suppresses host antiviral response
Nsp2	70.5	82.9%	
Nsp3	217.3	86.5%	Nsp3-Nsp4-Nsp6 complex involved in viral replication
Nsp4	56.2	90.8%	Nsp3-Nsp4-Nsp6 complex involved in viral replication
Nsp5	33.8	98.7%	Main protease (3C-like)
Nsp6	33.0	94.8%	Nsp3-Nsp4-Nsp6 complex involved in viral replication
Nsp7	9.2	100.0%	Nsp7-Nsp8 complex is part of RNA polymerase
Nsp8	21.9	99.0%	Nsp7-Nsp8 complex is part of RNA polymerase
Nsp9	12.4	98.2%	ssRNA binding
Nsp10	14.8	99.3%	Essential for Nsp16 methyltransferase activity
Nsp11	1.3	92.3%	Short peptide
Nsp12	106.7	98.3%	RNA polymerase
Nsp13	66.9	100.0%	Helicase/triphosphatase
Nsp14	59.8	98.7%	3'-5' exonuclease
Nsp15	38.8	95.7%	Uridine-specific endoribonuclease
Nsp16	33.3	98.0%	RNA-cap methyltransferase
S	141.2	87.0%	Spike protein, mediates binding to ACE2
Orf3a	31.1	85.1%	Activates the NLRP3 inflammasome
Orf3b	6.5	9.5%	
E	8.4	96.1%	Envelope protein, involved in virus morphogenesis and assembly
M	25.1	96.4%	Membrane glycoprotein, predominant component of the envelope
Orf6	7.3	85.7%	Type I IFN antagonist
Orf7a	13.7	90.2%	Virus-induced apoptosis
Orf7b	5.2	84.1%	
Orf8	13.8	45.3%	
N	45.6	94.3%	Nucleocapsid phosphoprotein, binds to RNA genome
Orf9b	10.8	84.7%	Type I IFN antagonist
Orf9c	8.0	78.1%	
Orf10	4.4	-	

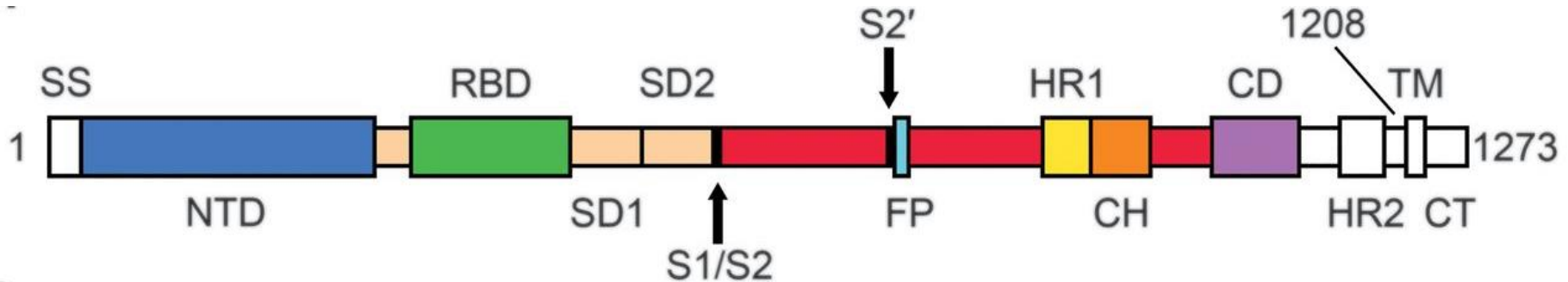
Alvo para Inibidor
Alvo para Vacina

Alvo para Inibidor
Alvo para Vacina

Alvo para Inibidor
Alvo para Vacina

Alvo para Inibidor
Alvo para Vacina

Proteína S



Schematic of 2019-nCoV S primary structure colored by domain. Domains that were excluded from the ectodomain expression construct or could not be visualized in the final map are colored white. SS, signal sequence; S2', S2' protease cleavage site; FP, fusion peptide; HR1, heptad repeat 1; CH, central helix; CD, connector domain; HR2, heptad repeat 2; TM, transmembrane domain; CT, cytoplasmic tail. Arrows denote protease cleavage sites.

Seminário

- O seminário será apresentado de forma oral (15 minutos + 5 de perguntas) e deve seguir a estrutura: título, introdução e justificativa, objetivos, material e métodos, resultados e discussão, perspectivas, e bibliografia segundo a norma ABNT. Apresentação em formato Power Point.
- Será avaliada a apresentação, desenvolvimento, participação de cada integrante, o conteúdo, o respeito ao tempo e participação na fase de perguntas.
- O arquivo com o seminário apresentado deve ser entregue no dia da sua apresentação, juntamente com um documento contendo o título e o nome dos integrantes do grupo

Reconhecimento do Laboratório

- Regras gerais
- Equipamentos: Autoclave, Fluxo laminar, Termociclador e outros
- Treino de manuseio de pipetas e pipetagem (exercício)

Micropipeta

Micropipeta monocal: esse tipo de pipeta possui um êmbolo que permite sugar os líquidos. Além disso, essa pipeta necessita da utilização de tips, ponteiros adequadas e específicas para determinados volumes, que são selecionados pelo usuário no momento da pipetagem. Geralmente, essas pipetas permitem transportar no máximo 5 ml por pipetagem e são muito usadas quando é necessária uma quantidade muito pequena de determinado fluido.

Micropipeta multicanal: essa pipeta possui basicamente as mesmas funções da pipeta monocal, com o adicional de permitir a utilização de diversas ponteiros por pipetagem.

Micropipeta digital: as pipetas digitais cumprem o mesmo papel das automáticas, mas em contrapartida, seu volume é selecionado de forma digital, através de seu display acoplado.









Autoclave

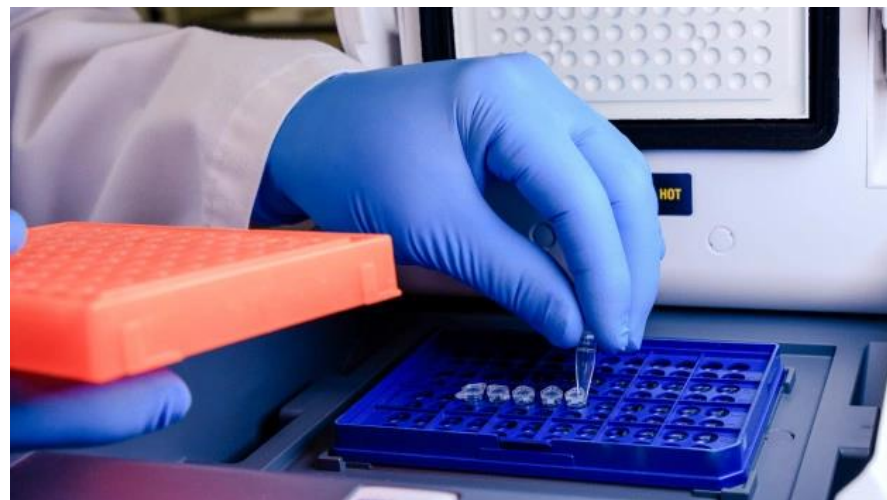


Procedimento:

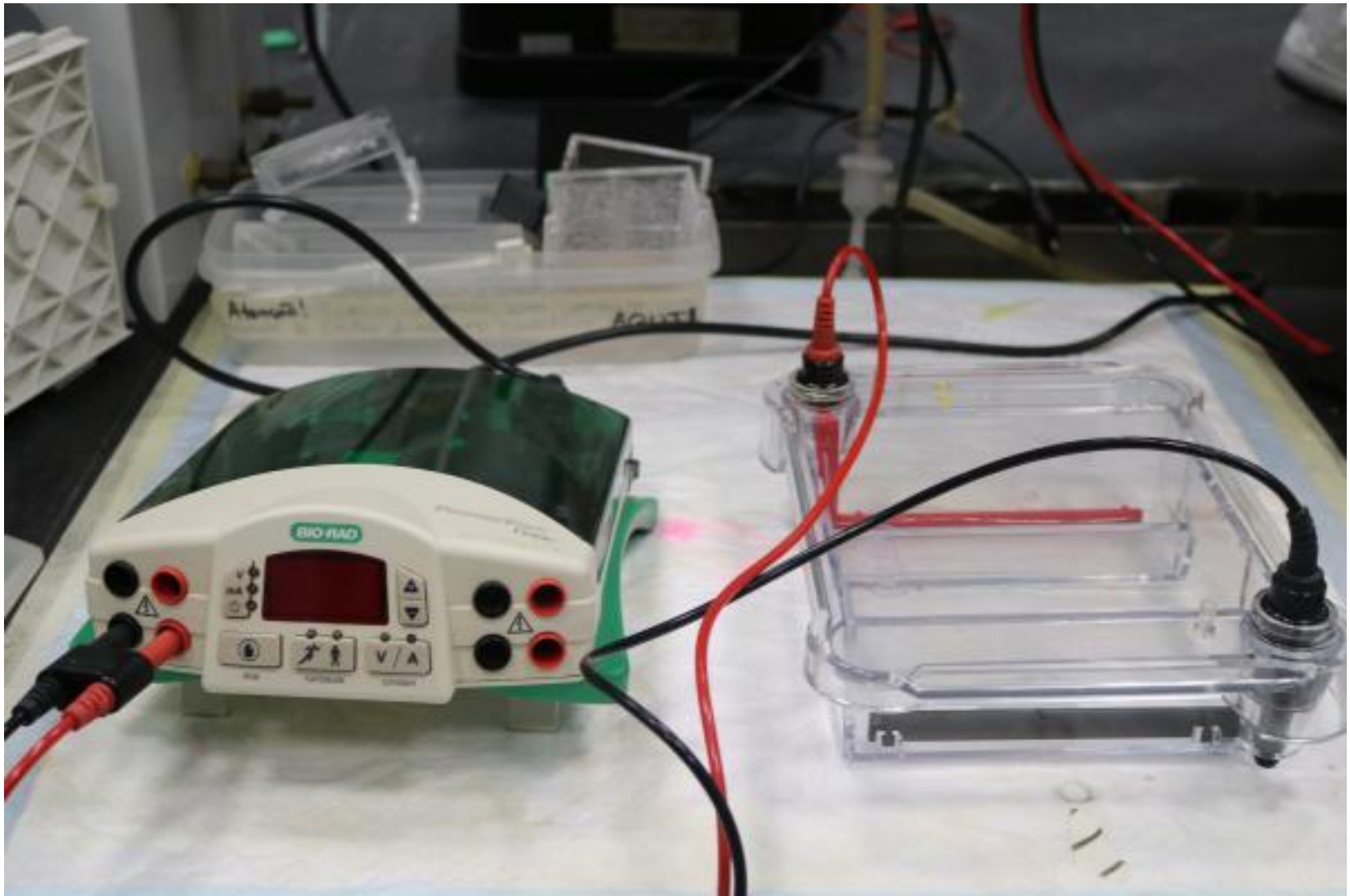
- Coloque os materiais na autoclave;
- Feche e sele a tampa;
- Ligue-a no máximo e quando começar a sair vapor, feche a válvula;
- Espere a temperatura atingir 121°C;
- Uma vez nessa temperatura, mude para o médio e deixe 15 minutos;
- Após o período, desligue a autoclave e abra a válvula para o vapor sair;
- Só abra a tampa depois que o manômetro estiver no zero;
- Retire o material com luvas resistentes ao calor.



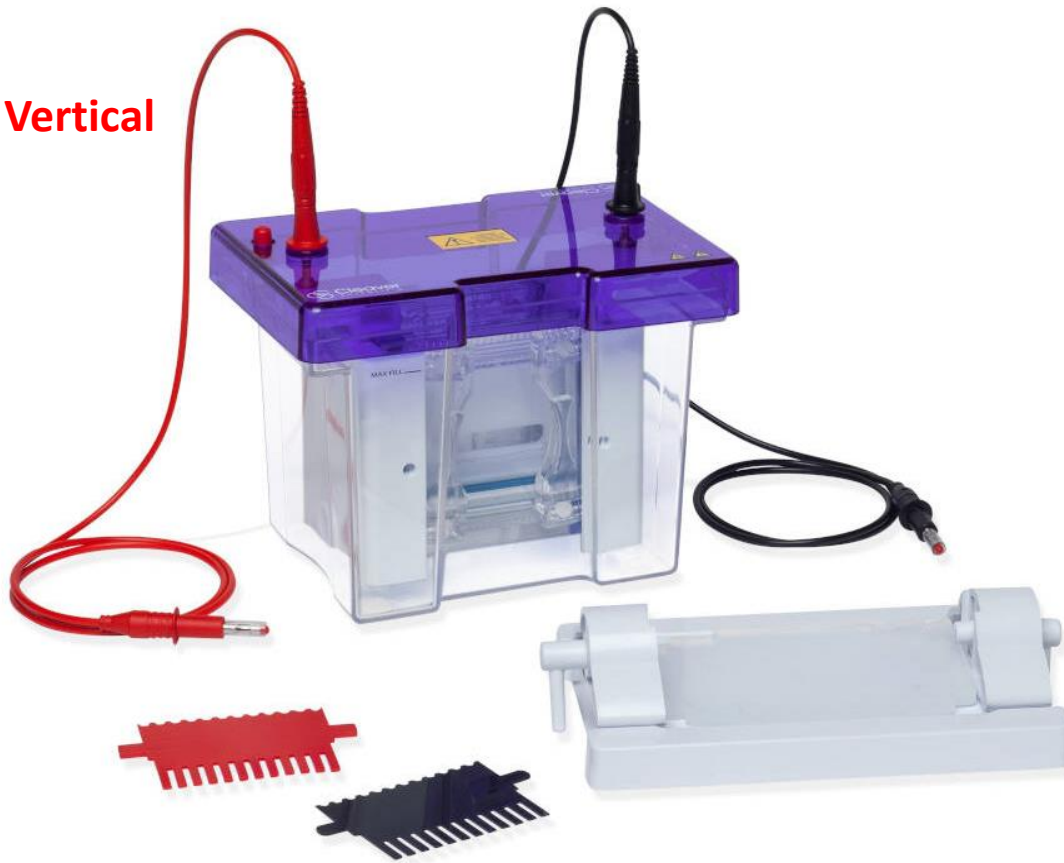
Termociclador



SISTEMA DE ELETROFORESE



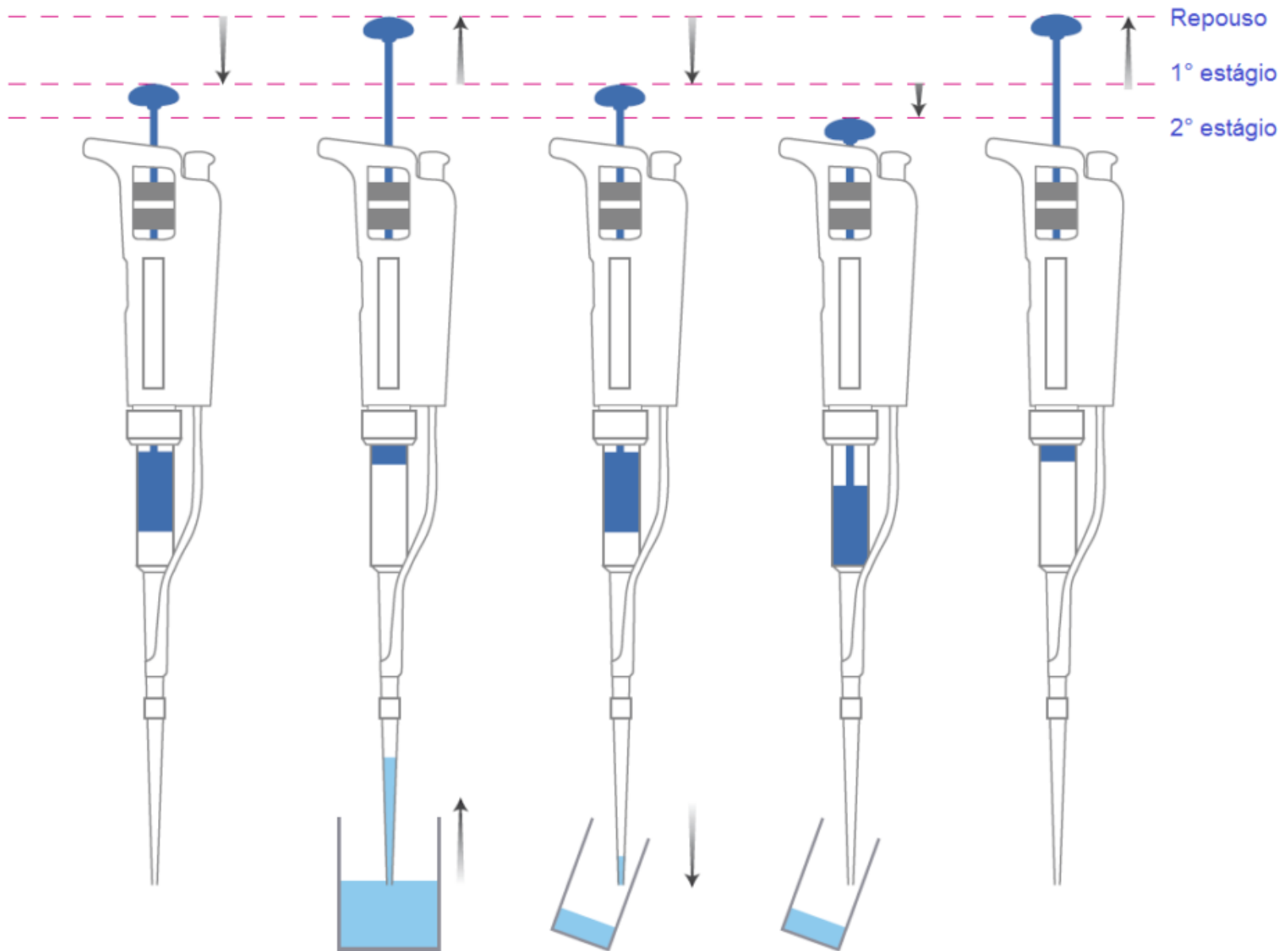
Vertical



Transiluminador



Treino de Pipetagem utilizando solução corante



Aqui estão alguns dos erros mais comuns nas técnicas de pipetagem e como evitá-los.

1. Profundidade incorreta de imersão da ponteira

A profundidade correta de imersão da ponteira pode aumentar a precisão em até 5%. A ponteira deve ser imersa entre 1–2 mm, para pipetas de microvolume, e até 3–6 mm para pipetas normais, dependendo do tamanho da ponteira. Se a ponteira for imersa demais, o volume do gás na ponteira será comprimido, fazendo com que muito líquido seja aspirado.

3. Dispensação inconsistente

É possível obter maior precisão e reprodutibilidade para cada amostra certificando-se de que a última gota restante seja totalmente dispensada e não adira à extremidade da ponteira. Para a maioria das aplicações, recomenda-se dispensar com a extremidade da ponteira que está contra a parede do recipiente, pois reduz ou elimina a quantidade remanescente da amostra na ponteira. Essa técnica pode aumentar a precisão em 1% ou mais.

5. Ritmo inconsistente da pipetagem

Use um ritmo de pipetagem consistente entre cada amostra. Evite se apressar ou executar operações rápidas e entre no ritmo para cada etapa do ciclo de pipetagem.

2. Ângulo incorreto de pipetagem

O ângulo de imersão da ponteira de sua pipeta na amostra deve ser o mais vertical possível e não deve desviar mais de 20 graus da vertical. Um ângulo mais horizontal faz com que muito líquido entre na ponteira, resultando em aspiração imprecisa. Por exemplo, em um ângulo de 30 graus em relação à vertical, até 0,7% pode ser aspirado excesso de líquido de até 0,7%.

4. Falha ao pré-enxaguar

Dispensar o líquido de uma pipeta deixa uma camada do líquido na ponteira, tornando o volume expelido um pouco menor do que realmente deveria ser. Ao pré-enxaguar uma nova ponteira pelo menos duas vezes com o líquido a ser usado, condicionará a parte interna da ponteira.



Obrigado

fscha@usp.br

USP – 2º Semestre 2024