



## Biotecnologia

**ACH5545 Engenharia Genética**

**Atividades de Laboratório**

**2º Semestre 2025**

**Docentes responsáveis:**

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

**Monitores:**

MSc. Brisa Moreira Gomes (brisamoreira@usp.br)  
Camile Penha de Freitas (camile.penha@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 - 2025**

**Amplificação de Ácidos Nucleicos:**

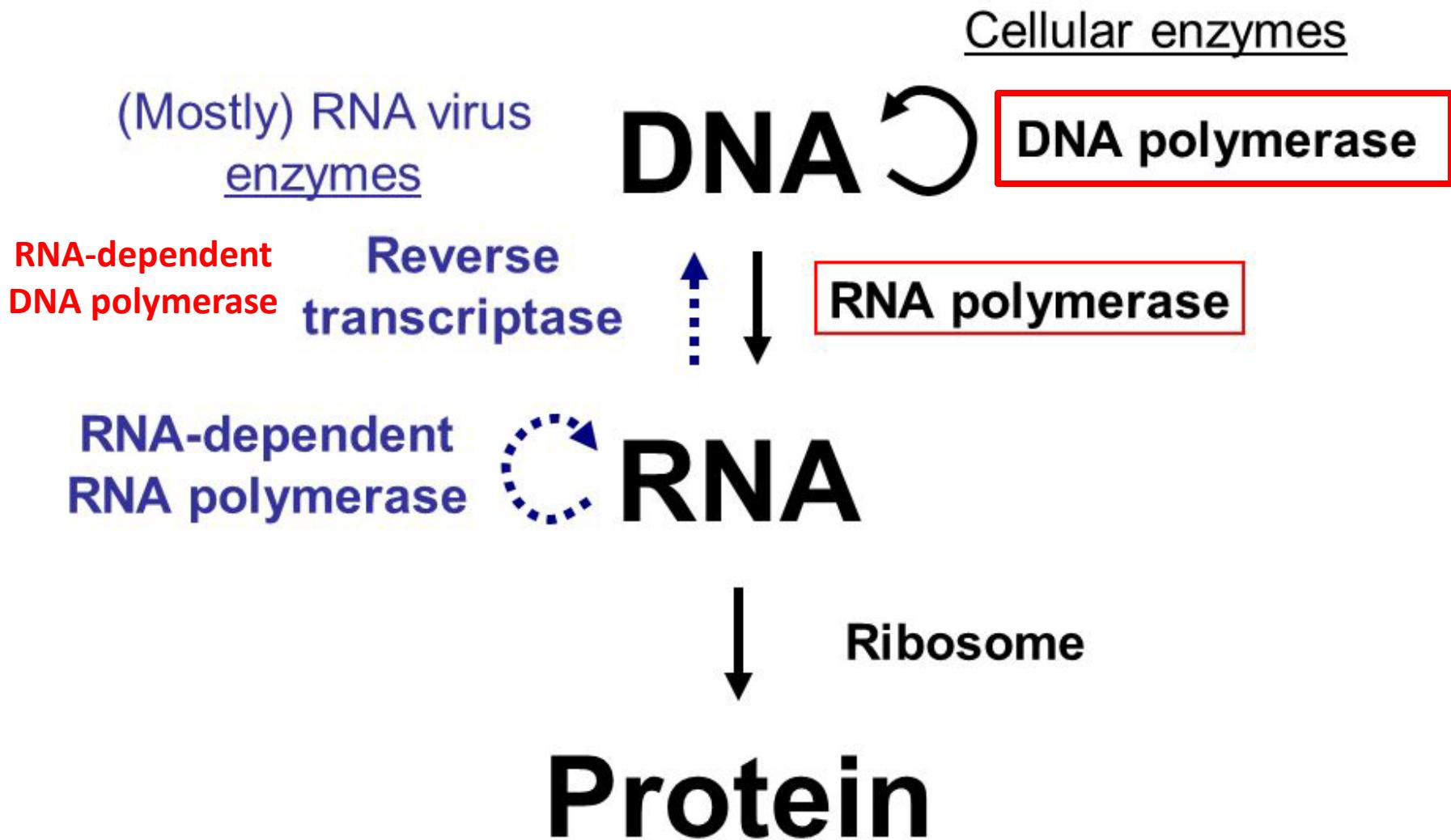
**1. PCR (DNA polimerase)**

**Quantificação espectrofotométrica de  
biomoléculas:**

**2. Proteínas**

**3. DNA**

# Enzymes in the central dogma



# DNA Technology in Forensic Science

**TABLE 1.1** DNA Content of Biological Samples

| Type of Sample                  | Amount of DNA <sup>a</sup> |
|---------------------------------|----------------------------|
| Blood                           | 20,000-40,000 ng/ml        |
| stain 1 cm <sup>2</sup> in area | ca. 200 ng                 |
| stain 1 mm <sup>2</sup> in area | ca. 2 ng                   |
| Semen                           | 150,000-300,000 ng/ml      |
| postcoital vaginal swab         | 0-3,000 ng                 |
| Hair:                           |                            |
| plucked                         | 1-750 ng/hair              |
| shed                            | 1-12 ng/hair               |
| Saliva                          | 1,000-10,000 ng/ml         |
| Urine                           | 1-20 ng/ml                 |

<sup>a</sup> The amount of DNA is given in nanograms (ng); 1 ng = one-billionth of a gram ( $10^{-9}$  g).

# A reação em Cadeia da Polimerase(PCR)

**Definição:** PCR (Polimerase Chain Reaction)

- reação de polimerização em cadeia de DNA

**Objetivo:**

- amplificar exponencialmente seqüências específicas de DNA, de amostras de genôma, plasmídios, etc., a partir de picogramas ( $10^{-9}$  g) de material genético

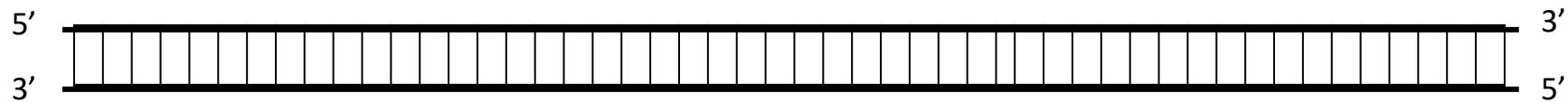
**Requisitos:**

- conhecimento da seqüência a ser amplificada
- “primers”, desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP’s), DNA polimerase termoestável, termociclador

**Vantagens:**

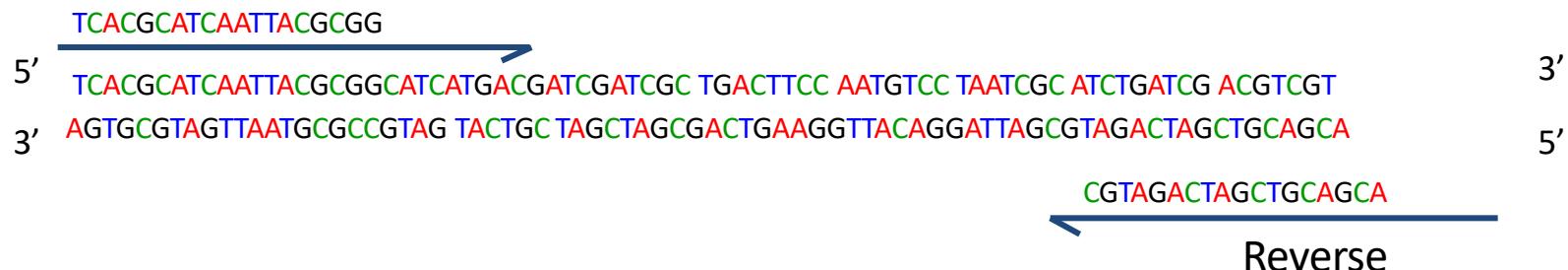
- funciona mesmo com amostras de DNA, mesmo que esteja parcialmente degradado
- amplifica a partir de quantidades muito pequenas, na ordem de picogramas
- etc.

# DNA genômico



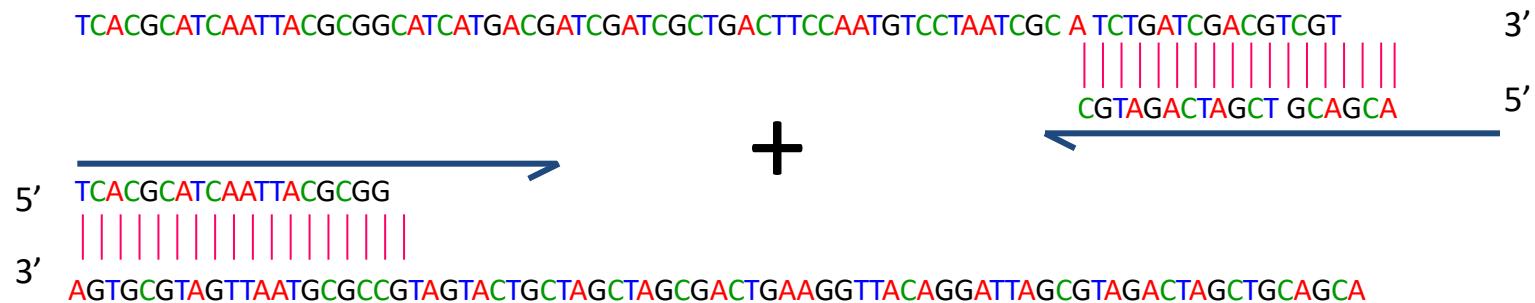
## DNA e desenho de Oligonucleótidos

Forward



Reverse

## DNA e alinhamento de Oligonucleótidos



# 1. Reação de PCR – Taq DNA Polimerase

Em um microtubo de 200 uL, fazer uma mistura dos componentes do Kit completar com água estéril a um volume final de 20 uL. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

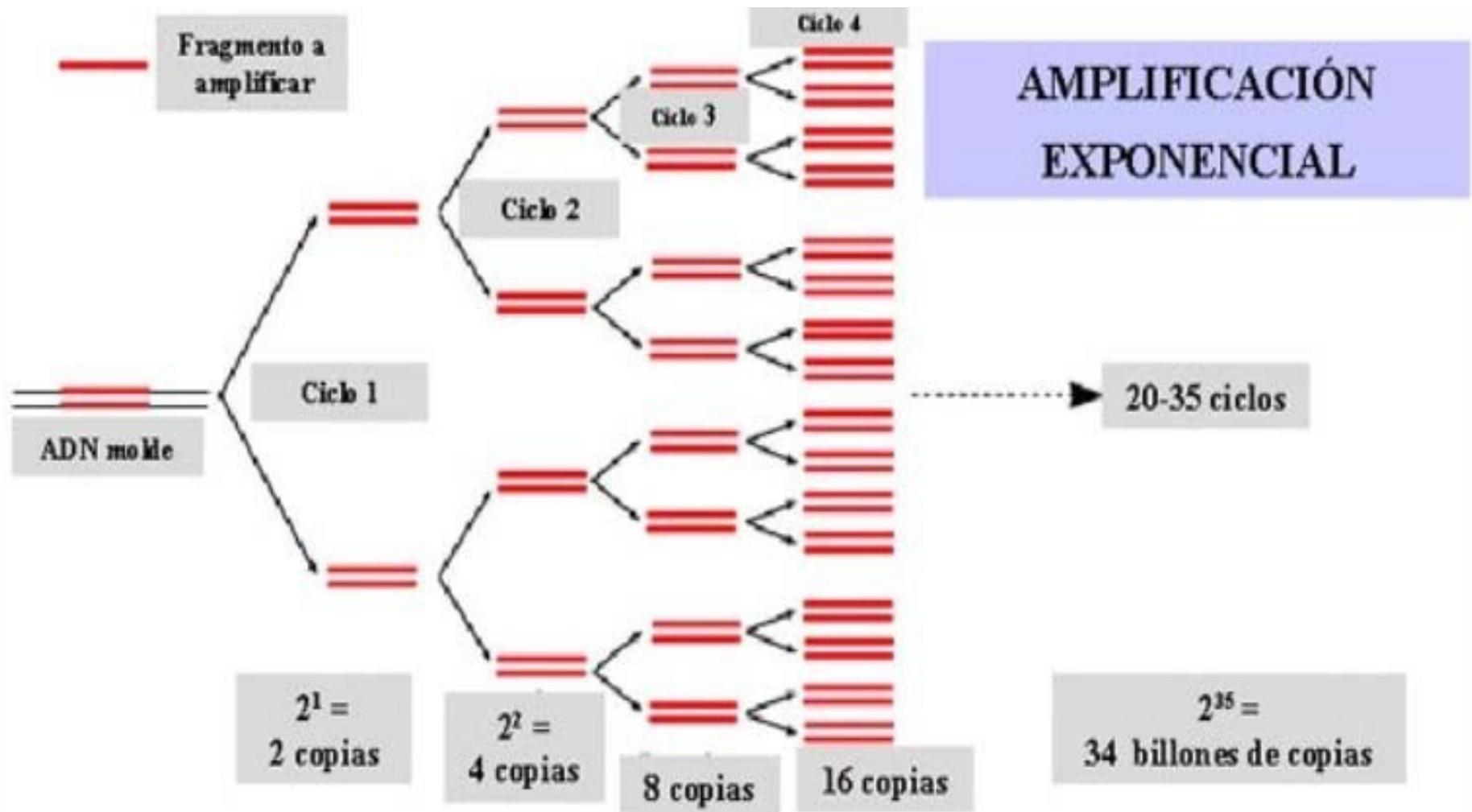
| Componentes da mistura                          | Volume (uL) |
|---|-------------|
| Tampão enzima 10x                               | 2,0         |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM                         | 2           |
| → Mistura dNTPs 10 mM                           | 2           |
| → Primer F 10 μM                                | 1           |
| → Primer R 10 μM                                | 1           |
| Enzima DNA polimerase                           | 1,0         |
| → DNA molde (amostra, 0.01 pg-1 ug)             | 1           |
| H <sub>2</sub> O (suficiente para volume final) | 20          |

## Programa de Amplificação:

1) pDNA – Primers PROEX-F e PROEX-R  
TM= 40 °C

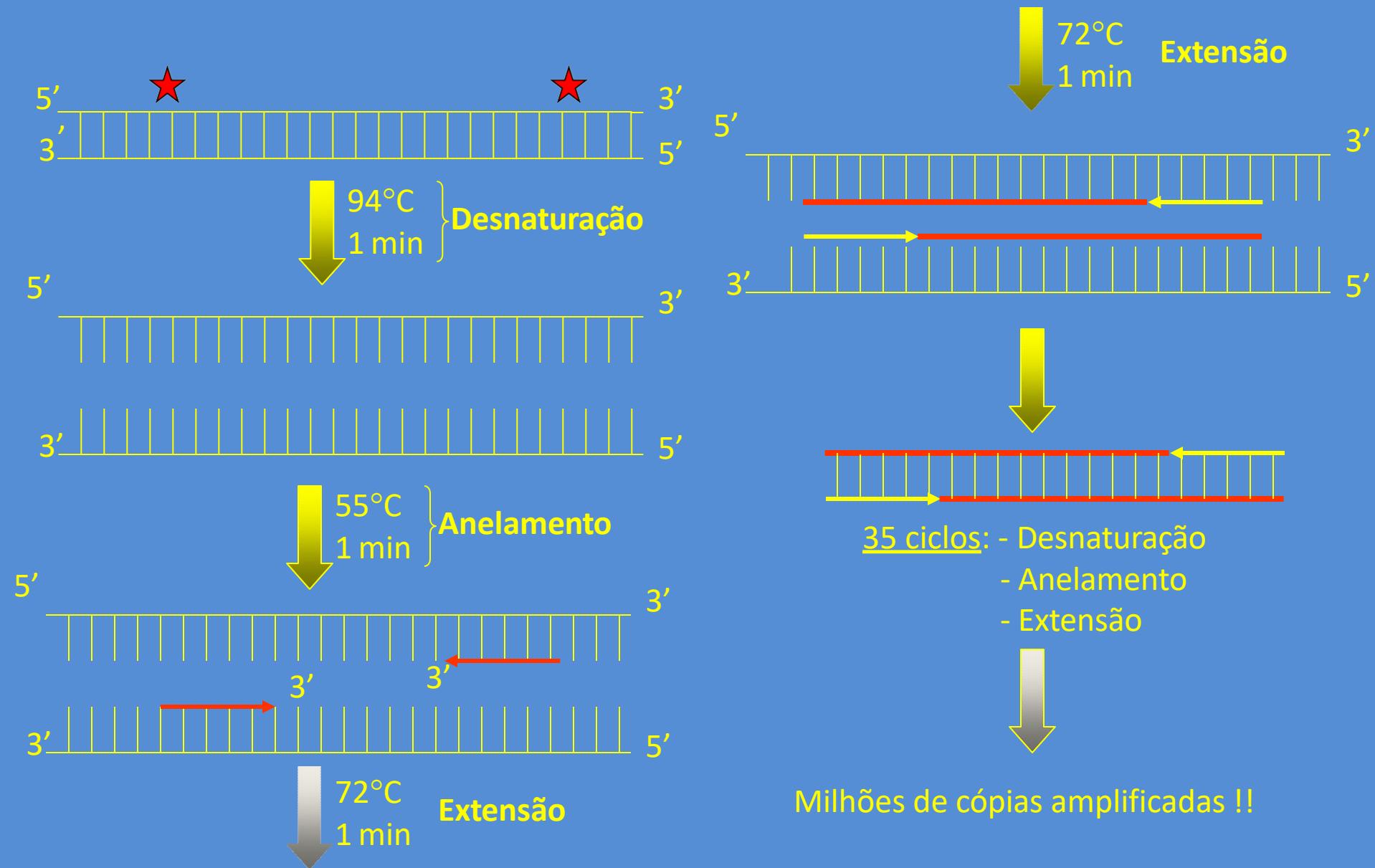
2) gDNA Primers Bact8F e UNIV529-TM=  
50 °C

|  |  |
|--|--|
| a) Desnaturação inicial  | 95°C - 15 min.   |
| b) Desnaturação Anelamento<br><br>Extensão<br><br>(Repetir todos os itens b - 35x) | 95°C - 3 min.<br><br>TM °C - 30 seg.<br><br>72 °C - 1 min. |
| c) Extensão final  | 72°C - 10 min.   |
| d) Manter a reação   | 4°C  |



Adaptado de Andy Vierstraete, 2001

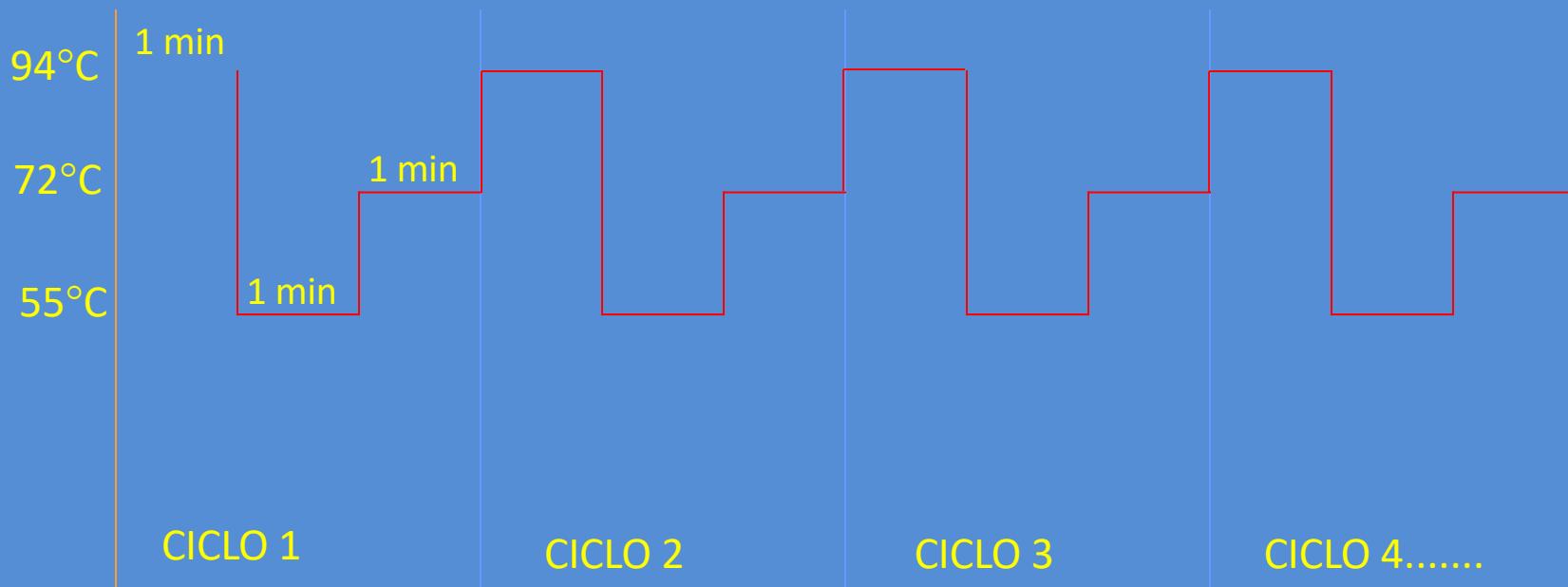
# Tecnologia do PCR



# Tecnologia do PCR

- Passos:
- 94°C, 1 min = desnaturação = rompimento das pontes de H entre as duas fitas de DNA
  - 55°C, 1 min = anelamento = os primers de hibridam em suas posições específicas
  - 72°C, 1 min = extensão = a DNA polimerase sintetiza novas fitas de DNA

Ciclos:



# Enzimas DNA Polimerases

Thermo tolerant polymerases used for PCR (polymerase chain reactions) reactions

The total error rate of Taq polymerase has been variously reported

between  $1 \times 10^{-4}$  to  $2 \times 10^{-5}$  errors per base pair.

Pfu polymerase appears to have the lowest error rate at roughly  $1.5 \times 10^{-6}$  error per base pair

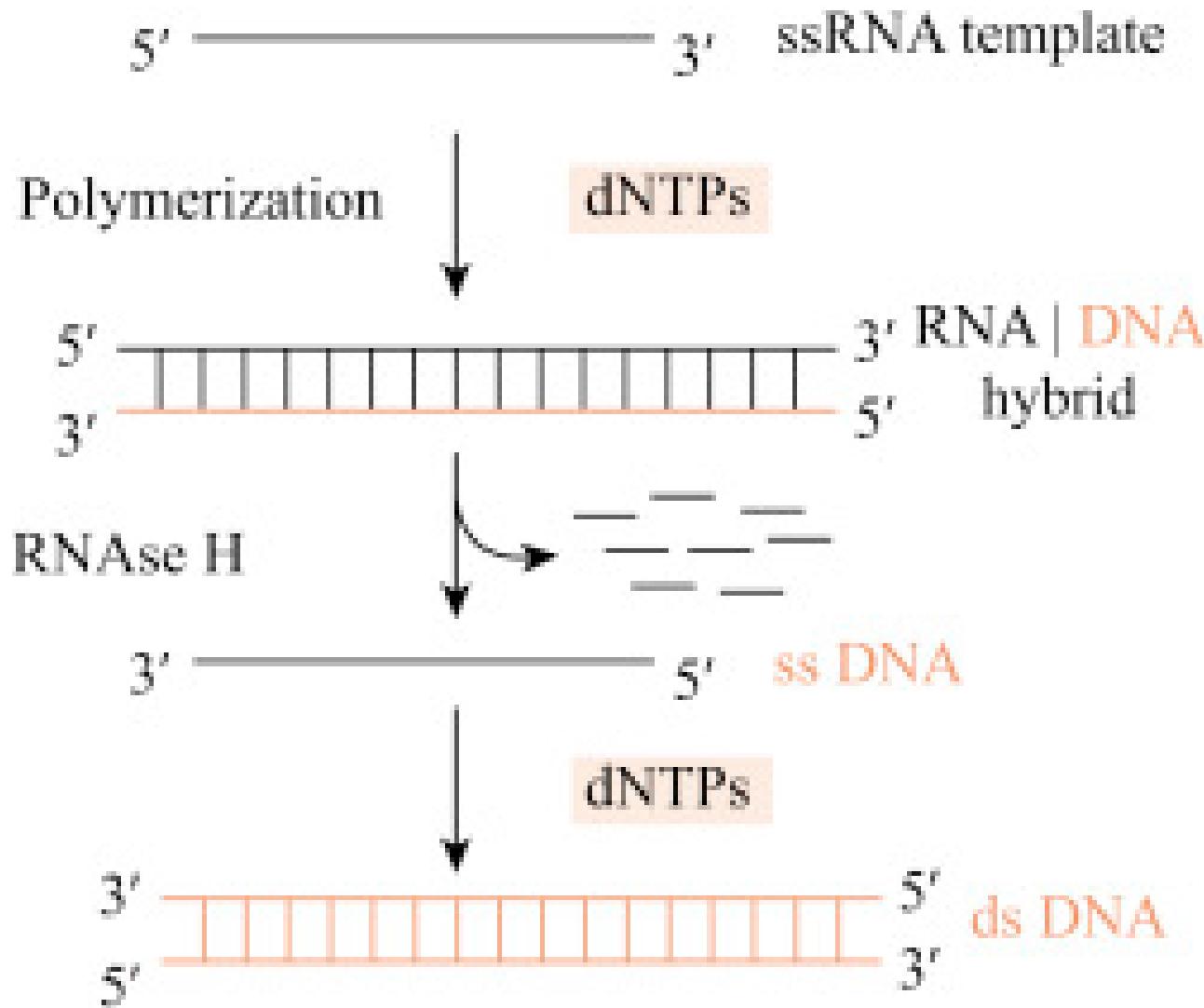
Vent is intermediate between Taq and Pfu.

| Polymerase | 3'->5'<br>Exonuclease | Source and Properties  |
|------------|-----------------------|--|
| Taq        | No                    | From <i>Thermus aquaticus</i> . Halflife at 95C is 1.6 hours.  |
| Pfu        | Yes                   | From <i>Pyrococcus furiosus</i> . Appears to have the lowest error rate of known thermophilic DNA polymerases. |
| Vent       | Yes                   | From <i>Thermococcus litoralis</i> ; also known as Tli polymerase. Halflife at 95 C is approximately 7 hours.  |

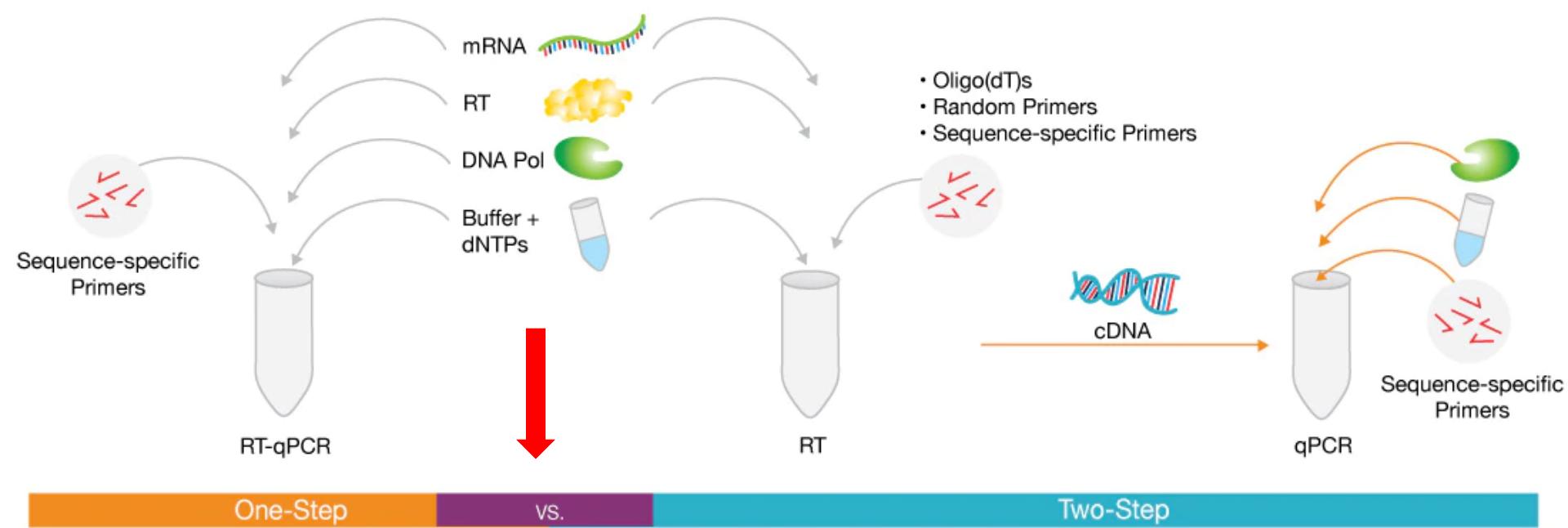
# Enzimas RNA polimerase: Transcriptase Reversa

RNA-dependent DNA polymerase

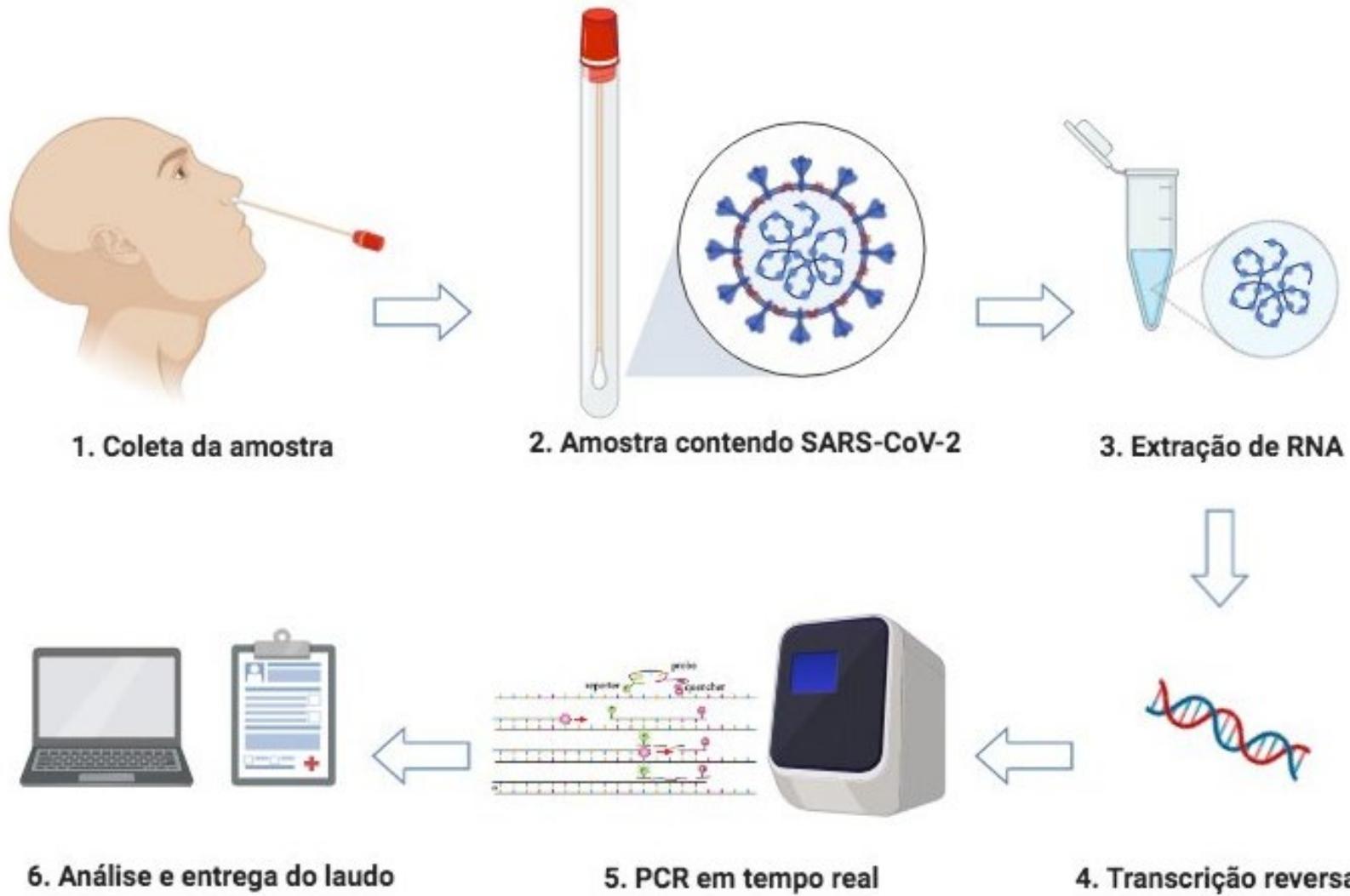
Reverse transcriptase (RT)



# RT-PCR: simples etapa ou duas etapas



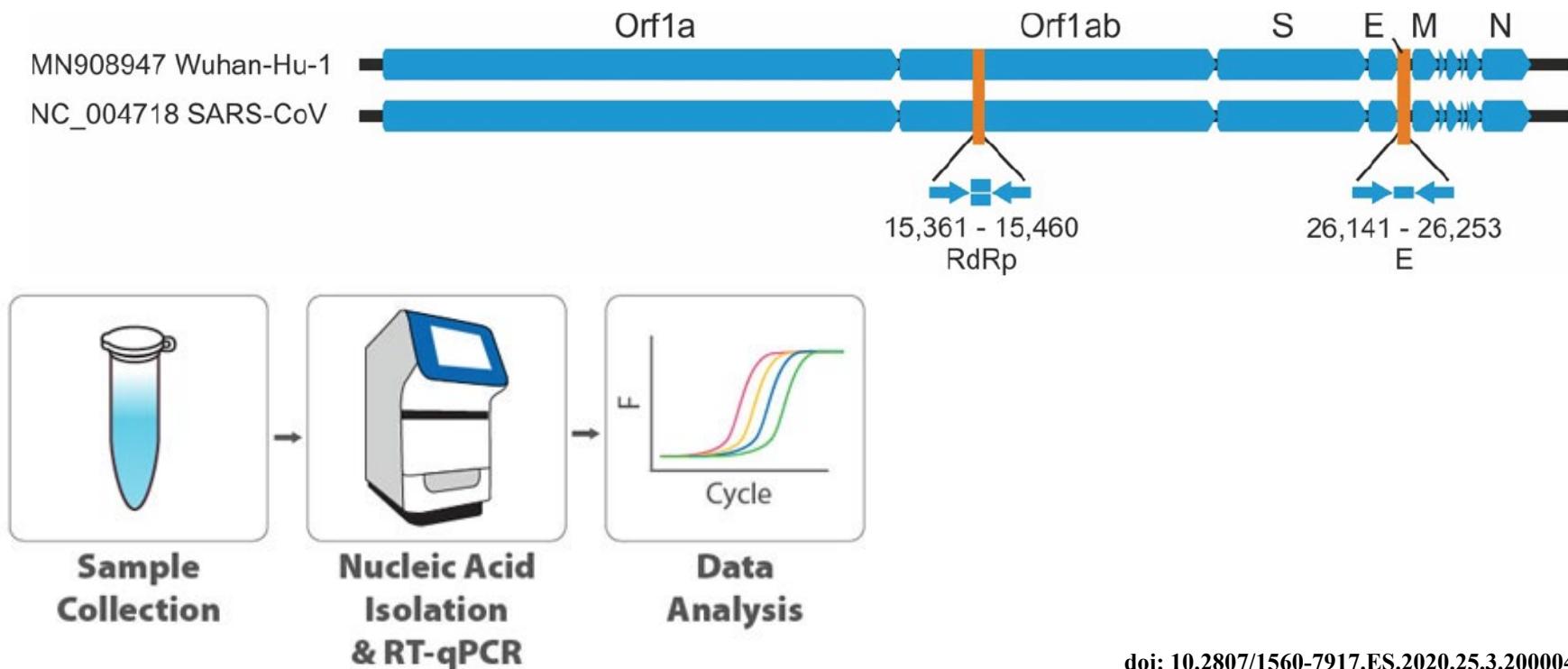
# Diagnóstico COVID-19: RT-PCR

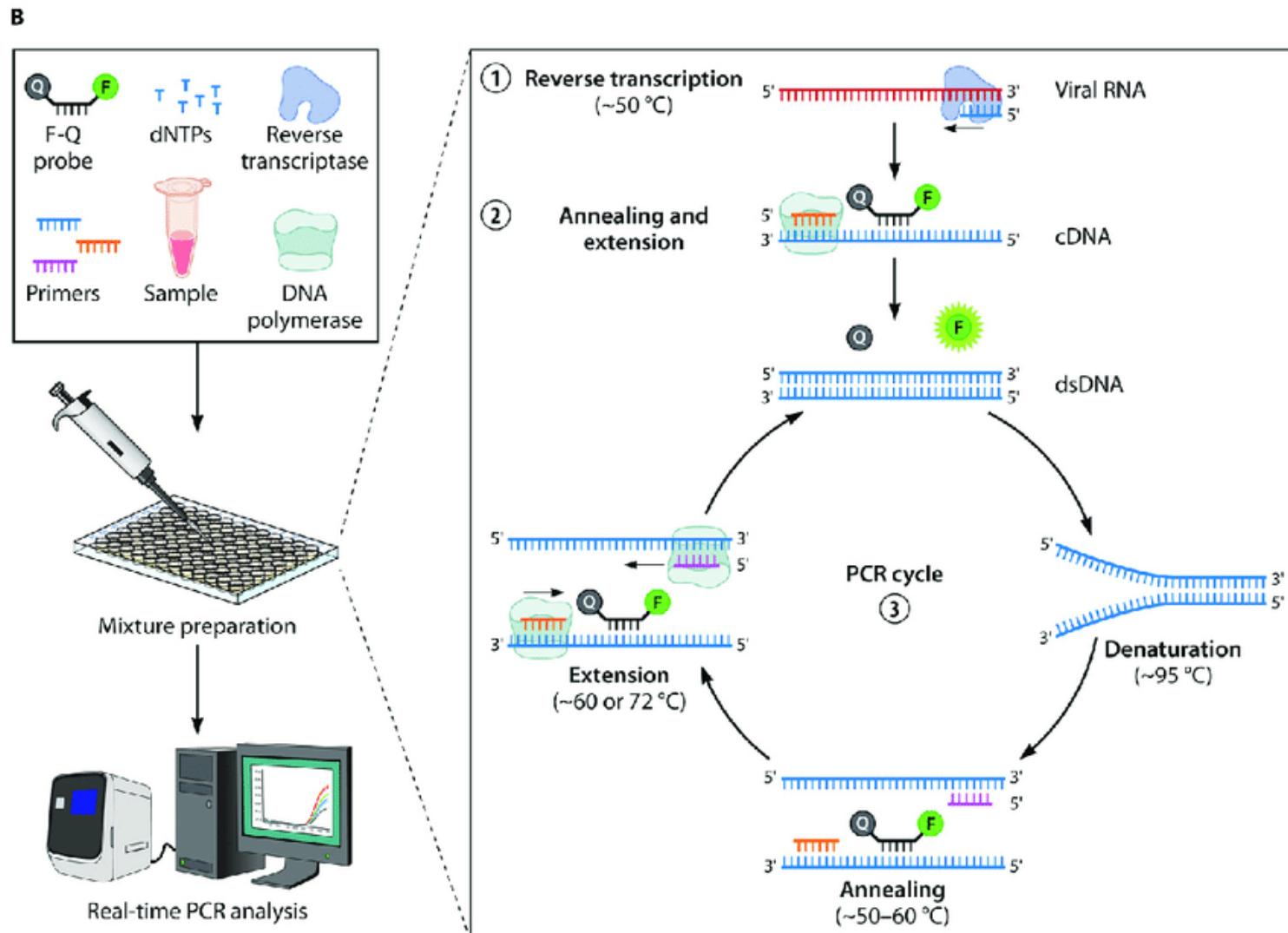
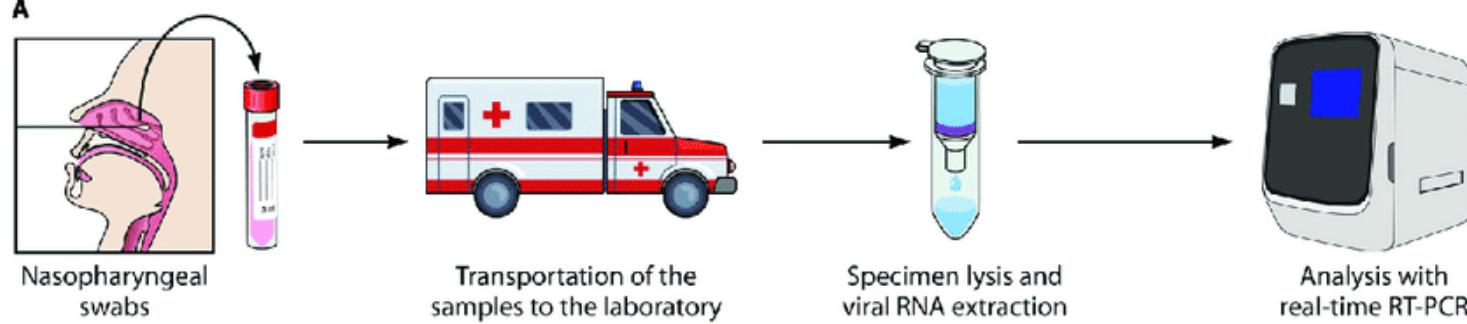


# Diagnóstico COVID-19: RT-PCR

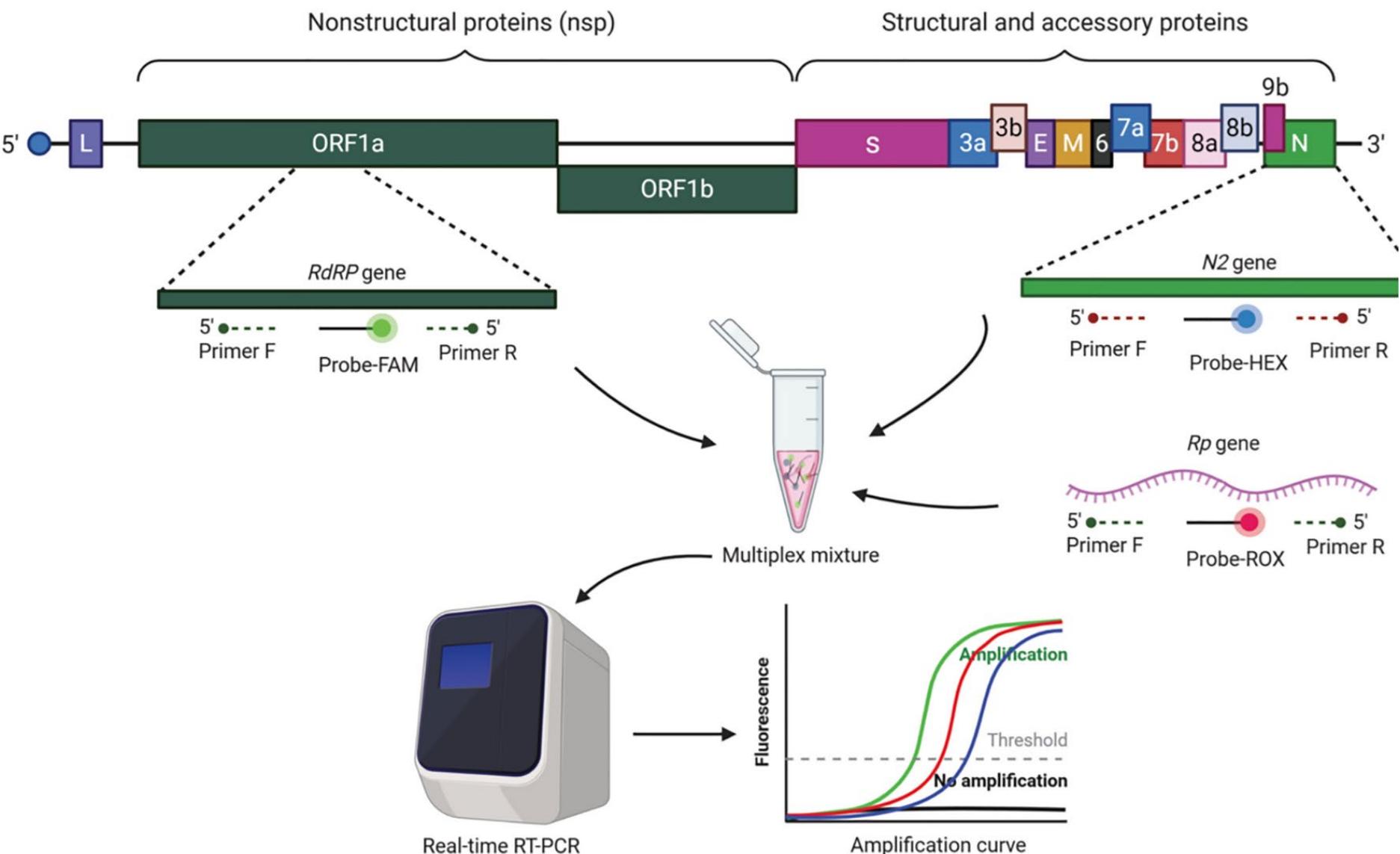
Protocolos já estabelecidos e reconhecidos (Protocolo de Berlim e Pasteur)

- **Extração do RNA** do material proveniente do Swab pelo método do Brazol
- RNA submetido a análise por PCR quantitativo (**qPCR ou PCR em Tempo Real**), usando um conjunto de três primers, em reações individuais, em duplicatas:
  - 1) Primer para avaliação da presença de RNA humano (para a **RNAseP**), o qual indica a presença de células humanas nas amostras e o sucesso tanto da coleta quanto da **extração do RNA**. Deve ser positivo para todas as amostras.
  - 2) Primer para o gene **E** do vírus. Deve ser **positivo** para amostras contendo RNA viral e para o controle positivo (RNA sintético do vírus).
  - 3) Primer para o gene **RdRp** do vírus. Deve ser positivo para amostras contendo RNA viral e para o controle positivo, correspondendo a um teste **confirmatório** que pode discriminar entre outros coronavírus.

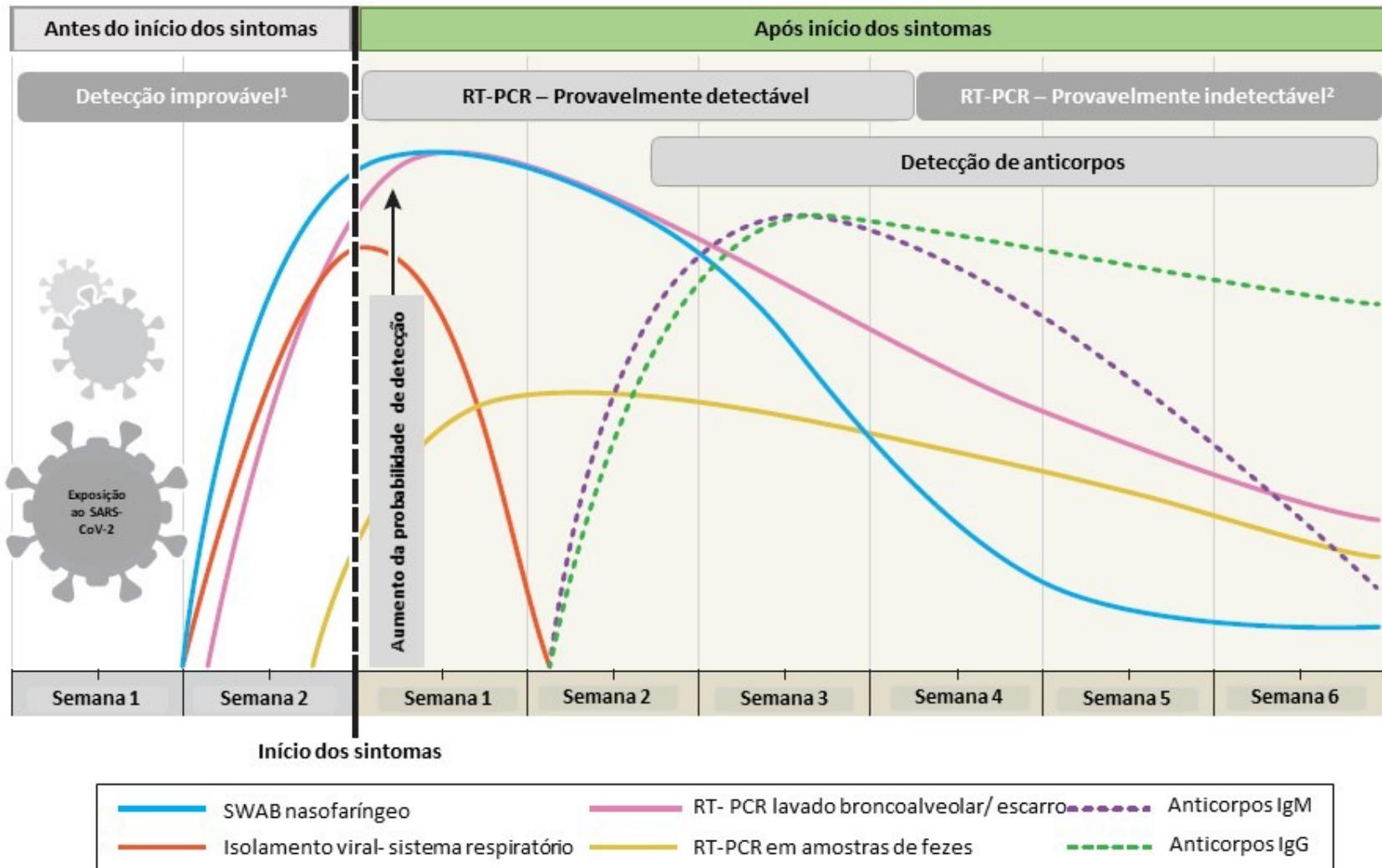




# Multiplex real-time RT-PCR method for the diagnosis of SARS-CoV-2 by targeting viral *N*, *RdRP* and human *RNase P* genes



## Provável variação do comportamento dos testes diagnósticos para detecção da infecção pelo SARS-CoV-2 ao longo do tempo considerando-se o início dos sintomas



1- Detecção ocorre apenas se os pacientes forem acompanhados de forma proativa a partir do momento da exposição

2- Maior probabilidade de ocorrer um resultado não detectável de RT-PCR com amostras de SWAB nasofaríngeo

FONTE: Adaptado de Sethuraman, N.; Jeremiah, S.S. & Ryo, A., 2020.

# Digitais de DNA

## Regiões hipervariáveis do genôma:

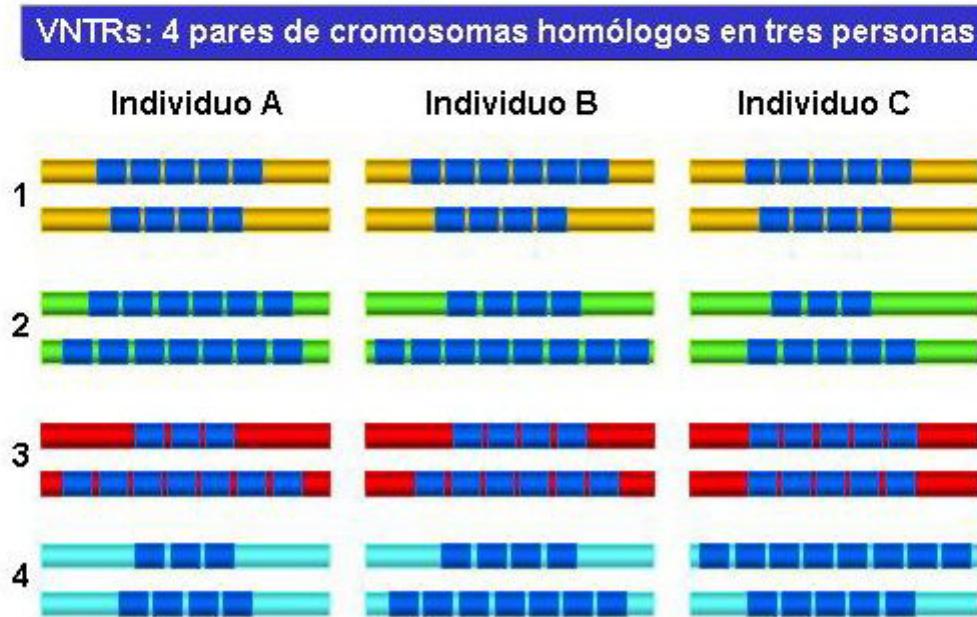
V.N.T.R. (variable number of tandem repeats, 9 – 80 pb)

- microsatélites (2 a 4 pb)
  - S.T.R. (short tandem repeats 2 – 5 pb)
- minisatélites (>5 pb)

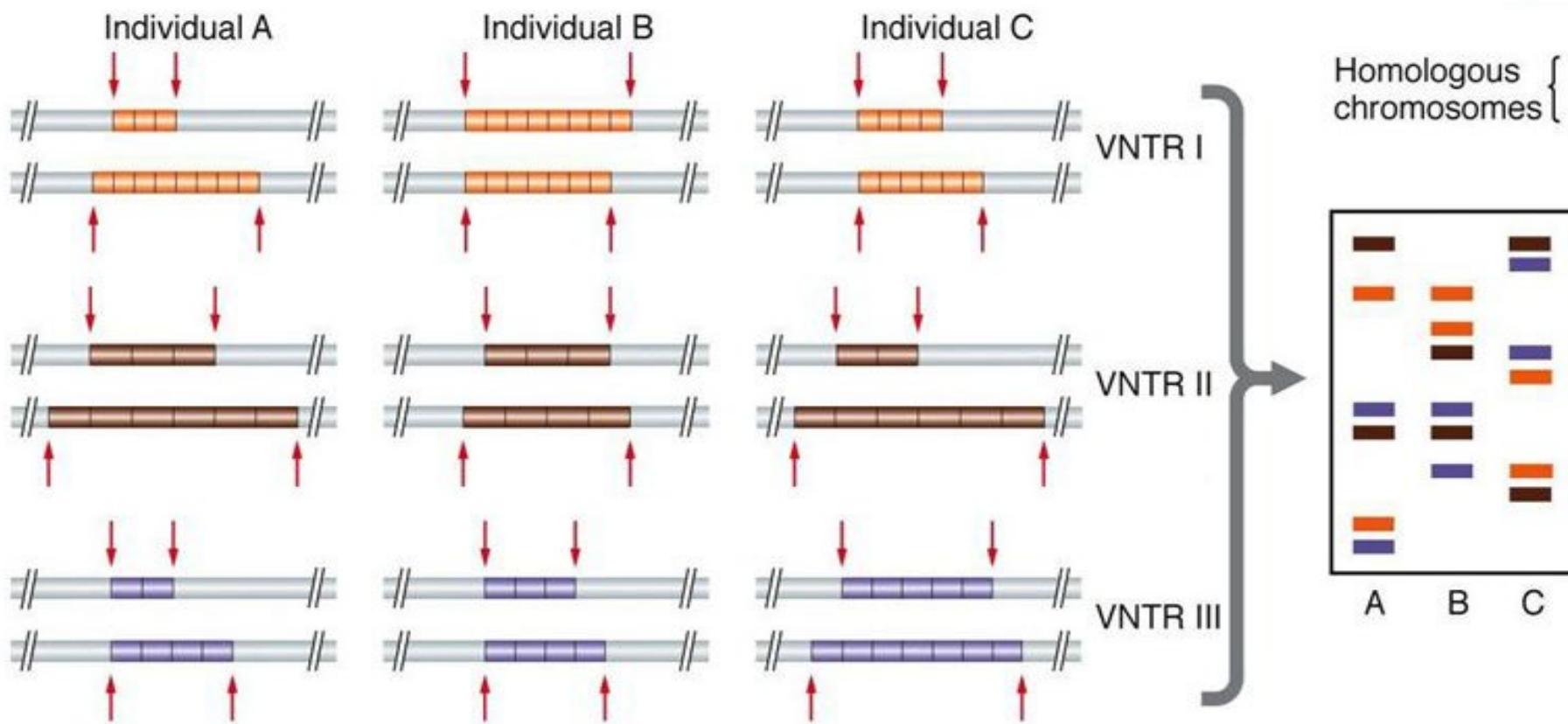
# VNTRs (Variable Number Tandem Repeats)

All humans share about 99.99% of their DNA. In order to create a DNA fingerprint that is unique to each person scientists had to identify areas in the genome that are highly variable.

There are regions in the genome called **minisatellite** regions that contain a variable number of repeated bases. These areas are called **VNTRs**.



# Variable Number Tandem Repeat (VNTR)

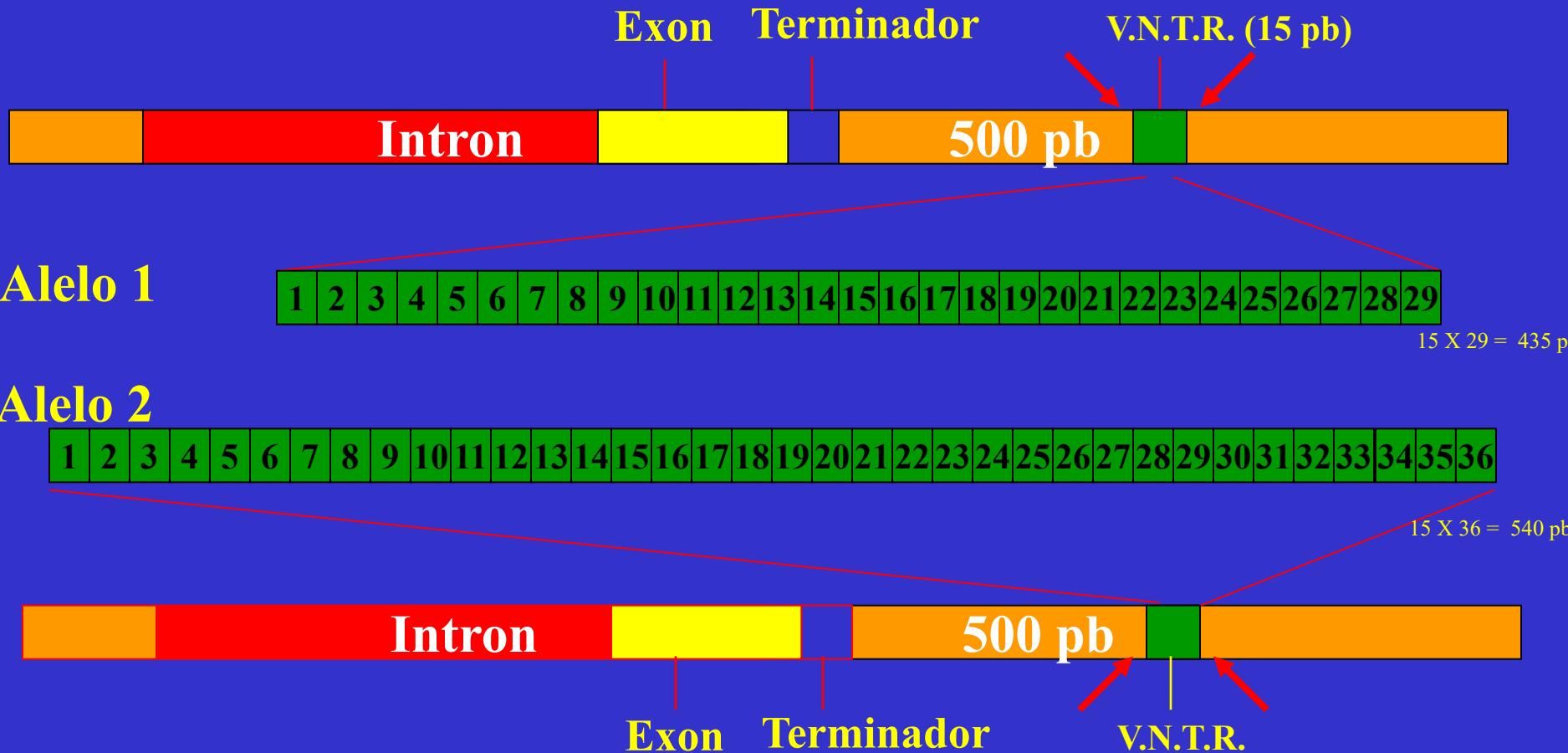


# ApoB Utilização Prática

Apo B is the main protein component of LDL, very low-density lipoprotein (VLDL) and chylomicrons and plays an important role in cholesterol metabolism. It is involved in the assembly and secretion of chylomicrons from the small intestine and VLDL-C from the liver. The Apo B gene is a tissue-specific gene that is expressed mainly in liver and intestine

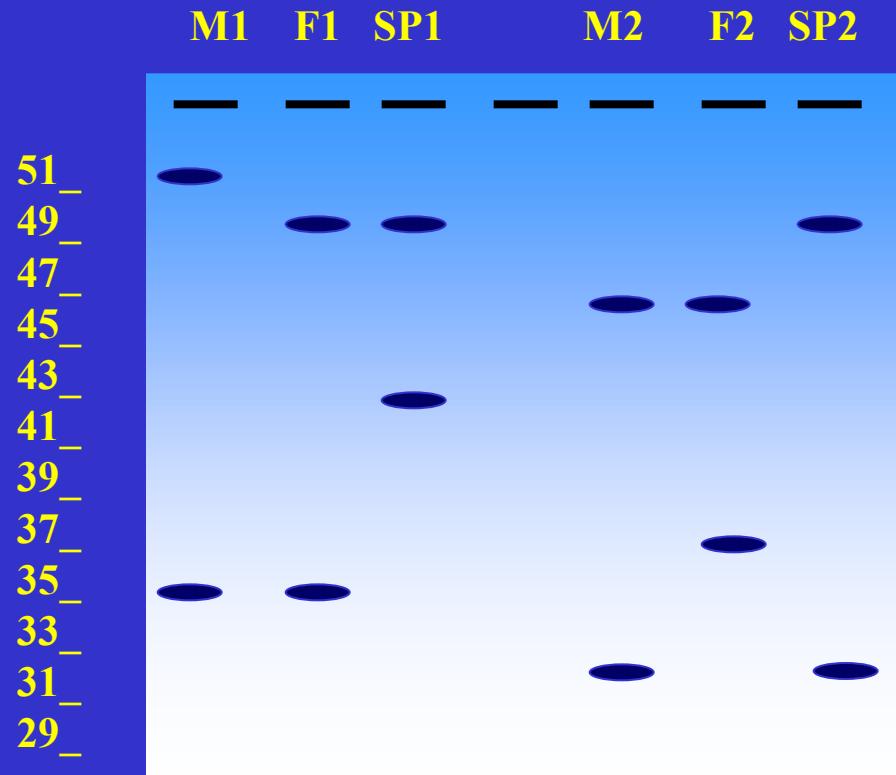
- 500 pb “downstream” ao códon de terminação do gene da apolipoproteína B
- repetições de 15 pb
- 12 alelos diferentes:

# V.N.T.R. Loci: 3'apoB



# Eletroforese para Genotipagem de

3'apoB  
(-)



(+)

# Polimorfismo do Gene ECA

## (Enzima Conversora de Angiotensina)

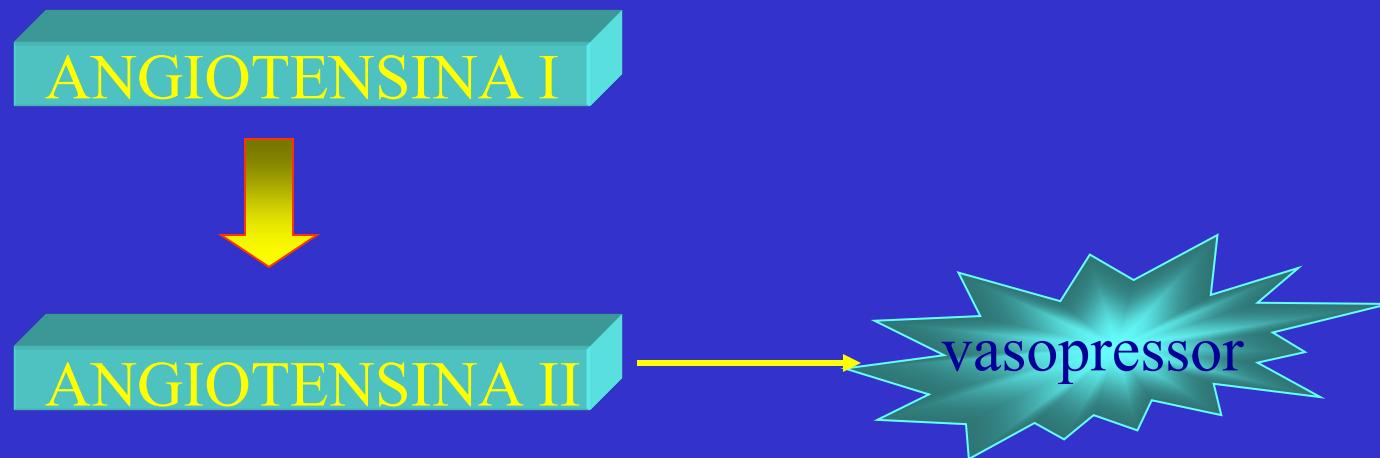
Localização do Gene eca:

- cromossomo 17
  - posição 17q23

Localização do polimorfismo I/D (Inserção/Deleção):

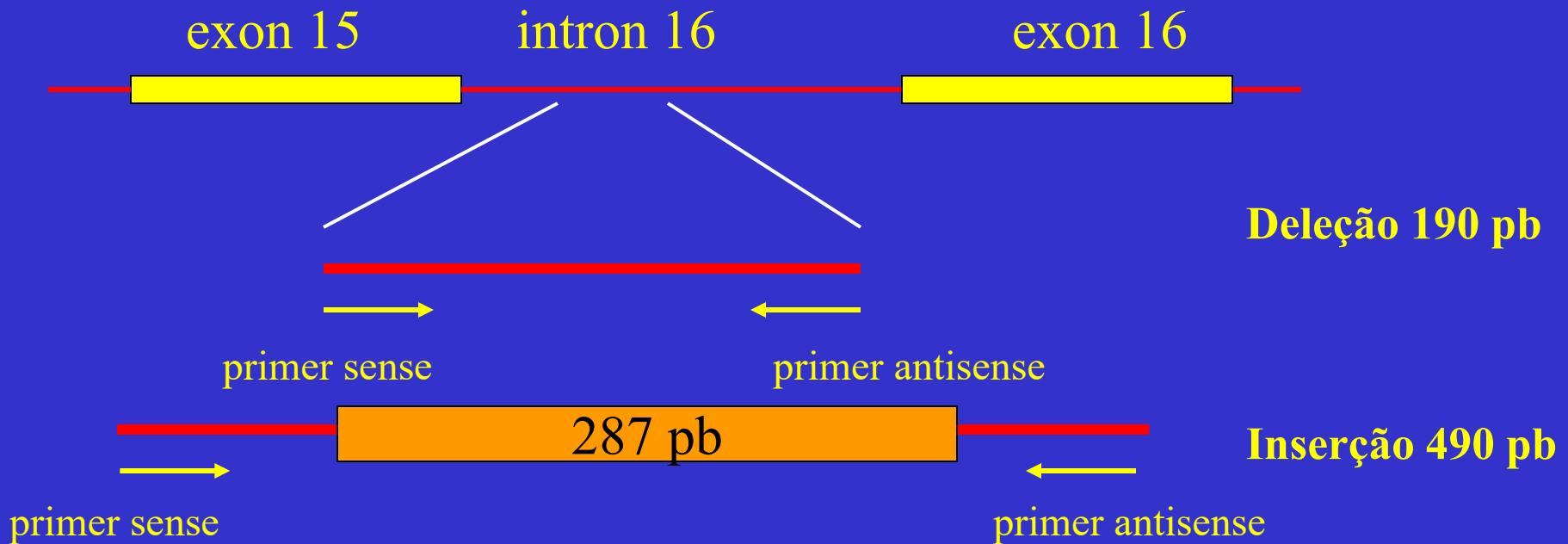
- intron 16 do gene eca

Função da Enzima Conversora de Angiotensina:

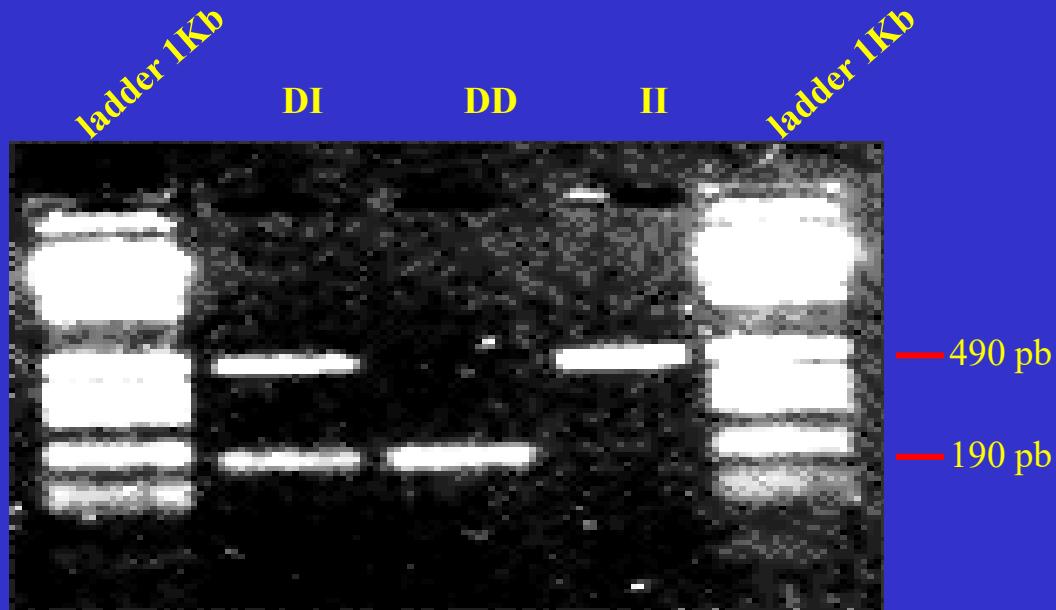


# Polimorfismo do Gene ECA

(Enzima Conversora de Angiotensina)

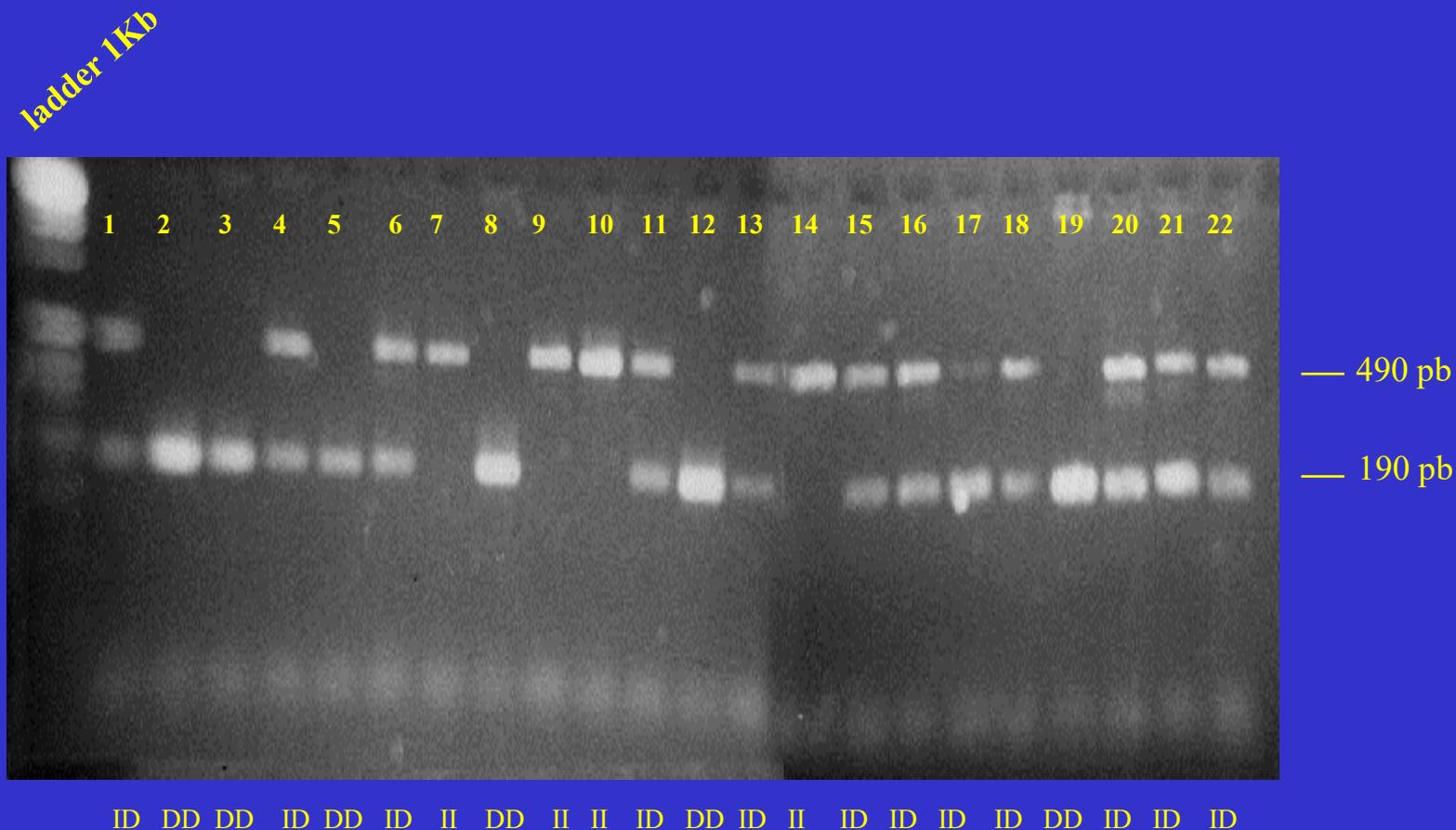


# Polimorfismo do Gene ECA

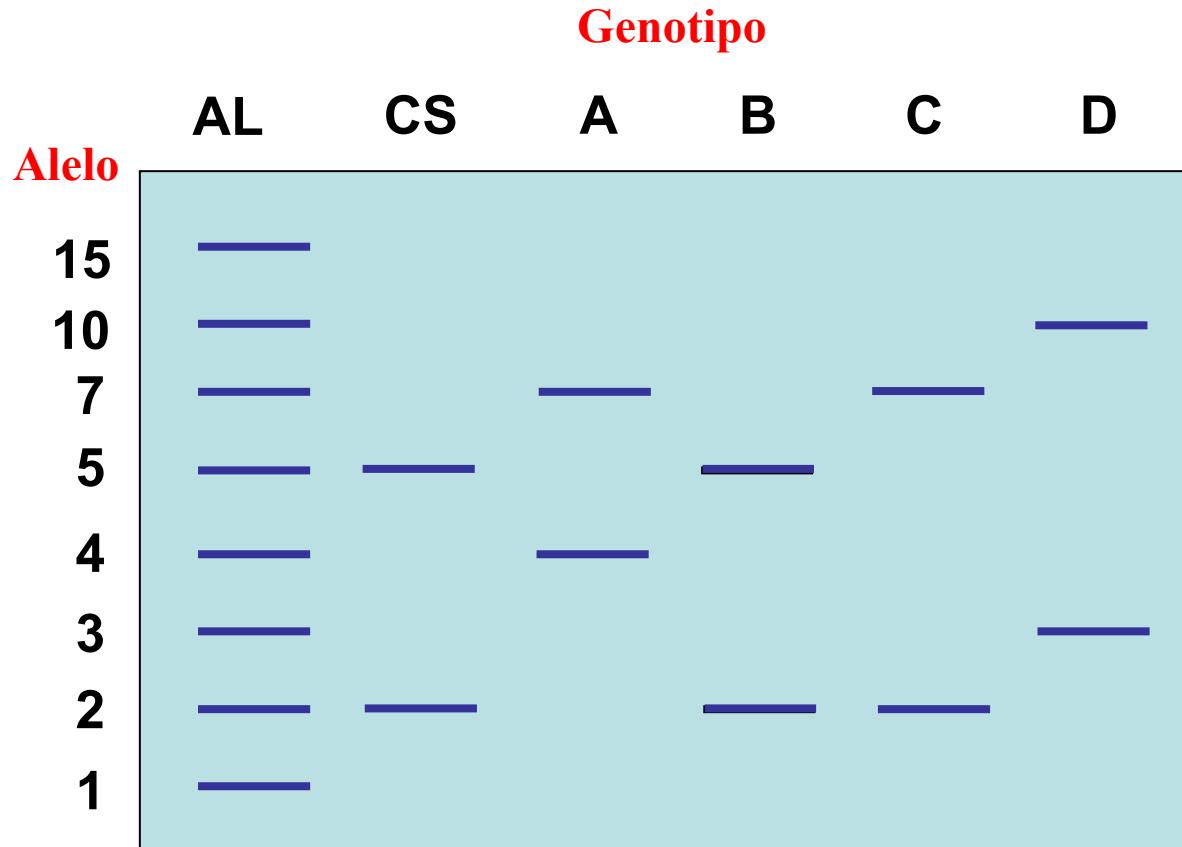


Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos amplificados por PCR identificando polimorfismo na região do intron 16 da enzima conversora de angiotensina. Três possíveis genótipos: heterozigoto (DI) e homozigotos (DD e II), os fragmentos de 190 e 490 pb correspondem, respectivamente, a deleção (D) e inserção (I).

# Polimorfismo do gene ECA



# Análise de amostra obtida na cena do crime



AL: Allele ladder  
CS: Crime Scene  
A: Suspect A  
B: Suspect B  
C: Suspect C  
D: Suspect D

# **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 de cada 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 de Proteínas - Bradford

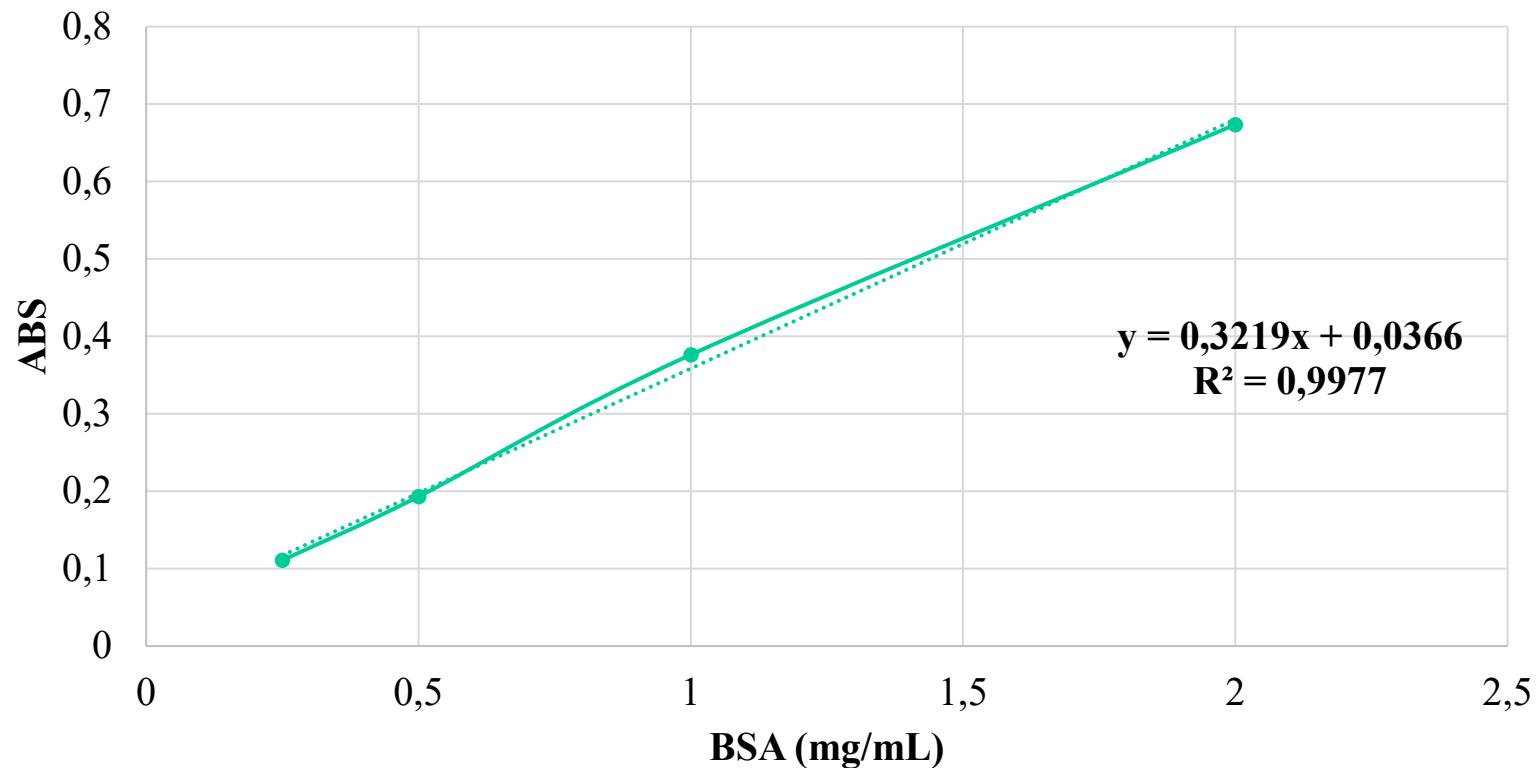


BSA (Albumina de Soro Bovino)

0,25      0,5      1,0      2,0  
(mg/ml)

5 minutos (reação)  
595 nm (leitura)

Curva Padrão



**Ensaio:**

50 µL de Amostra + 950 µL do reagente de Bradford. Calcular a concentração da proteína total

### **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 água: DNA - 1:250, 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**

# Obrigado

[fscha@usp.br](mailto:fscha@usp.br)



USP – 2º Semestre 2025