

Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética

Atividades de Laboratório

2º Semestre 2025

Docentes responsáveis:

Felipe Chamberg (fscha@usp.br) - <https://sites.usp.br/lbbp>

Sandra Marcia Muxel (sandrammixel@usp.br)

Monitores:

MSc. Brisa Moreira Gomes (brisa.moreira@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:

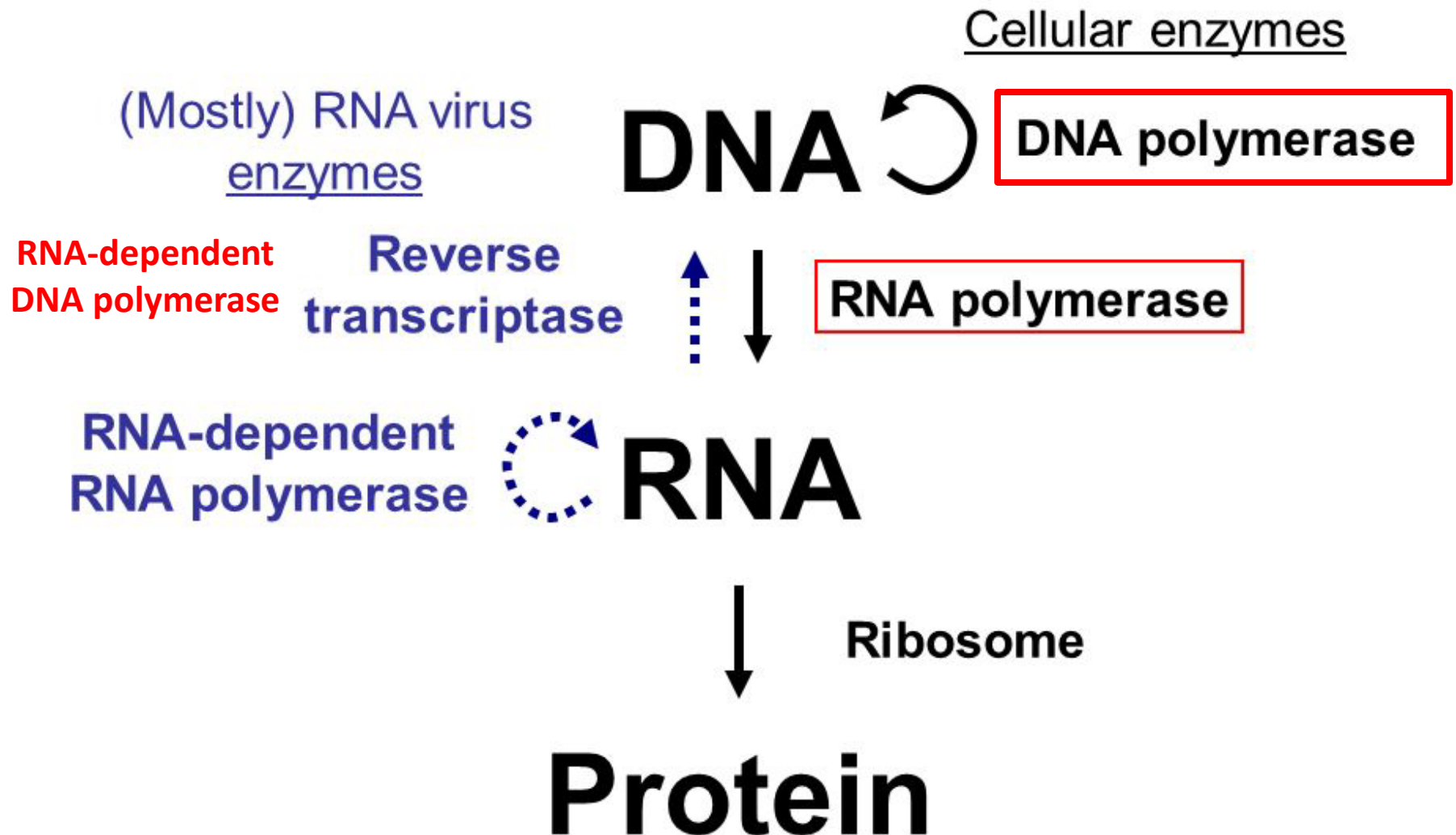
1. PCR (DNA polimerase)

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 ^a |
|---------------------------------|----------------------------|
| Blood | 20,000–40,000 ng/ml |
| stain 1 cm ² in area | ca. 200 ng |
| stain 1 mm ² 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 |

^a 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

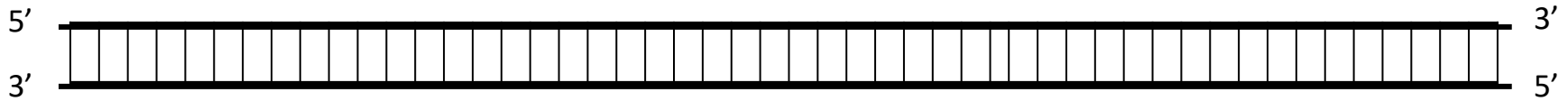
Requisitos:

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

Vantagens:

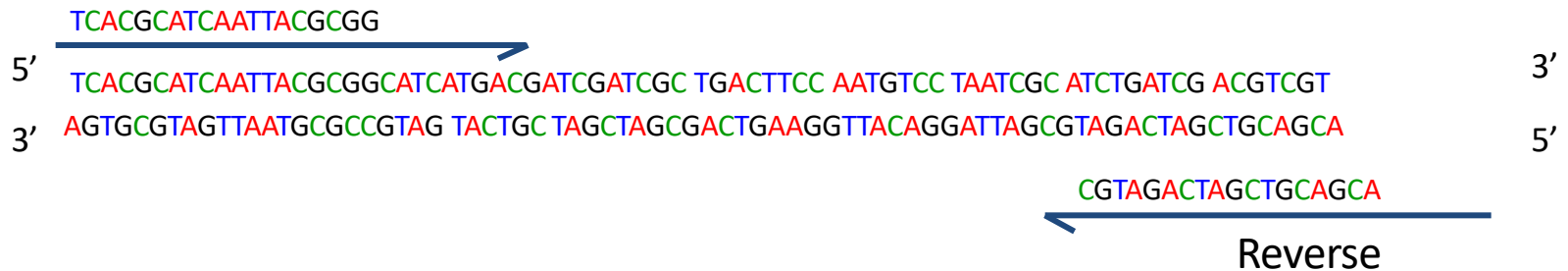
- funciona mesmo com amostras de DNA, mesmo que esteja parcialmente degradado
- amplifica a partir de quantidades muito pequenas, na ordem de picogramas
- etc.

DNA genômico

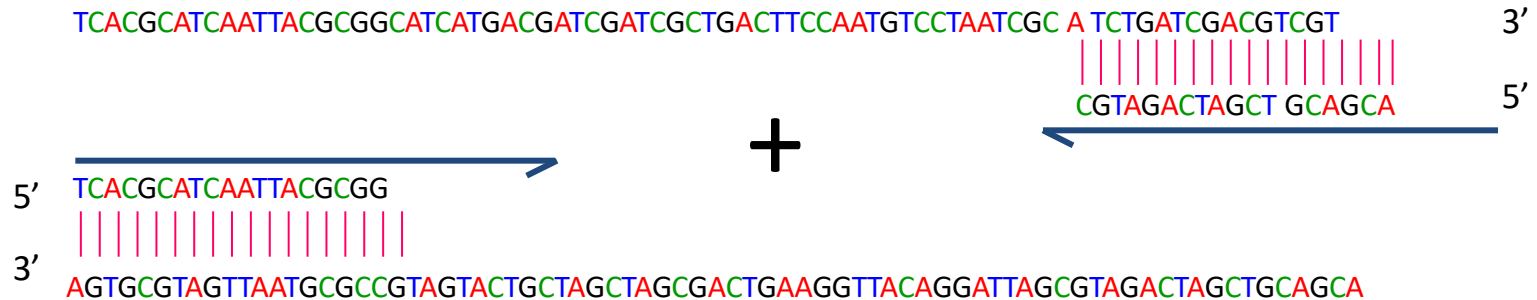


DNA e desenho de Oligonucleótidos

Forward



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).

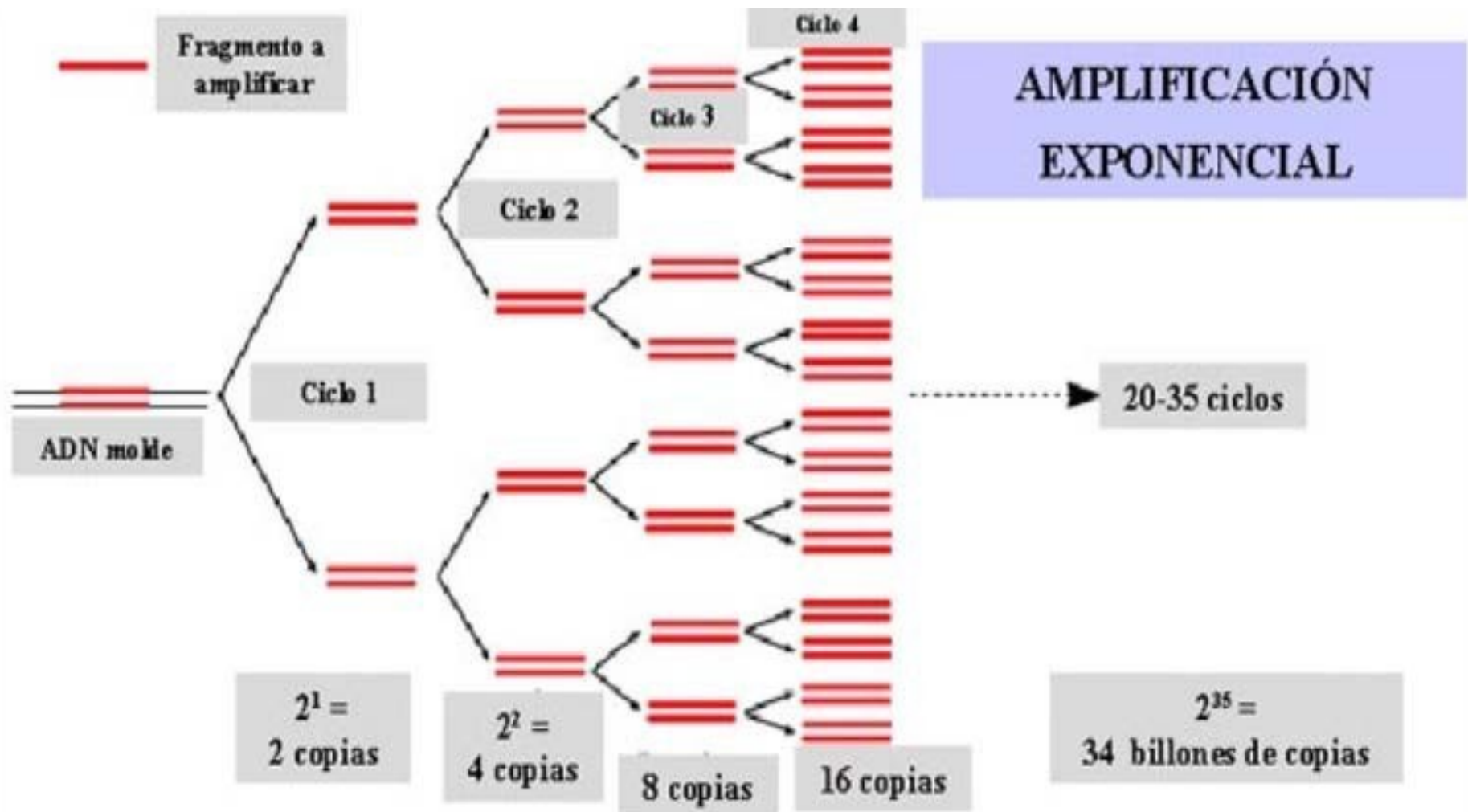
| | Componentes da mistura | Volume (uL) |
|---|---|-------------|
| | Tampão enzima 10x | 2,0 |
| | MgCl ₂ 25 mM | 2 |
| ➡ | Mistura dNTPs 10 mM | 2 |
| ➡ | Primer F 10 µM | 1 |
| ➡ | Primer R 10 µM | 1 |
| | Enzima DNA polimerase | 1,0 |
| ➡ | DNA molde (amostra, 0.01 pg-1 ug) | 1 |
| | H ₂ O (suficiente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

Programa de Amplificação:

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

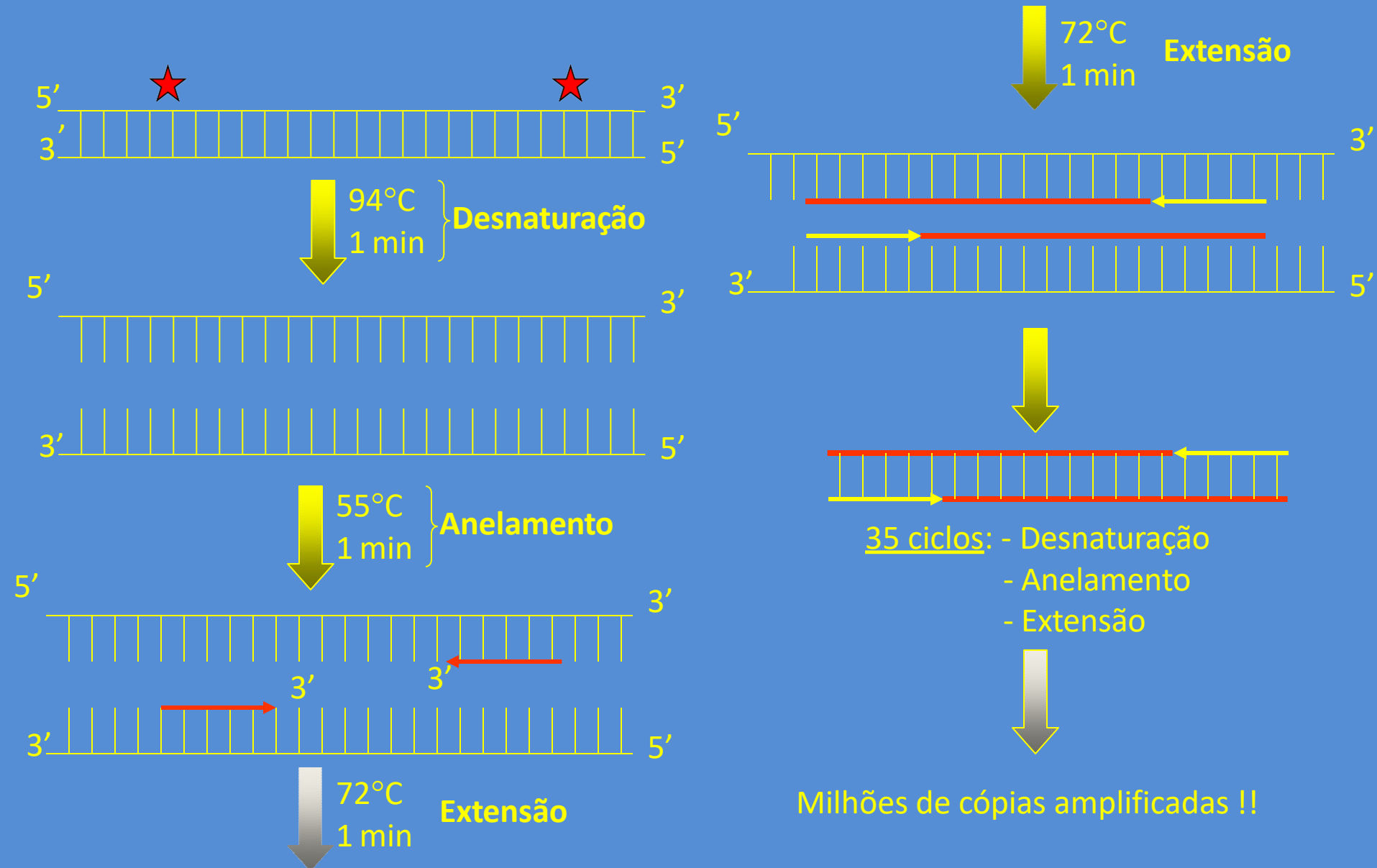
2) gDNA Primers Bact8F e UNIV529-TM=
50 °C

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



Adaptado de Andy Vierstraete, 2001

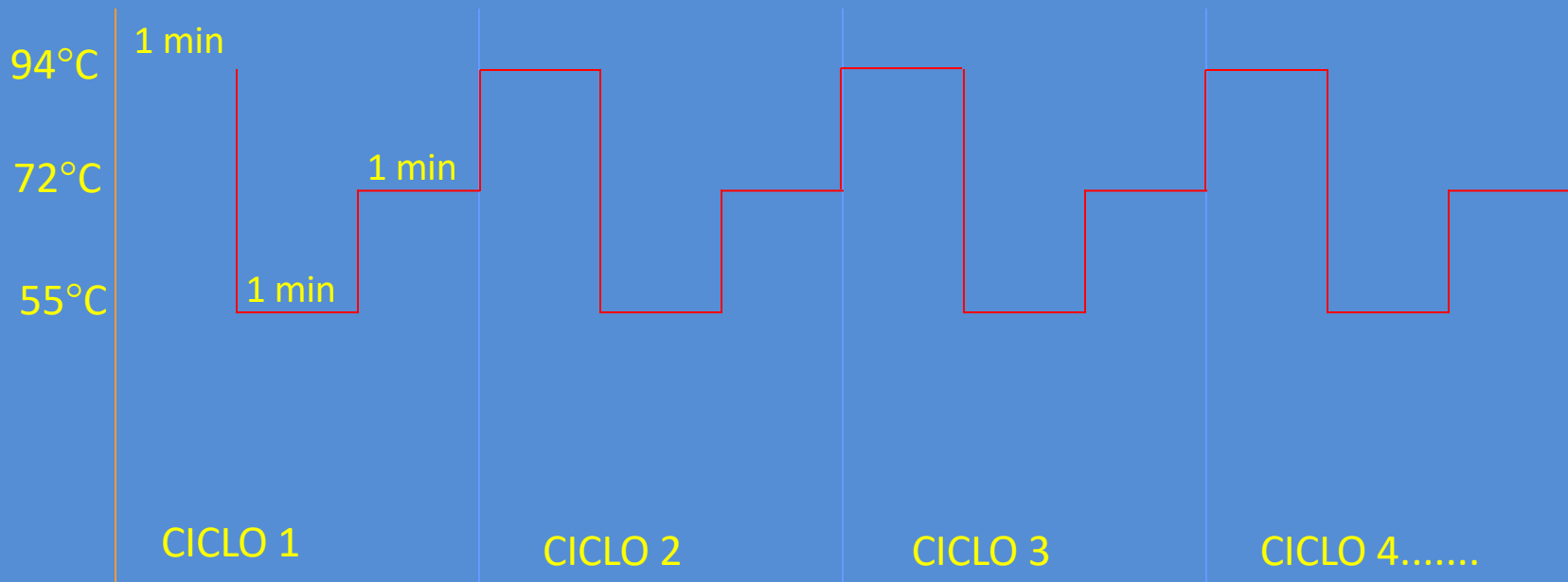
Tecnologia do PCR



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 1×10^{-4} to 2×10^{-5} errors per base pair.

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

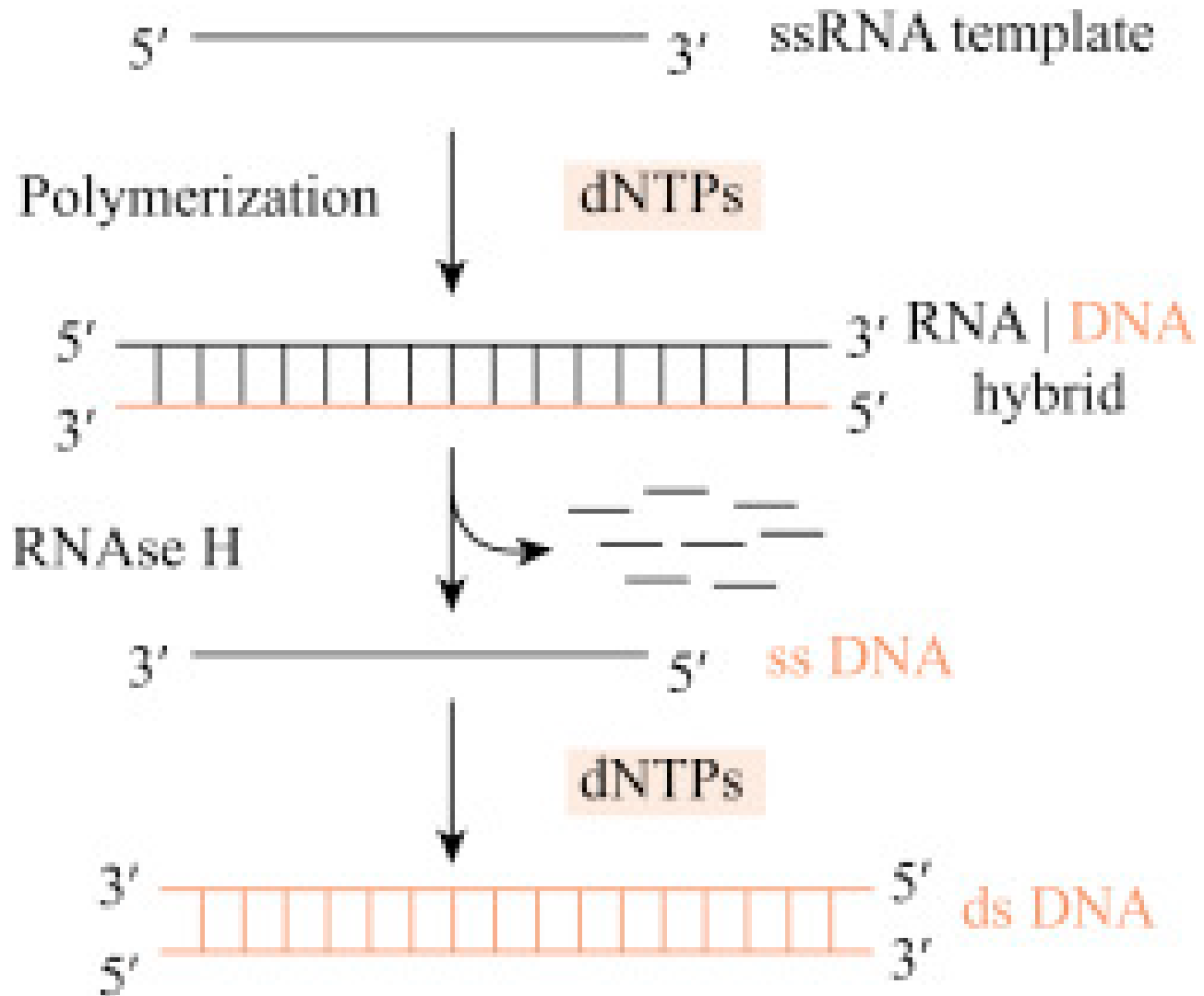
Vent is intermediate between Taq and Pfu.

| Polymerase | 3'→5' 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. |

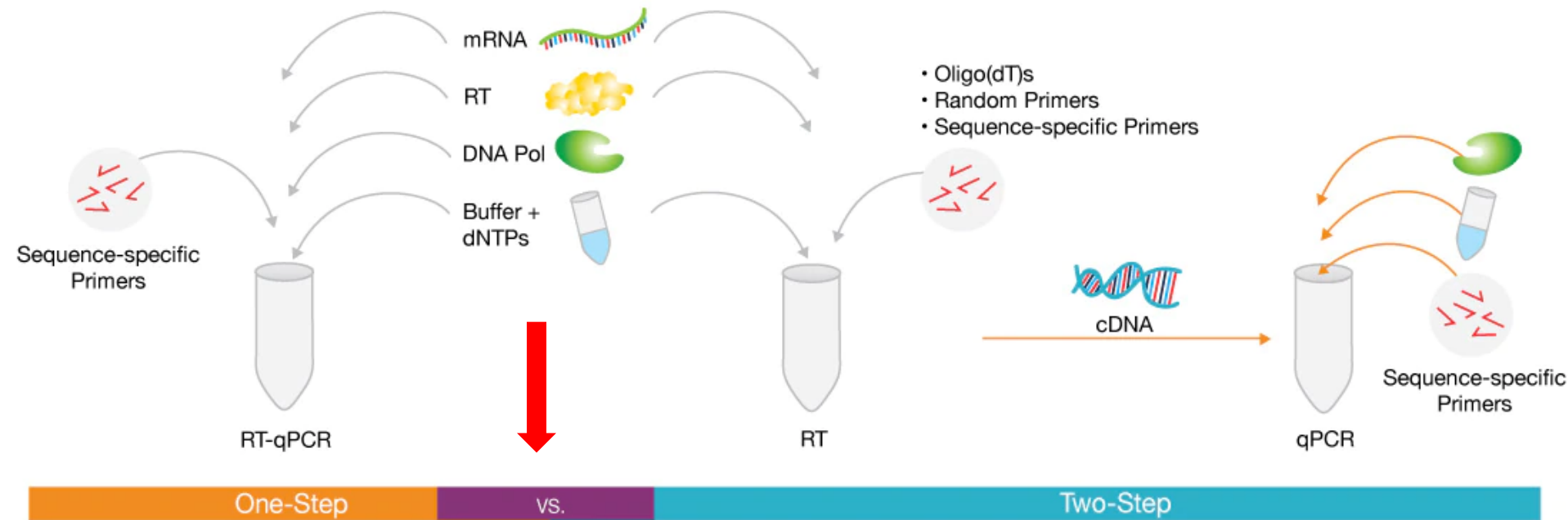
Enzimas RNA polimerase: Transcriptase Reversa

RNA-dependent DNA polymerase

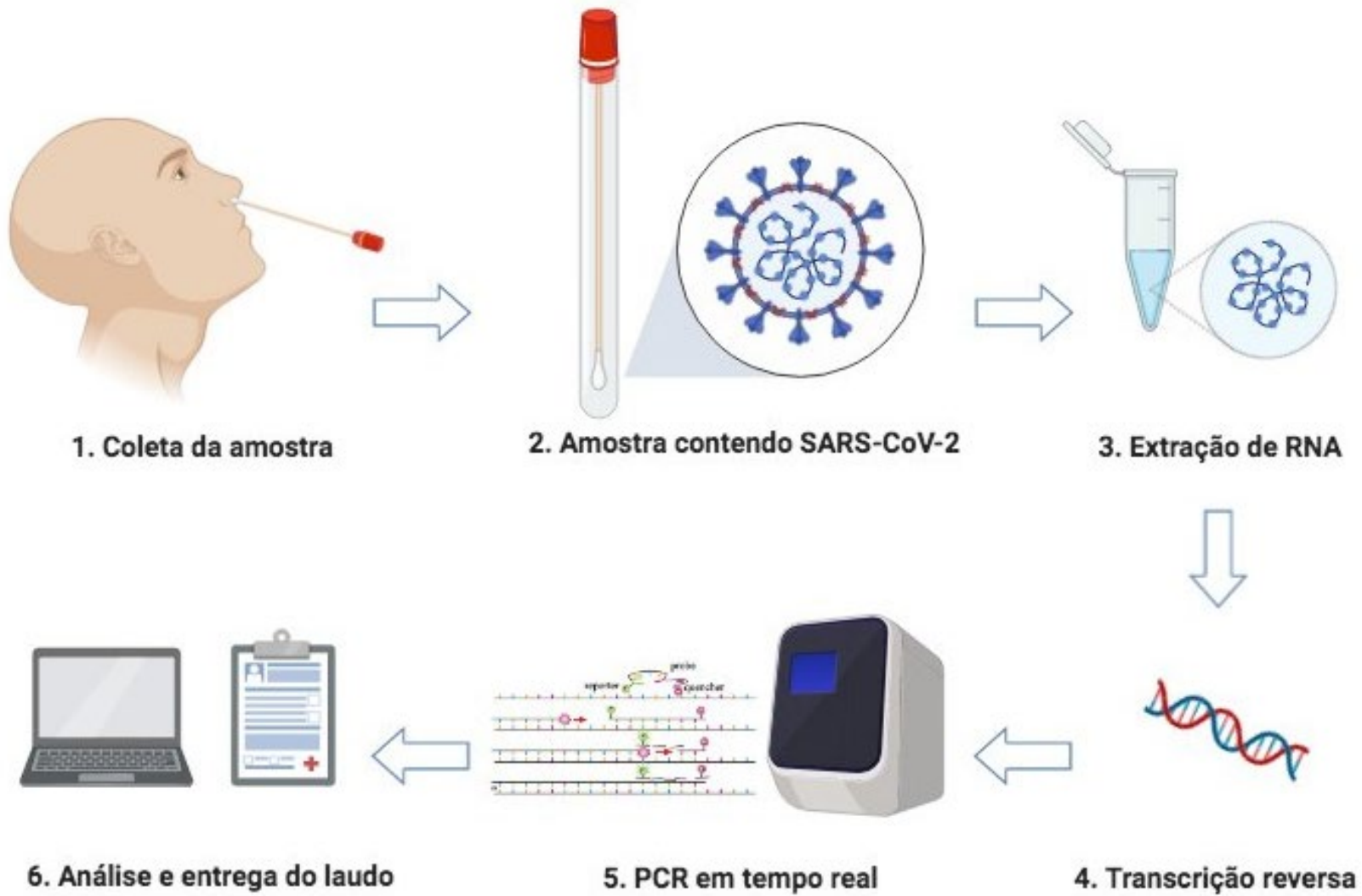
Reverse transcriptase (RT)



RT-PCR: simples etapa ou duas etapas



Diagnóstico COVID-19: RT-PCR

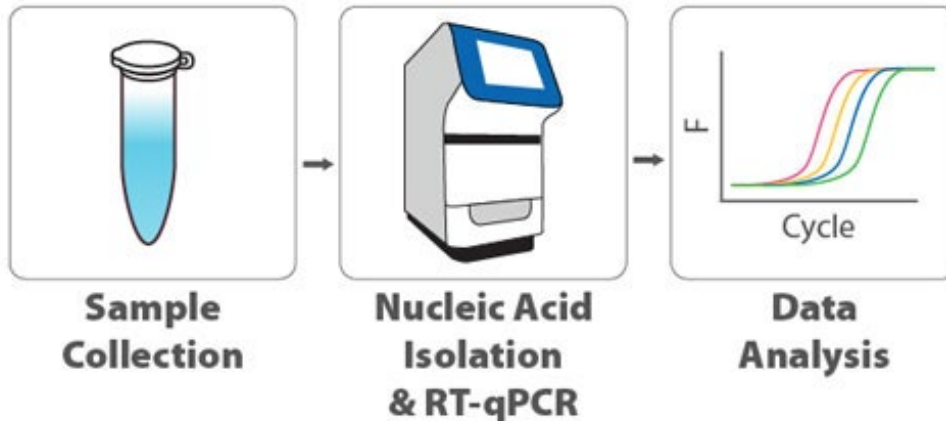
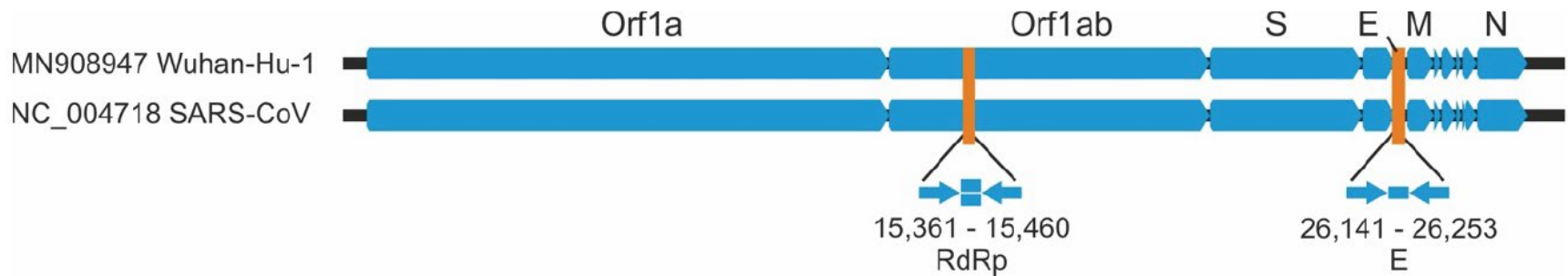


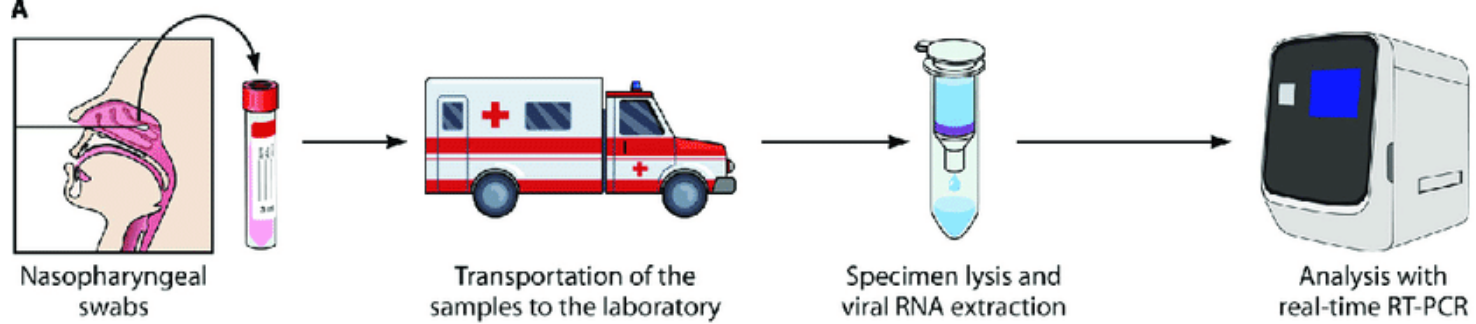
Diagnóstico COVID-19: RT-PCR

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

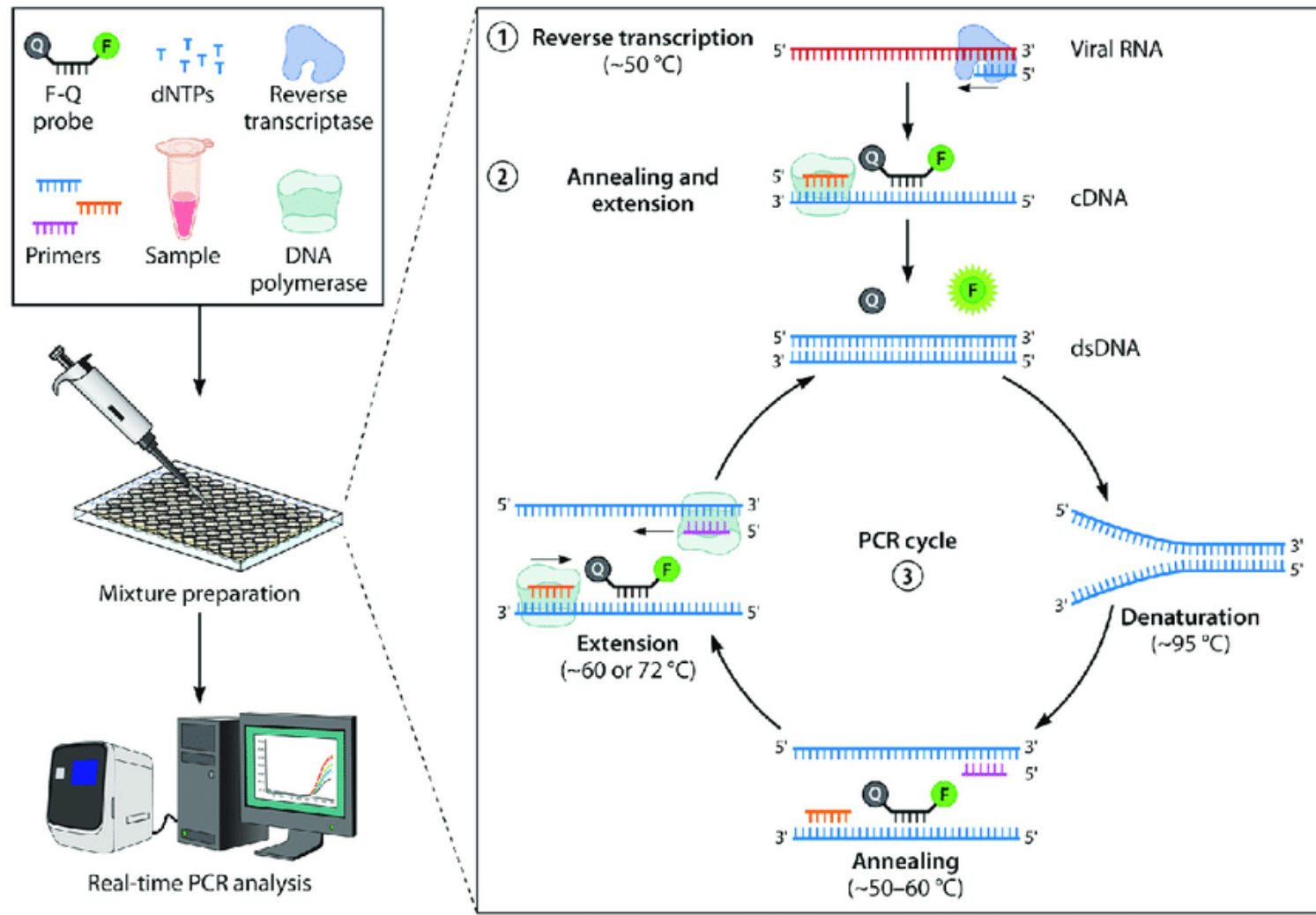
- **Extração do RNA** do material proveniente do Swab pelo método do Brazol
- RNA submetido a análise por PCR quantitativo (**qPCR ou PCR em Tempo Real**), usando um conjunto de três primers, em reações individuais, em duplicatas:

- 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.

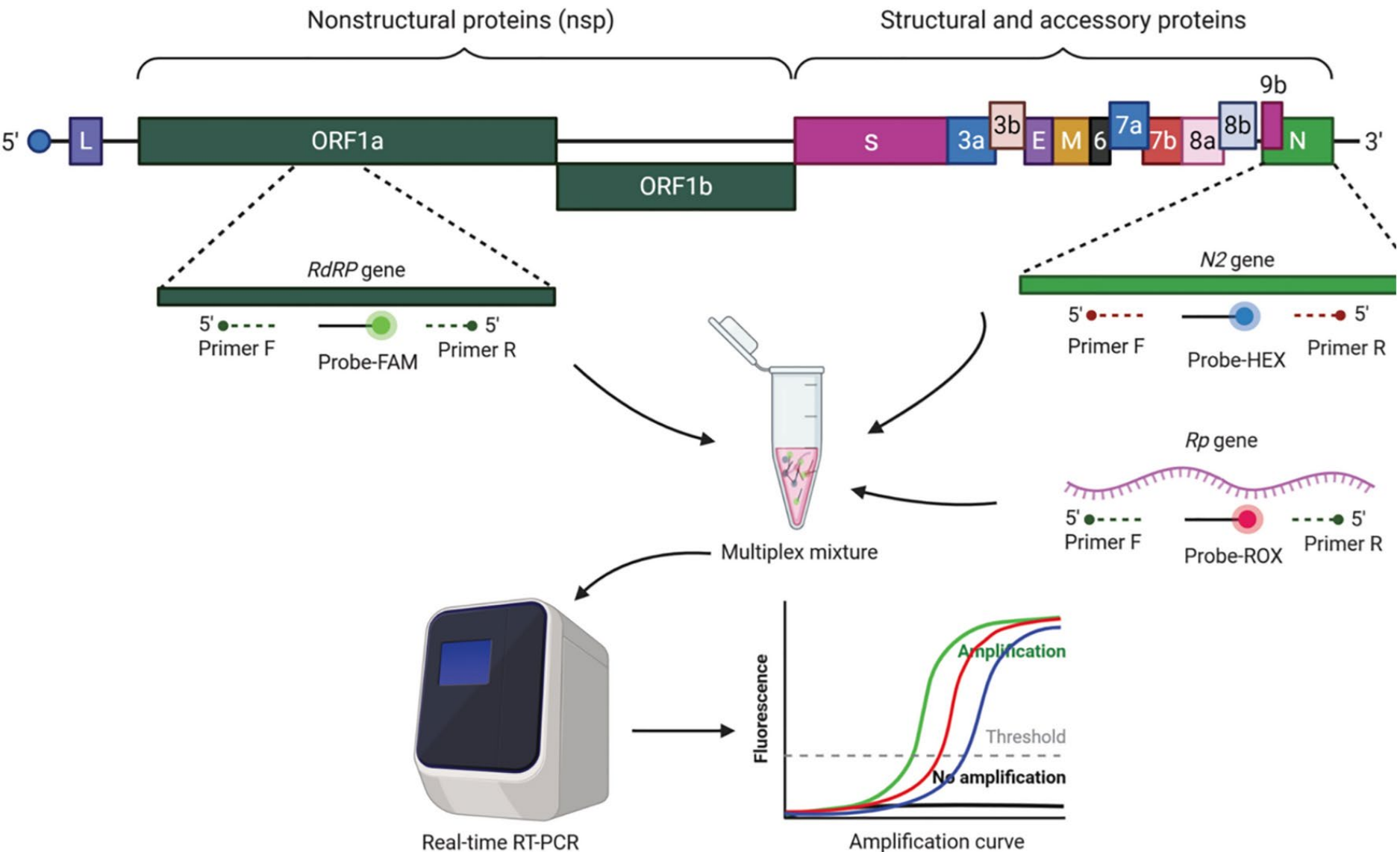




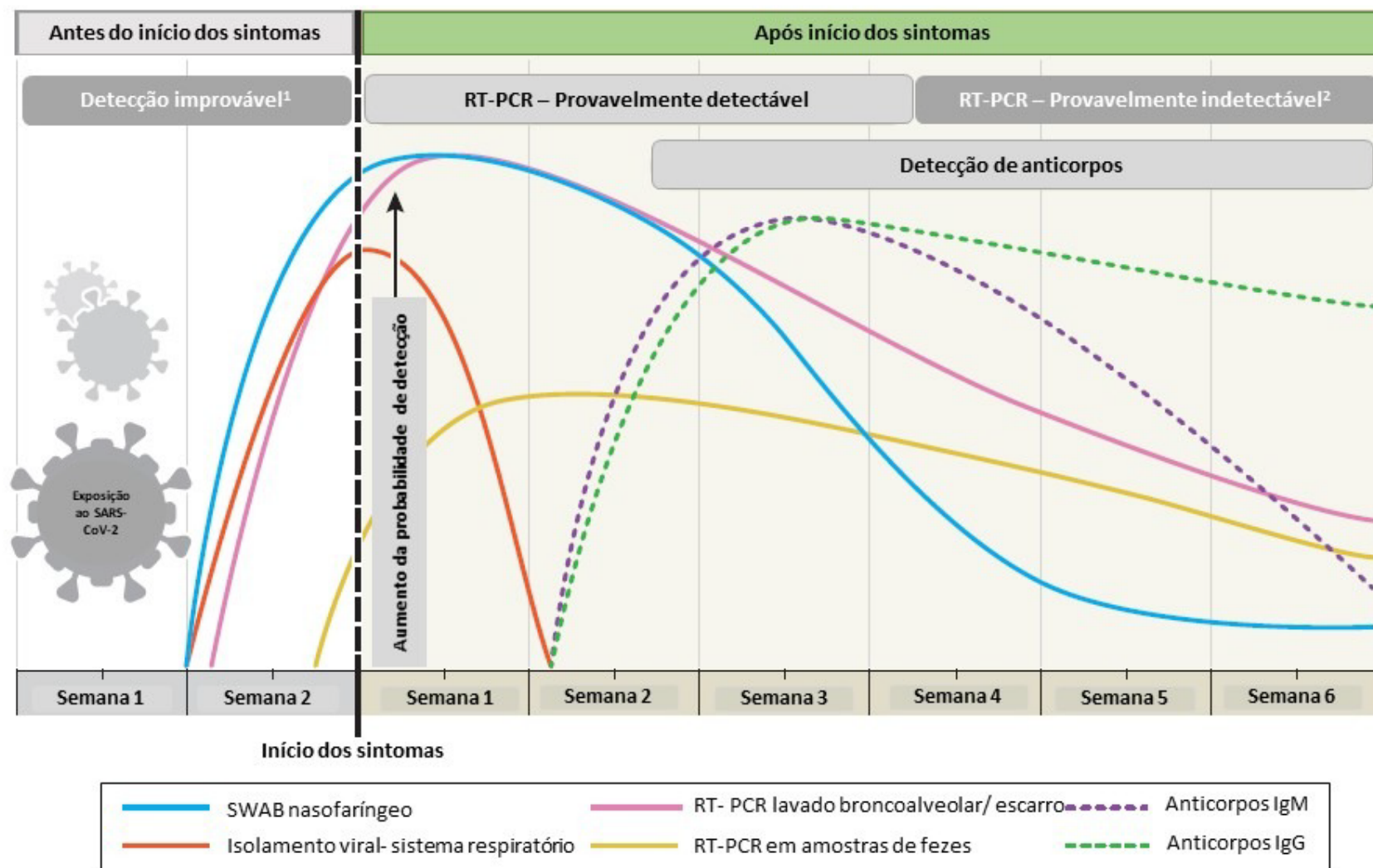
B



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 genoma:

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

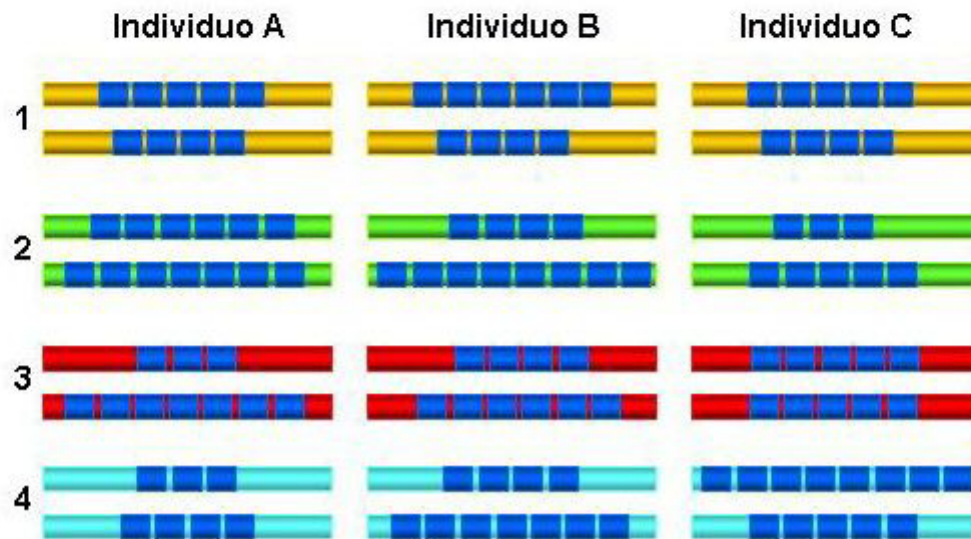
- **microsatélites (2 a 4 pb)**
 - **S.T.R. (short tandem repeats 2 – 5 pb)**
- **minisatélites (>5 pb)**

VNTRs (Variable Number Tandem Repeats)

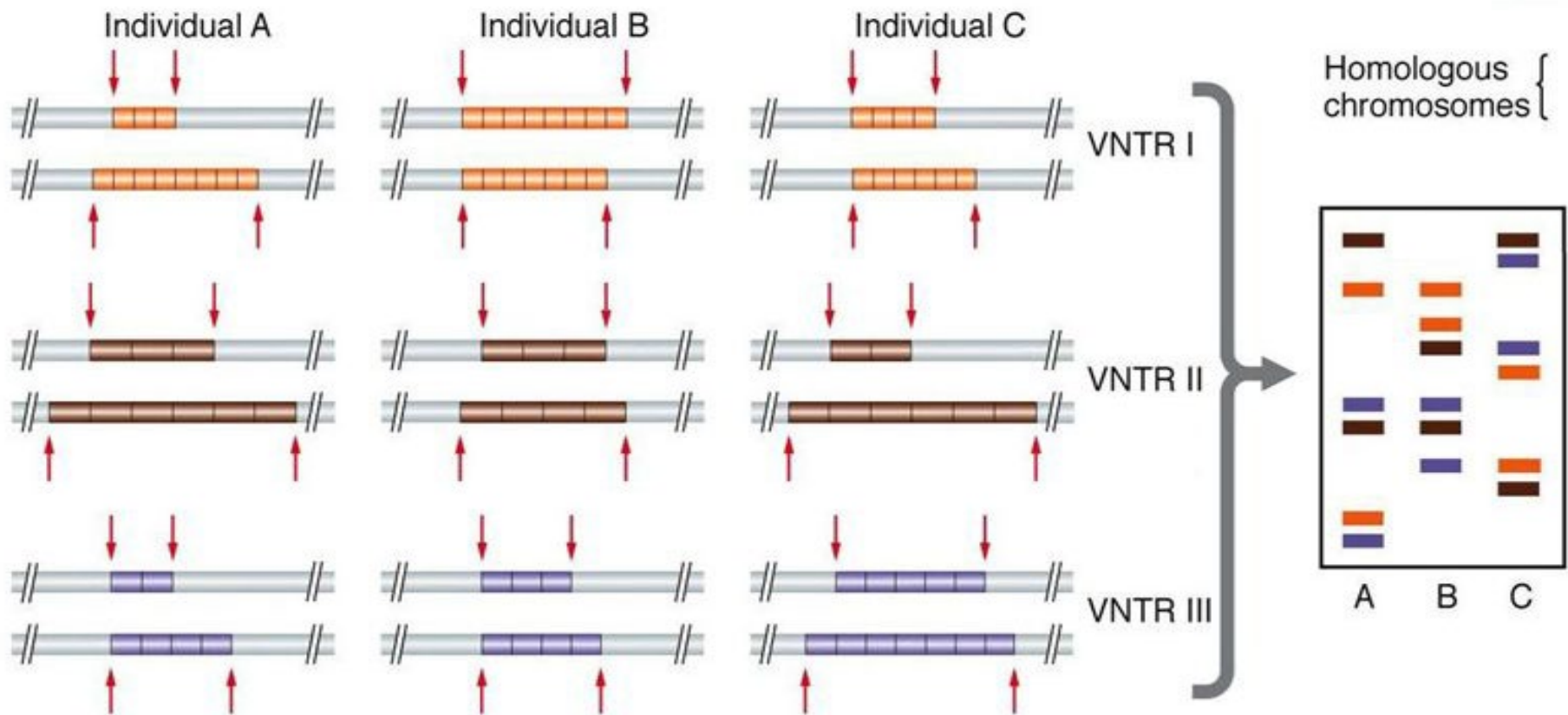
All human share about 99.99% of their DNA. In order to create a DNA fingerprint that is unique to each person scientists had to identify areas in the genome that are highly variable.

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

VNTRs: 4 pares de cromosomas homólogos en tres personas



Variable Number Tandem Repeat (VNTR)

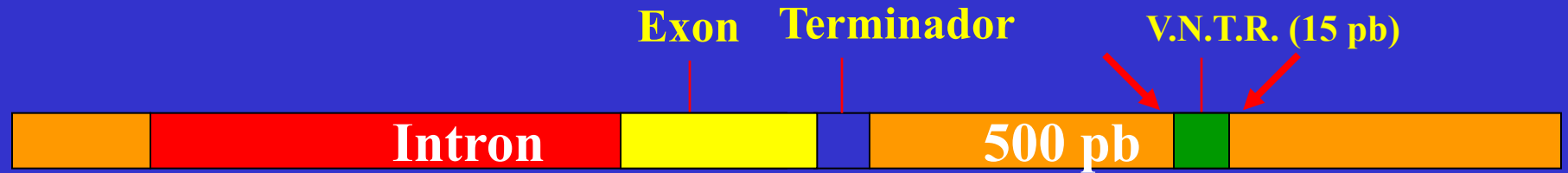


ApoB Utilização Prática

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

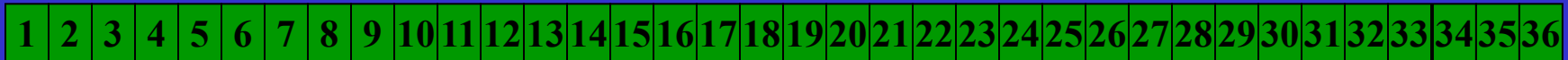


Alelo 1

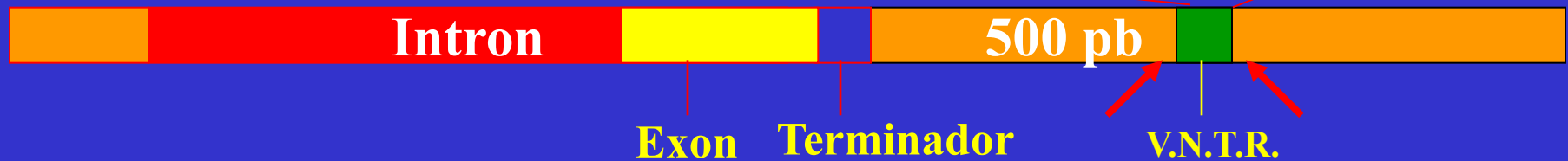


$15 \times 29 = 435 \text{ pb}$

Alelo 2

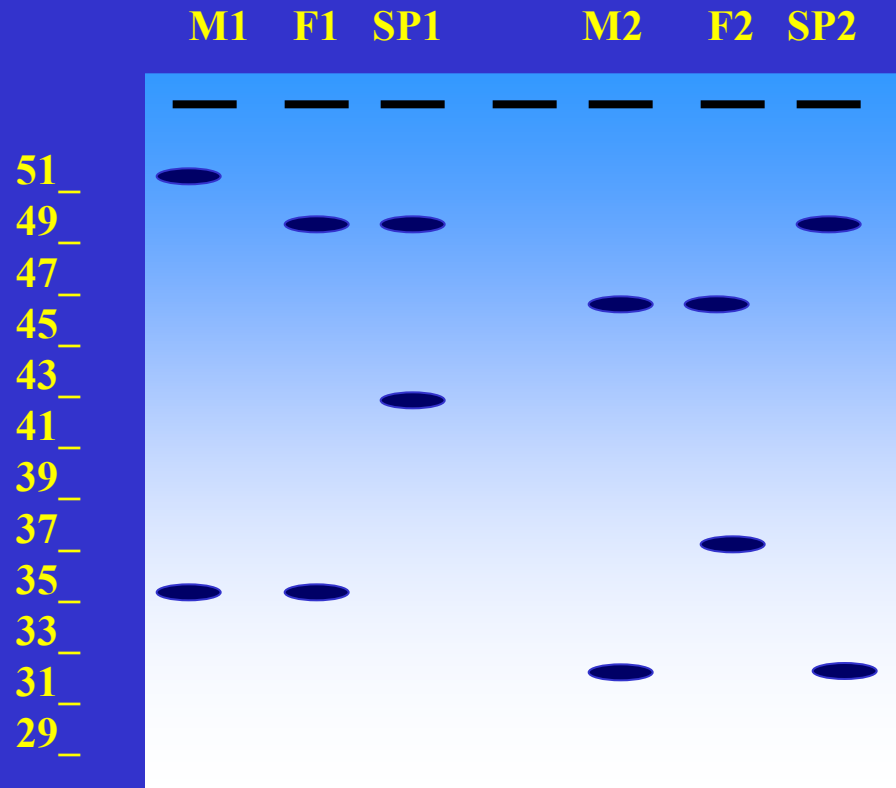


$15 \times 36 = 540 \text{ pb}$



Eletroforese para Genotipagem de 3'apoB

(-)



(+)

Polimorfismo do Gene ECA

(Enzima Conversora de Angiotensina)

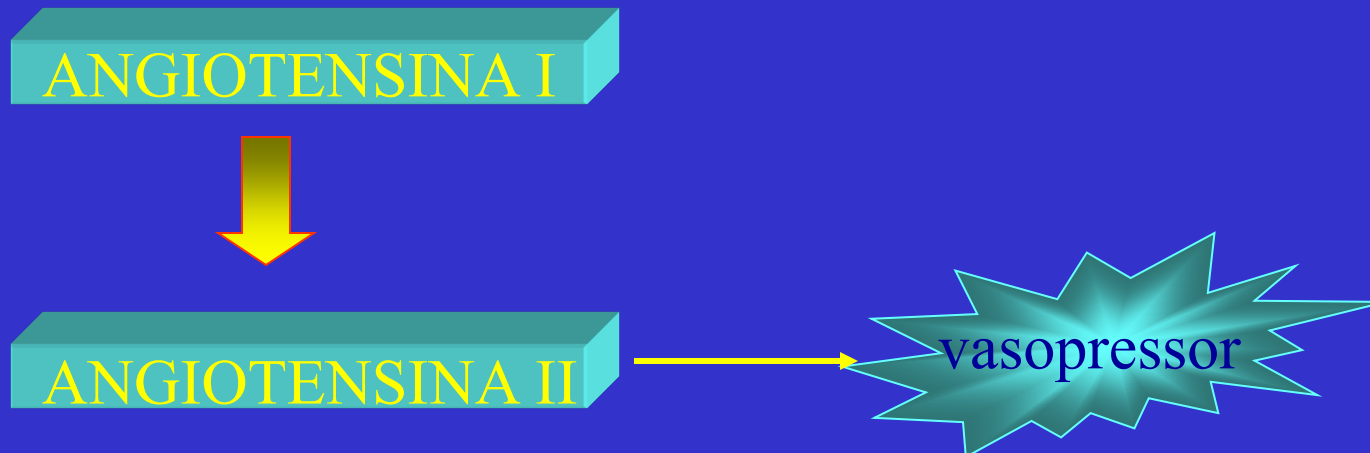
Localização do Gene *eca*:

- cromossomo 17
- posição 17q23

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

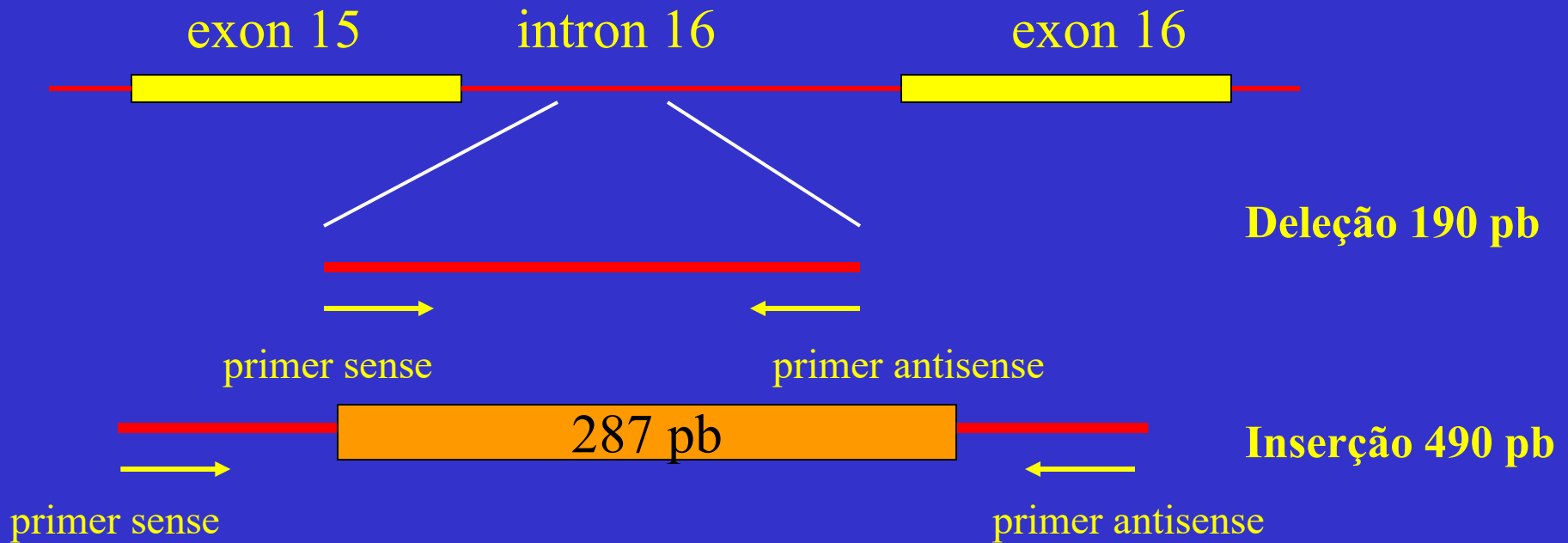
- intron 16 do gene *eca*

Função da Enzima Conversora de Angiotensina:

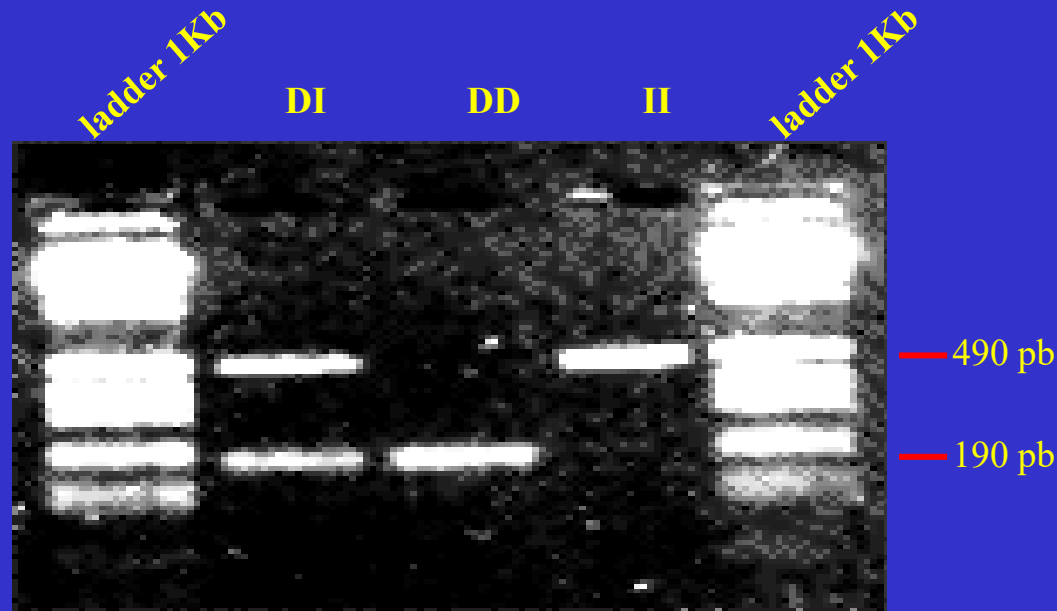


Polimorfismo do Gene ECA

(Enzima Conversora de Angiotensina)



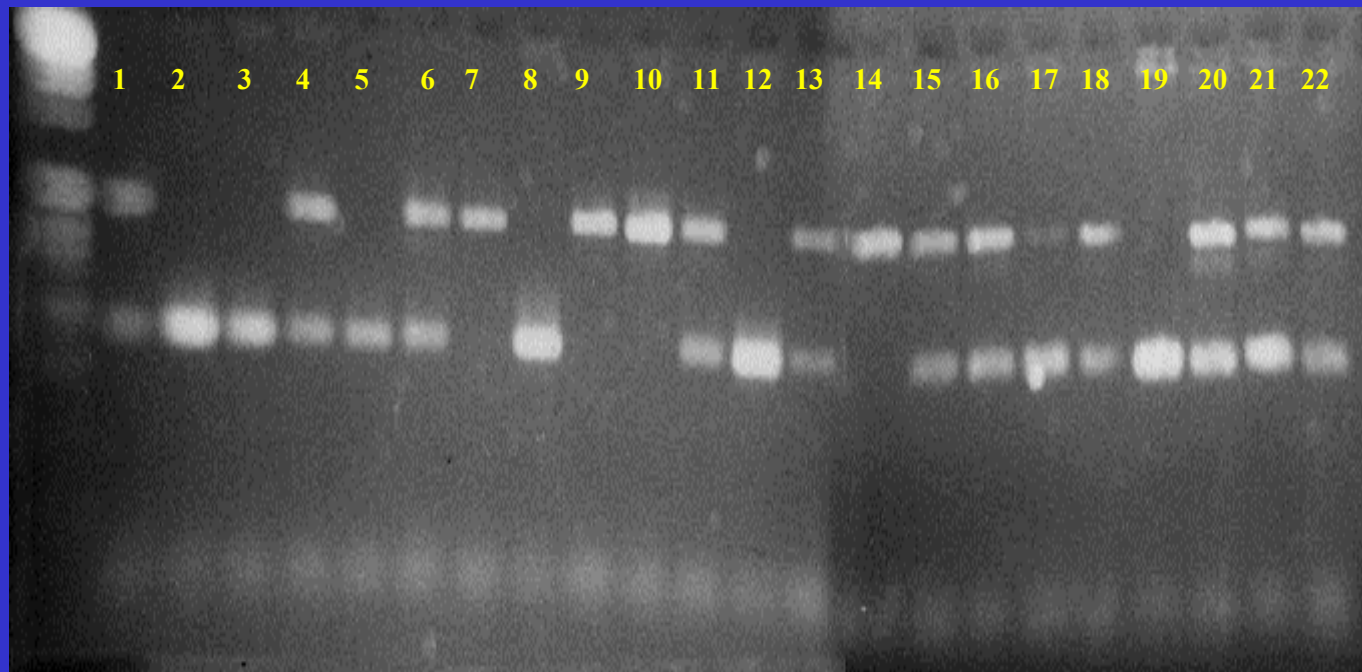
Polimorfismo do Gene ECA



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

ladder 1Kb

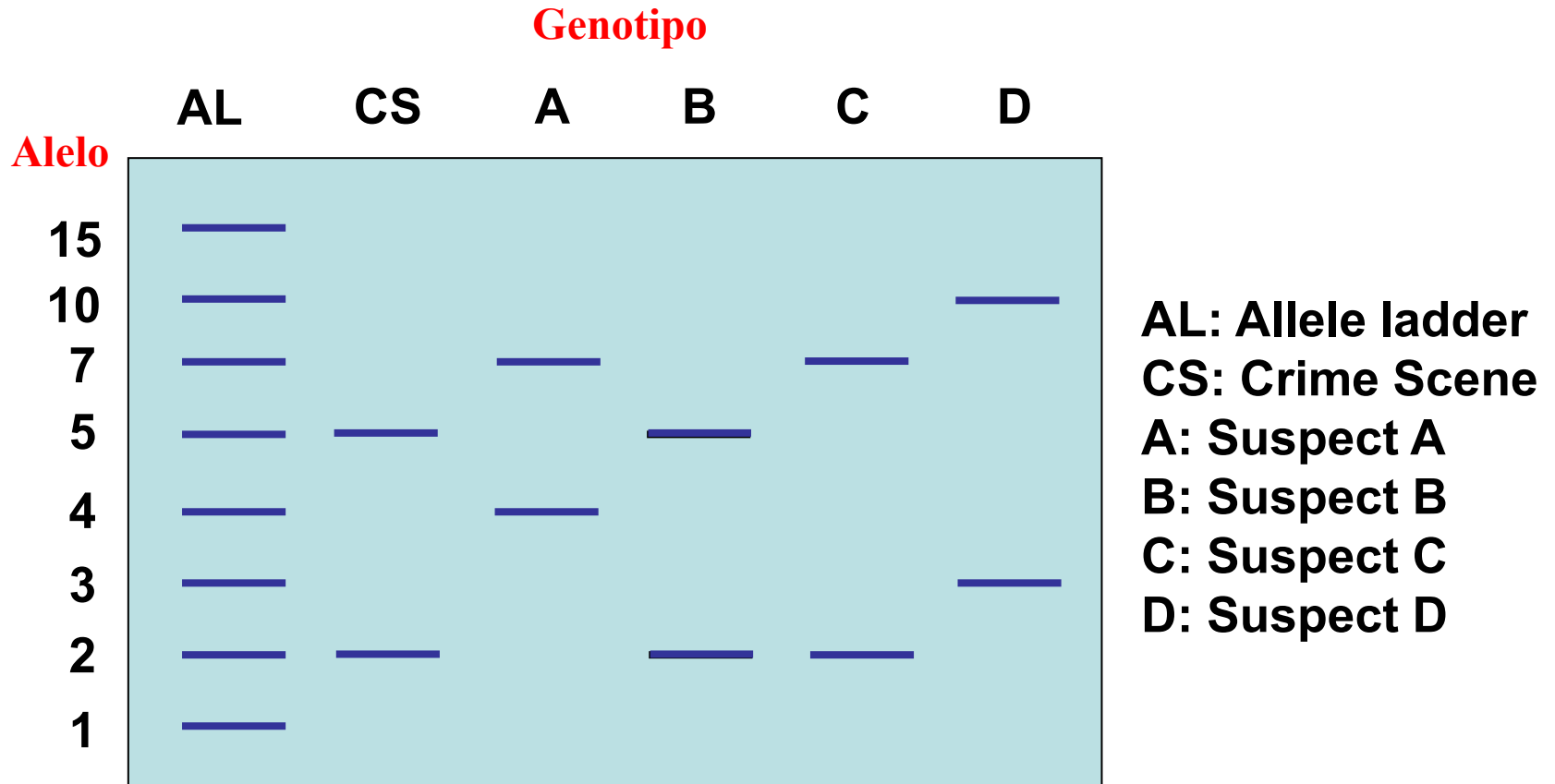


— 490 pb

— 190 pb

ID DD DD ID DD ID II DD II II ID DD ID II ID ID ID ID DD ID ID ID

Análise de amostra obtida na cena do crime



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 μ L de cada amostra *standard* e da sua amostra a um tubo limpo.

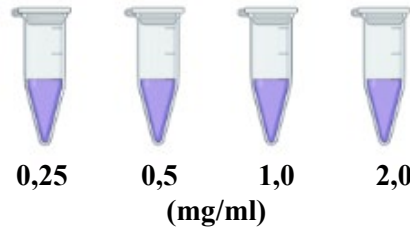
REALIZAR EM DUPLICATA OU TRIPLICATA;

4. Adicionar 950 μ L 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

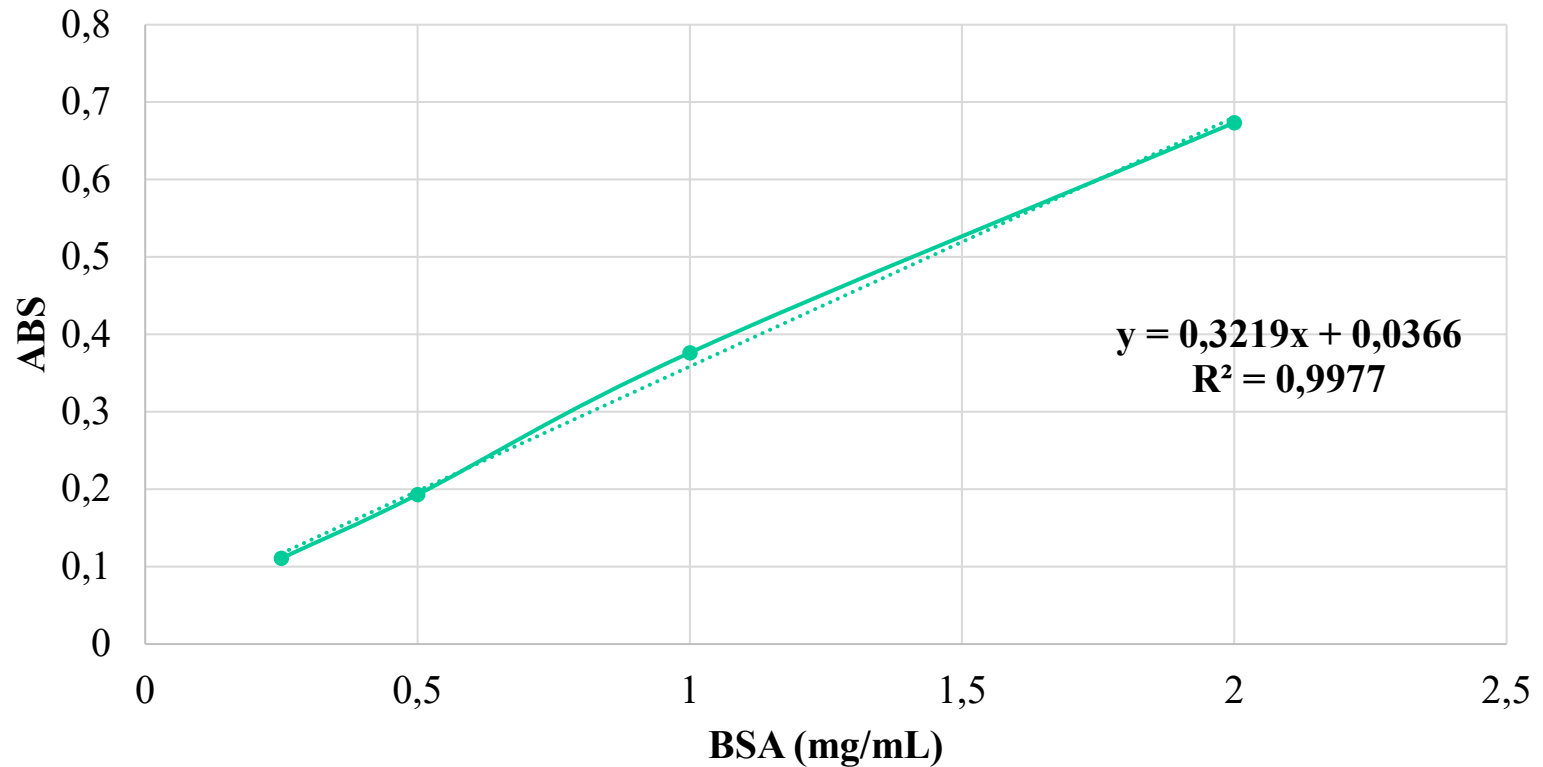


BSA (Albumina de Soro Bovino)



5 minutos (reação)
595 nm (leitura)

Curva Padrão



Ensaio:

50 μ L de Amostra + 950 μ L 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.

$DO_{260} = 1$ equivale a 50 ug/mL de dsDNA

Obrigado

fscha@usp.br



USP – 2º Semestre 2025