

**Curso de Biotecnologia**  
**ACH5545 - Engenharia Genética**  
**Atividade de Laboratório**  
**(28/08/2025)**

**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 Taq DNA polimerase com 1 ul da amostra de DNA, completar com água estéril a um volume final de 20 uL. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

<b>Componentes da mistura</b>	<b>Volume (uL)</b>
Tampão enzima 10x	2,0
Mix dNTPs 10 mM	2
Primer F	1
Primer R	1
Taq DNA polimerase	1
DNA molde (amostra, 0.01 pg-1 ug)	1
H <sub>2</sub> O (suficiente para volume final)	20

Misturar brevemente.

Incubar o tubo, em termociclador com o seguinte programa:

<b>Etapa</b>	<b>Condição</b>
<b>a)</b> Desnaturação inicial	95°C - 5 min.
<b>b)</b> Desnaturação Anelamento Extensão (Repetir todos os itens <b>b</b> - 35x)	95°C - 3 min. TM°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.

Temperatura de Anelamento (melting temperature, Tm):

- 1) pDNA – Primers PROEX-F e PROEX-R - TM= 40 °C
- 2) gDNA Primers Bact8F e UNIV529 -TM= 50 °C

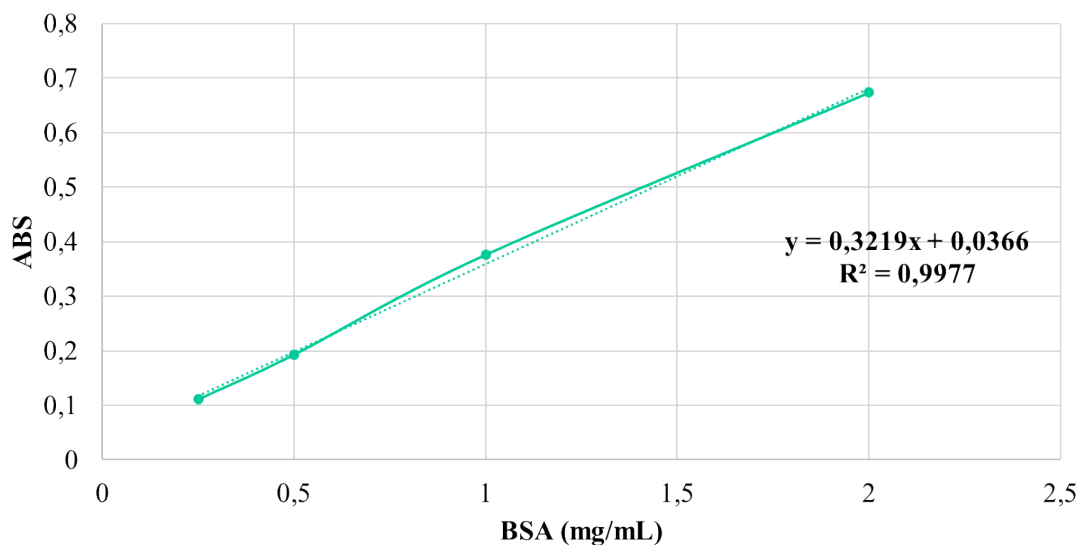
## Quantificação espectrofotométrica de biomoléculas

### 2- 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**



### 3- 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.

<b><math>DO_{260} = 1</math> equivale a 50 <math>\mu\text{g/mL}</math> de dsDNA</b>
---