

**Curso de Biotecnologia**

**ACH5545 Engenharia Genética e Biologia Molecular**

**Atividade Aula 25/09/2025**

**Análise de confirmação de Clones recombinantes**

**Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de Bactéria:**

**1.** Com um palito de dente pegar uma colônia e suspender em 10 uL de água. Ferver a amostra a 95°C por 5 minutos. Utilizar 2 ul da amostra de Bactéria na reação de PCR (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

<b>Componentes da mistura</b>	<b>Volume (uL)</b>
Tampão Enzima 10x	2
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2
dNTPs 10 mM	2
Primer F	1
Primer R	1
Enzima DNA polimerase	1
DNA molde (amostra, 0.01 pg-1 ug)	2
H <sub>2</sub> O (suficiente para volume final)	20

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

<b>a)</b> Desnaturação inicial	95°C -15 min.
<b>b)</b> Desnaturação	95°C - 1 min.
Anelamento	45°C - 30 seg.
Extensão	72 °C - 1 min.
(Repetir todos os itens <b>b</b> - 30x)	
<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.