

**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).

Componentes da mistura	Volume (uL)
Tampão enzima 10x	2,5
MgCl ₂ 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 ₂ O (suficiente para volume final)	25

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

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

Componentes da mistura	Volume (µL)
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 ₂ O (suficiente para volume final)	25

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

a) Síntese de cDNA e Desnaturação inicial - 1 ciclo	50°C - 30 min.
b) Desnaturação Anelamento	95°C - 15 min.
Extensão	48°C – 45 seg.
(Repetir todos os itens b – 35 ciclos)	72 °C - 1 min.
c) Extensão final - 1 ciclo	72°C - 10 min.
d) Manter a reação - 1 ciclo	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 μ L, fazer uma mistura dos componentes do Kit de RT-PCR com 1 μ L da amostra de RNA, completar com água estéril a um volume final de 20 μ L. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

Componentes da mistura	Volume (μ L)
RNA (amostra, 0.01 μ g - 1 μ g)	1,0
Tampão de Reação ProtoScript II 5x	4,0
DTT 0.1 M	2,0
Random Primers Mix (60 μ M)	2,0
dNTP 10 mM	1,0
ProtoScript II RT (200 U/ μ L)	1,0
Inibidor de RNase (40 U/ μ L)	0,2
H ₂ 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 μ L da reação

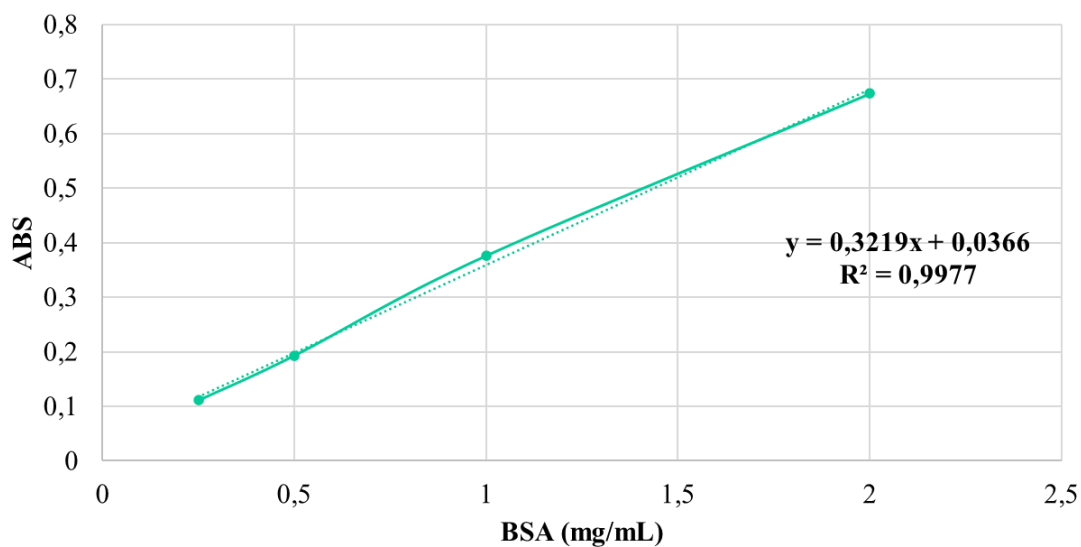
Quantificação espectrofotométrica de biomoléculas

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.

DO₂₆₀ = 1 equivale a 50 ug/mL de dsDNA