

**Curso de Biotecnologia  
ACH5545 - Engenharia Genética  
Atividade de Laboratório**

**(29/08/2024)**

**Amplificação de Ácidos Nucleicos:  
PCR (DNA polimerase) e RT-PCR (Transcriptase reversa).**

**1- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

**Procedimento:**

1. Em um microtubo de 200 uL, fazer uma mistura dos componentes do Kit Enzima DNA polimerase com 2 ul da amostra de DNA, completar com água estéril a um volume final de 25 uL. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

<b>Componentes da mistura</b>	<b>Volume (uL)</b>
Tampão enzima 10x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2
Mistura dNTPs 10 mM	2
Primer F 10 µM	1
Primer R 10 µM	1
Enzima DNA polimerase	1
DNA molde (amostra, 0.01 pg-1 ug)	2
H <sub>2</sub> O (suficiente para volume final)	25

2. Centrifugar e misturar brevemente. Incubar o tubo, em termociclador com o seguinte programa:

<b>Etapa</b>	<b>Condição</b>
<b>a)</b> Desnaturação inicial	95°C - 15
<b>b)</b> Desnaturação Anelamento Extensão (Repetir todos os itens <b>b</b> - 35x)	95°C – 30 seg 48°C - 30 seg. 72 °C - 1 min.
<b>c)</b> Extensão final	72°C - 10 min.
<b>d)</b> Manter a reação	4°C

Realizar Eletroforeses de DNA e documentar os resultados.

## **2. Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)**

A Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), é um método laboratorial que utiliza a enzima transcriptase reversa, para a partir de RNA obter moléculas de do vírus em DNA complementar (cDNA).

### **2.1 Procedimento: RT-PCR, em simple etapa:**

1. Em um microtubo de 200 uL, fazer uma mistura dos componentes do Kit de RT-PCR com 1 uL da amostra de RNA, completar com água estéril a um volume final de 25ul. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

<b>Componentes da mistura</b>	<b>Volume (µL)</b>
Tampão de Reação 10x	2,5
RNA (amostra, 0.01 pg - 1 µg)	1,0
Mix dNTPs 10 mM	2
Primer F (10 µM)	1,0
Primer R (10 µM)	1,0
Mix de enzimas transcriptase reversa/DNA polimerase	2,0
H <sub>2</sub> O (suficiente para volume final)	25

2. Centrifugar e misturar brevemente. Incubar o tubo, em termociclador com o seguinte programa:

<b>a) Síntese de cDNA e Desnaturação inicial - 1 ciclo</b>	50°C - 30 min.
<b>b) Desnaturação Anelamento</b> Extensão (Repetir todos os itens <b>b</b> – <b>35 ciclos</b> )	95°C - 15 min. 48°C – 45 seg. 72 °C - 1 min.
<b>c) Extensão final - 1 ciclo</b>	72°C - 10 min.
<b>d) Manter a reação - 1 ciclo</b>	4°C

Realizar Eletroforeses de DNA e documentar os resultados.

## 2.2 Procedimento: RT-PCR, em duas etapas:

ProtoScript® II Reverse Transcriptase - First Strand cDNA Synthesis (Quick Protocol) (NEB #M0368) (New England BioLabs)

1. Em um microtubo de 200  $\mu$ L, fazer uma mistura dos componentes do Kit de RT-PCR com 1  $\mu$ L da amostra de RNA, completar com água estéril a um volume final de 20  $\mu$ L. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

Componentes da mistura	Volume ( $\mu$ L)
RNA (amostra, 0.01 $\mu$ g - 1 $\mu$ g)	1,0
Tampão de Reação ProtoScript II 5x	4,0
DTT 0.1 M	2,0
Random Primers Mix (60 $\mu$ M)	2,0
dNTP 10 mM	1,0
ProtoScript II RT (200 U/ $\mu$ L)	1,0
Inibidor de RNase (40 U/ $\mu$ L)	0,2
H <sub>2</sub> O (suficiente para volume final)	20

Misturar os componentes e incubar o tubo, em termociclador com o seguinte programa 45 °C / 1 h. Se está usando random primers, incubar inicialmente 25 °C / 5 min e continuar a 45 °C.

Na sequencia realizar amplificação por PCR do gene específico de interesse (utilizando primers específicos do gene), utilizando 1  $\mu$ L da reação

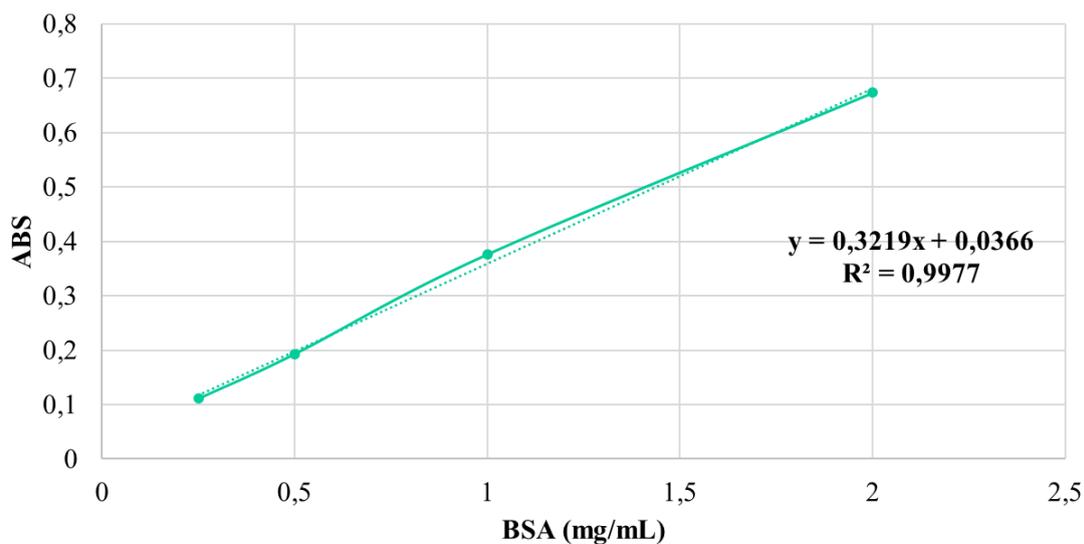
## Quantificação espectrofotométrica de biomoléculas

### 3- Quantificação de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford

#### Procedimentos:

1. Preparar o reagente de Bradford, na razão Bradford: água - 1:4;
2. Preparar 5 diluições da proteína *standard* (0.2, 0.4, 0.6, 0.8.e 1.0 mg/mL);
3. Transferir 50 µL da amostra *standard* e da sua amostra a um tubo limpo. **REALIZAR EM DUPLICATA OU TRIPLICATA;**
4. Adicionar 950 µL de reagente de Bradford a cada tubo e vortexar.
5. Incubar durante 5 minutos em temperatura ambiente;
6. Medir a absorbância a 595 nm.
7. Construir a curva padrão utilizando papel milimetrado.
8. Determinar a concentração de proteína na amostra utilizada.

**Curva Padrão**



#### 4- Quantificação de DNA

##### Procedimento:

1. Ligar o espectrofotômetro e selecionar o comprimento de onda de 260 nm, seguindo o procedimento indicado pelo fabricante;
2. Inserir no espectrofotômetro a cubeta de quartzo contendo água (branco ou controle) e fazer a leitura para zerar o aparelho;
3. Preparar uma diluição de DNA:água = 1:499, transferir para a cubeta de quartzo.
4. Fazer a leitura e determinar a concentração da amostra.

**DO<sub>260</sub> = 1 equivale a 50 ug/mL de dsDNA**