

Débora de Oliveira Lopes
Simone da Fonseca Pires
(Organizadoras)

Práticas de

Biologia

Molecular

Débora de Oliveira Lopes
Simone da Fonseca Pires
(Organizadoras)

Práticas de

Biologia

Molecular

Atena
Editora
Ano 2022

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Gabriel Motomu Teshima

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto
Prof^o Dr^a Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Prof^o Dr^a Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof^o Dr^a Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Prof^o Dr^a Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Prof^o Dr^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof^o Dr^a Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^o Dr^a Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Prof^o Dr^a Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Prof^o Dr^a Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^o Dr^a Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Prof^o Dr^a Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Prof^o Dr^a Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^o Dr^a Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Prof^o Dr^a Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Prof^o Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Prof^o Dr^a Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Prof^o Dr^a Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof^o Dr^a Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Prof^o Dr^a Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Prof^o Dr^a Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Prof^o Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^o Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^o Dr^a Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Práticas de biologia molecular

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadoras: Débora de Oliveira Lopes
Simone da Fonseca Pires

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P912 Práticas de biologia molecular / Organizadoras Débora de Oliveira Lopes, Simone da Fonseca Pires. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-258-0008-0

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.080221703>

1. Biologia molecular. I. Lopes, Débora de Oliveira (Organizadora). II. Pires, Simone da Fonseca (Organizadora). III. Título.

CDD 572.8

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br



Atena
Editora
Ano 2022

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



APOIO



Universidade Federal
de São João del-Rei



DEDICATÓRIA

A todos os pesquisadores, professores e estudantes que dedicam parte de suas vidas ao ensino de ciências e à pesquisa nas universidades públicas federais.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de prestar homenagem aos Professores, que proporcionam, cada dia mais, um ensino de qualidade e excelência nas universidades federais brasileiras. Nesse sentido, agradecemos à Universidade Federal de São João Del Rei por criar e equipar o laboratório de Biologia Molecular com materiais e insumos de qualidade para o desenvolvimento das aulas práticas. Em especial, agradecemos ao professor Dr. Eduardo Sérgio da Silva, que durante sua gestão como diretor do Campus Centro-Oeste (UFSJ-CCO) não poupou esforços para que os estudantes tivessem um ensino de qualidade. Agradecemos também o apoio técnico prestado pelo servidor Dr. Flávio Martins de Oliveira, que prepara e testa todas as aulas práticas com zelo e carinho, para que elas sejam desenvolvidas com êxito pelos estudantes. Agradecemos ainda, o apoio do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (UFSJ), da CAPES e do grupo PET Bioquímica (MEC) por todo auxílio na construção, produção e divulgação deste livro.

EPÍGRAFE

“Saber que ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção” (Paulo Freire).

“Não há docência sem discência, as duas se explicam e seus sujeitos, apesar das diferenças que os conotam, não se reduzem à condição de objeto, um do outro. Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender” (Paulo Freire).

PREFÁCIO

Desde a descoberta da estrutura do DNA em meados do século XX, a Biologia Molecular avançou de forma rápida e surpreendente, alcançando resultados até então inimagináveis no mundo científico. O marco inicial da sua trajetória foi, sem dúvida, o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, que possibilitou desvendar o genoma de diversos organismos, dentre eles o humano, cujo rascunho foi anunciado em 26 de junho de 2000 por Francis Collins e J. Craig Venter. Desde então, o conhecimento gerado na área da Biologia Molecular não parou de crescer, culminando em novas técnicas e estratégias de estudo do DNA ou mesmo no aperfeiçoamento de técnicas já padronizadas.


Se no ano de 2000 existiam poucas unidades de genomas depositados, atualmente existem mais de 60.000 genomas disponíveis no mais importante banco de dados de acesso público de informações genômicas, o NCBI (National Center for Biotechnology Information). Apesar da notória evolução e alcances tecnológicos, conhecer os princípios básicos que regem a Biologia Molecular (fluxo da informação genética) é de suma importância para se entender técnicas mais refinadas, como a edição genética (CRISPR-CAS9). Diante desse contexto, o objetivo deste livro é trazer de forma clara e objetiva, técnicas corriqueiras de Biologia Molecular para serem realizadas em aulas práticas.

No primeiro capítulo do livro *Práticas em Biologia Molecular* é abordado a importância da realização de aulas práticas no ensino e fixação do conhecimento. O segundo capítulo aborda a importância do planejamento de experimentos, o conceito e princípios de boas práticas laboratoriais e de biossegurança no laboratório. Uma vez estabelecidos esses conceitos, os capítulos subsequentes tratam das aulas práticas a serem realizadas no ambiente laboratorial. Ao todo são apresentadas 15 práticas em formato de roteiro, contendo uma breve introdução, os objetivos da técnica, materiais e métodos, resultados e discussão. Além disso, também é indicado um material de apoio que visa proporcionar melhor compreensão acerca dos temas abordados. O livro é finalizado com um tópico apresentando os avanços em Biologia Molecular nas últimas décadas.

Esperamos que esse livro possa ajudar e incentivar docentes e discentes do curso de Bioquímica, Biomedicina, Ciências Biológicas, e outros cursos de graduação e pós-graduação, na fascinante jornada da Biologia Molecular, servindo de apoio para o ensino e inspiração para futuras pesquisas.

SUMÁRIO

O ENSINO DE BIOLOGIA MOLECULAR E A IMPORTÂNCIA DOS EXPERIMENTOS PRÁTICOS.....	1
BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS.....	3
BIOSSEGURANÇA.....	5
BIOINFORMÁTICA NO ENSINO DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	9
PIPETAGEM.....	18
SÍNTESE DE INICIADORES (PRIMERS).....	22
EXTRAÇÃO DE DNA HUMANO.....	27
PRECIPITAÇÃO E DOSAGEM DE DNA.....	31
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	35
DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	40
CLONAGEM EM PLASMÍDEO.....	44
ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE E COLORAÇÃO.....	49
ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E COLORAÇÃO.....	56
PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES.....	61
TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA (ELETROPORAÇÃO).....	67
EXTRAÇÃO DNA PLASMIDIAL (MINIPREP).....	72
EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	76
GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.....	80
AVANÇOS EM BIOLOGIA MOLECULAR.....	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS: A CIÊNCIA É CONSTRUÍDA COM A SOMA DE VÁRIOS ESFORÇOS.....	91
SOBRE OS AUTORES.....	92

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.080221703>

O ENSINO DE BIOLOGIA MOLECULAR E A IMPORTÂNCIA DOS EXPERIMENTOS PRÁTICOS

Se por um lado ensinar o dogma central da Biologia Molecular pode ser complexo e exigir profunda fundamentação teórica, a fixação do conhecimento através da realização de práticas experimentais pode dar vida e sentido à molécula central da disciplina, o DNA. Além de melhorar o entendimento, as aulas práticas também despertam o interesse dos estudantes pela pesquisa científica, sendo um importante motivador e engajador de alunos em projetos de iniciação científica nas universidades. A experimentação possibilita diminuir a distância do aprendizado teórico e sua compreensão de maneira aprofundada, facilitada e motivacional^[1].

Não há dúvidas de que a realização das aulas práticas seja uma ferramenta facilitadora do processo de ensino e aprendizado, entretanto, ela não se restringe à apenas essa função. A experimentação prática pode desenvolver habilidades que vão além do conteúdo a ser ministrado. Através do uso de metodologias alternativas de ensino pode-se também desenvolver o raciocínio científico e senso crítico, promover a interação entre os estudantes e com o professor, entre outros.

No modelo de ensino “aprendendo fazendo” cabe ao professor, enquanto agente mediador do conhecimento, incentivar e estimular os estudantes, promovendo oportunidades durante a aula para que eles se sintam parte do processo e possam discutir ideias e aprimorar conceitos. Dessa forma, o processo de ensinar e aprender torna-se muito mais dinâmico e prazeroso, principalmente, quando se trata de um tema complexo como o dogma central da transmissão da informação genética^[2].

As aulas práticas envolvem três etapas igualmente importantes: a preparação do experimento, a sua condução e por último a interpretação dos resultados obtidos. Cada uma destas etapas contém elementos importantes para a construção do aprendizado e desenvolvimento de novas habilidades. A primeira etapa é geralmente realizada com a ajuda de um técnico de laboratório, que verifica os reagentes e equipamentos a serem usados. O suporte de um técnico qualificado e com experiência na preparação das aulas é de extrema importância para o sucesso das práticas. A segunda etapa consiste em ler o roteiro, entender a teoria e realizar o passo a passo da prática, sempre atento aos detalhes contidos nas instruções. Nesse momento, o aluno é convidado a fazer parte do experimento e atuará de forma autônoma. Após a finalização do experimento é realizada a última etapa do processo, que consiste na análise e interpretação dos resultados. Quando conduzida de forma conjunta e participativa, essa etapa torna-se extremamente rica, e um importante espaço para o crescimento do grupo. É importante ressaltar que, mesmo padronizadas, as aulas práticas podem não alcançar os resultados esperados e, nesse momento, é fundamental que o professor intervenha e convide os alunos a participar de uma discussão a respeito dos problemas enfrentados e as possíveis soluções para aquele experimento.

Nesse cenário, o livro “*Práticas em Biologia Molecular*” almeja promover e estimular o ensino de Biologia Molecular e apresentar as principais técnicas de manipulação do DNA e suas aplicações na ciência. Cada uma das práticas aqui apresentada foi cuidadosamente planejada e faz parte da rotina de muitos laboratórios de Biologia Molecular. Os roteiros destas aulas práticas foram criados, inicialmente, para a disciplina Práticas em Biologia Molecular, do curso de Bioquímica da Universidade Federal de São João del Rei e podem ser adaptados a várias outras disciplinas.

REFERÊNCIAS

[1] Souza, CM; Santos, CB. Aulas Práticas no ensino de Biologia: Desafios e Possibilidades. Id online: Revista Multidisciplinar e de Psicologia, v. 13, n. 45(1), p.426-433, 2019.

[2] Silva, VG. A importância da experimentação no ensino de química e ciências. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista – UNESP. Bauru/SP, 2016.

[3] Freire, P. Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa. São Paulo, 25 ed: p.52, 2004.

BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) são estabelecidas pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) para garantir qualidade, organização e condições mais adequadas aos usuários no ambiente laboratorial. Com o propósito de assegurar a aplicabilidade dos conceitos da BPL, é adotado nos laboratórios os Procedimentos Operacionais Padrão (POP), que visam a padronização das atividades realizadas neste ambiente, assegurando a qualidade e controle do experimento realizado e minimizando os riscos e gastos inadequados^[1]. É importante lembrar que embora algumas regras sejam gerais, cada laboratório pode ter suas peculiaridades quanto ao funcionamento, fluxo, paramentação, acesso, entre outros. Dessa forma, antes de ingressar em qualquer laboratório é indispensável que os usuários recebam treinamento adequado, minimizando os riscos individuais e coletivos naquele espaço.

Os usuários do laboratório devem sempre primar pela boa convivência neste ambiente e respeitar todas as normas e regras vigentes. Além disso, é importante que os usuários façam parte da rotina de trabalho, colaborando com a organização do espaço e participando de todas as tarefas coletivas como: limpeza de equipamentos, preparação de soluções, identificação de reagentes, entre outras.

O laboratório não é, e nunca será um lugar de lazer ou conversa, pois as distrações podem trazer riscos à saúde e causar prejuízos aos experimentos realizados. Dessa forma, é importante que todos os usuários mantenham o máximo de silêncio e concentração durante a realização dos experimentos, próprios ou alheios.

Também faz parte das boas práticas laboratoriais atitudes simples como identificar o material utilizado (nome, número, lote, data), estar sempre atento quanto à forma correta de armazenamento das substâncias, verificar datas de validade dos reagentes, funcionamento adequado dos equipamentos, entre outros. É extremamente importante que os usuários do laboratório fiquem atentos ao ambiente onde estão trabalhando e caso seja detectado qualquer problema, comunicar imediatamente ao coordenador ou responsável pelo laboratório para que as providências sejam tomadas.

O primeiro passo de qualquer experimento é o seu planejamento. Essa simples atitude pode evitar surpresas e imprevistos, reduzindo riscos e prejuízos. Um experimento de sucesso, certamente passa por um rigoroso planejamento na leitura e entendimento das etapas realizadas, na escolha dos reagentes, tempo de realização e verificação dos equipamentos e sua disponibilidade. Planeje seu experimento com calma! Leia os protocolos, faça anotações, converse com outros membros do laboratório e com seu orientador, e sempre respeite as regras e ética no ambiente de trabalho/estudo^[2].

1 | USO DE EQUIPAMENTOS

Antes de utilizar qualquer equipamento no laboratório é importante fazer um treinamento com o técnico responsável, para que todas as informações e regras de utilização sejam esclarecidas. Além disso, é também aconselhável realizar o estudo prévio do manual de funcionamento de cada equipamento e dos POPs do laboratório.

A maioria dos laboratórios tem tomadas com voltagem de 110v e 220v, antes de usar o equipamento certifique-se que ele está ligado à tensão correta, evitando que ele seja danificado. Quando estiver realizando experimentos longos, verifique constantemente se está tudo certo e quando precisar se ausentar, deixe sempre alguém ciente do experimento em andamento. E por último, sempre que verificar algo diferente como: cheiro de queimado ou sons diferentes do usual, desligue o equipamento e verifique com o responsável do laboratório o que deve ser feito^[3].

REFERÊNCIAS

[1] Borba, CM; Costa, MAF; Pereira, MEC; et al. Biossegurança e Boas Práticas Laboratoriais. *In*: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR (org). Conceitos e Métodos para a Formação de profissionais em laboratório de Saúde. Rio de Janeiro - RJ: EPSJV; IOC, 2009.

[2] Barker K. At the Bench: A Laboratory Navigator. Updated Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.

[3] Almeida MFC. Boas Práticas de Laboratório. 2ª ed. São Caetano do Sul - SP: Difusão Editora, 2013.

Links:

Treinamento para o retorno aos Laboratórios de Pesquisa pós pandemia COVID-19. https://www.youtube.com/watch?v=OeA-kIgu7Ok&feature=emb_logo

Boas Práticas Laboratoriais - Parte 1. https://www.youtube.com/watch?v=Pvnq7_t_hxM

Boas Práticas Laboratoriais - Parte 2. <https://www.youtube.com/watch?v=l7xD5TkEyOI>

BIOSSEGURANÇA

A Biossegurança é um conjunto de normas, técnicas e equipamentos que, em conjunto, visam a prevenção, controle, redução ou eliminação de possíveis riscos para a saúde humana, animal, vegetal e para o meio ambiente ^[1].

A responsabilidade legal pela segurança no ambiente de trabalho é atribuída aos administradores da instituição, porém, os usuários do ambiente laboratorial têm papel fundamental neste processo, visto que são eles que deverão seguir as normas de Biossegurança adotadas. Além disso, as instituições de pesquisa também designam uma comissão de Biossegurança que será responsável por implementar as normas de segurança preconizadas pelos órgãos competentes, padronizar e normatizar procedimentos de segurança, identificar e classificar áreas de risco, estabelecer programas de treinamento, verificar o descarte de resíduos e investigar acidentes ^[2].

Os cuidados com a biossegurança se estendem além das boas práticas laboratoriais. Além das normas de conduta, são necessários cuidados quanto à segurança individual e coletiva de todos os usuários do ambiente. Conforme a peculiaridade de cada laboratório será necessário adotar equipamentos específicos de proteção individual (EPIs) e/ou coletiva (EPCs). Os EPIs são essenciais para garantir a proteção individual de modo a evitar o contato do usuário com agentes infecciosos ou contaminados, evitar acidentes químicos com agentes tóxicos ou corrosivos, entre outros. Já os EPCs são essenciais para a proteção coletiva do laboratório, como, por exemplo: cabines de segurança, capelas de fluxo, chuveiros e lava olhos de emergência, extintores, etc.

O descarte de materiais, reagentes e amostras também é tratado pela comissão de biossegurança e deve ser realizado de maneira apropriada, respeitando os protocolos estabelecidos. Geralmente existe um local específico para o descarte ou acondicionamento de cada material nos laboratórios e dentro da instituição, evitando contaminação humana, animal e ambiental.

A comissão de Biossegurança e a instituição deve estabelecer um fluxograma de atendimento a acidentes, com todos os passos a serem seguidos e realizar treinamentos periódicos com todos os usuários. É importante lembrar que cada categoria de acidente pode demandar um procedimento específico que mitigue não só a perda material, mas zele, acima de tudo, pela vida dos usuários ^[3, 4].

No Brasil, o órgão responsável pelo controle das atividades realizadas com DNA recombinante é a CTNBio, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, criada pela Lei de Biossegurança (Lei nº 8.974 de 1995) no âmbito do Ministério da Ciência e Tecnologia ^[3]. A aplicação da biossegurança na biologia molecular ganhou mais força após o advento da tecnologia do DNA recombinante, que permitiu a obtenção de organismos geneticamente modificados com características artificiais. Neste caso, existe o risco de transferência do material genético utilizado para a produção desses organismos geneticamente modificados

(OGMs) ou mesmo contaminação com os organismos recombinantes [1]. Dessa forma, todos os laboratórios que trabalham com OGMs devem ser certificados pela CTNBio, para poderem exercer suas pesquisas/atividades de forma correta.

1 | FLUXOGRAMA DE ATENDIMENTO A ACIDENTES

A utilização do laboratório de maneira segura e correta, seguindo os protocolos de segurança e boas práticas, pode minimizar ou até mesmo extinguir alguns riscos, entretanto, é importante a sensibilização dos usuários quanto ao risco inerente a esse ambiente. Existem diferentes origens de riscos que podem ser de natureza química, física, biológica e até mesmo ergonômica como levantamento de pesos, postura inadequada, situação de estresse e jornadas prolongadas. Queimaduras, choques elétricos, contato com agentes patogênicos, acidentes com perfurocortantes, incêndios, vazamentos de gás, são exemplos, não raros, de acidentes que podem acometer os usuários do laboratório por diversas razões, incluindo o descuido do usuário ou despreparo.

Os acidentes ou incidentes devem ser sempre notificados à comissão de Biossegurança e investigados, para que as causas sejam averiguadas e ocorra uma conscientização sobre os procedimentos corretos, evitando assim, novos acidentes. Vale ressaltar que a primeira ação a ser tomada após um acidente é o atendimento à(s) vítima(s), e para que esse atendimento seja eficaz é necessário a elaboração e implementação de um Fluxograma de Atendimento a Acidentes, contendo as orientações que direcionam o tratamento adequado da(s)vítima(s).

A primeira etapa da elaboração do Fluxograma de Atendimento a Acidentes é a realização de um levantamento da estrutura da instituição (ou onde se encontra o laboratório). É importante verificar se existe posto ou local com atendimento médico/enfermaria próximo e se no laboratório existem usuários treinados para realizar o atendimento de primeiros socorros às vítimas, ainda no local. É extremamente importante que conste nesse fluxograma quais os serviços de emergência existem na cidade e a indicação de qual suporte chamar, em cada situação.

Após estabelecido e aprovado o fluxograma de acidentes (Figura 1), é importante que ele seja afixado em local visível no laboratório e que os usuários recebam treinamento periodicamente.

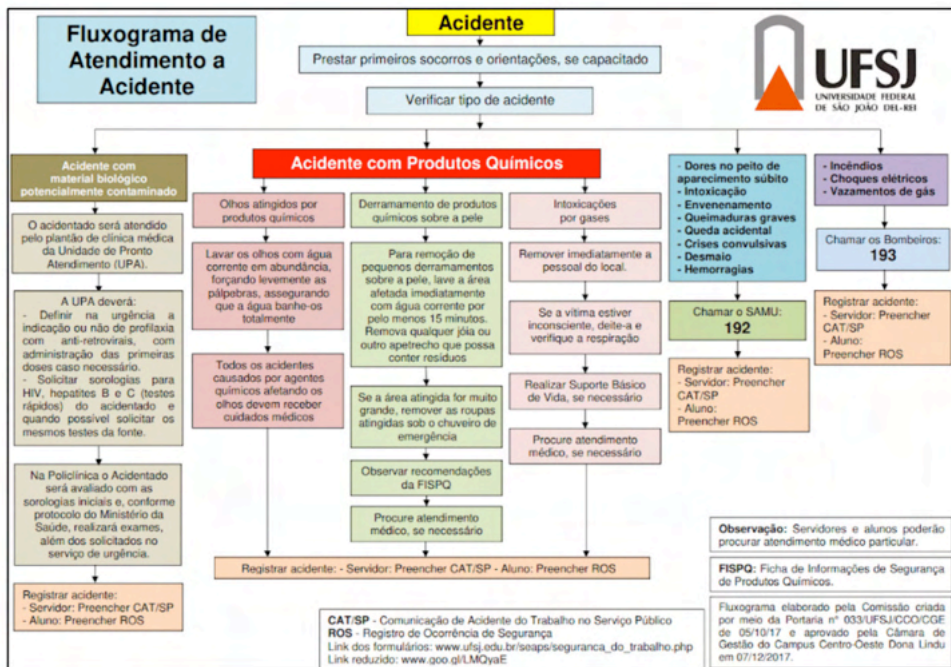


Figura 1- Fluxo de atendimento a acidentes formulado pela CIBio-UFSJ-CCO.

REFERÊNCIAS

- [1] Teixeira, P; Valle, S. Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar [online]. 2nd ed. rev. and enl. Rio de Janeiro: *Fiocruz*, p.442, 2010.
- [2] Secretaria de Saúde da Bahia. Manual de Biossegurança. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Salvador, 2001.
- [3] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. – Brasília: Anvisa, 2013.
- [4] Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo. Manual de Biossegurança. - Vitória, 2017.

Links:

Biossegurança ações:

<https://www.saude.mg.gov.br/ajuda/story/6613-bombeiros-ou-samu-saiba-quem-acionar-em-um-momento-de-emergencias>

<http://www.sinaees-sp.org.br/arq/mtegat.pdf>

Biossegurança e Boas práticas:

<https://www.youtube.com/watch?v=BGYSsqf1INY>

https://youtu.be/KWsd7Z_qtlg

Regras de Laboratório

<https://youtu.be/BRDApYgvDqQ>

BIOINFORMÁTICA NO ENSINO DE BIOLOGIA MOLECULAR

OBJETIVO

Conhecer ferramentas de Bioinformática que auxiliam no estudo de genes e proteínas.

INTRODUÇÃO

A biologia molecular é uma área que está intimamente relacionada à bioquímica e à genética, quando se trata do estudo do DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico), proteínas codificadas e dos processos envolvidos no fluxo da informação genética^[1]. Entretanto, com o passar do tempo, algumas “questões biológicas” ainda permaneciam obscuras na ciência, impulsionando a associação da biologia molecular com outras áreas, dentre elas a informática. Essa associação deu origem à bioinformática, uma ciência que visa construir algoritmos computacionais para simular processos biológicos e resolver “problemas” ou “demandas” provenientes da biologia^[2,3].

Dentre as demandas mais importantes na ciência, podemos citar a participação ativa da bioinformática no sequenciamento de genomas. Após o processo de sequenciamento do DNA, os pesquisadores se depararam com um enorme arquivo contendo as bases A, C, G e T, que, por si só, era vazio e não desvendava o código genético. Montar o “quebra-cabeças” de sequências gerados pelo sequenciamento de DNA foi, sem dúvida, o papel mais marcante da bioinformática na ciência^[1].

A bioinformática vem evoluindo e se associando à diversas áreas (química, física, estatística, medicina, matemática), com o intuito de responder questões multidisciplinares e ajudando a prever e direcionar os estudos *in vitro* e *in vivo*^[1, 2]. Além de um sistema de informação computacional e de métodos analíticos aplicados a problemas biológicos, a bioinformática é também uma área na interseção da ciência experimental e teórica, e não apenas sobre a modelagem de dados ou “mineração”, por compreender o mundo molecular que sustenta a vida a partir de perspectivas evolutivas^[2, 3].

A bioinformática no atual estado da arte abrange modelagem de fenômenos biológicos, desenvolvimento de algoritmos e estatísticas, a análise da estrutura de genes, promotores, proteínas, processamento alternativo dos genes (splicing), genômica, metagenômica, genômica comparativa, transcriptômica, metatranscriptômica, interação proteína-proteína, modelagem e docking de proteína, entre outros. “A Bioinformática é um campo emergente da pesquisa, que utiliza ferramentas computacionais avançadas para o armazenamento, análise e apresentação de dados biológicos e moleculares”^[4].

O surgimento da Bioinformática trouxe para o mercado um novo profissional, com conhecimentos sobre os problemas biológicos, capaz de analisá-los e, a partir dos resultados encontrados, criar métodos para explicá-los: o bioinformata. Este, possui domínio

da ciência da computação, e familiaridade com os princípios e técnicas laboratoriais da biologia molecular, sendo um profissional requisitado e raro em laboratórios desta área [5].

MATERIAIS

1 Computador pessoal *Desktop*, ou *Notebook* com acesso à internet.

MÉTODOS

Busca de sequência gênica (*Genbank*)

- Acessar o link <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Inserir o nome ou termo do gene de interesse. Segue a busca pelo termo, ou nome do gene *dinB*:

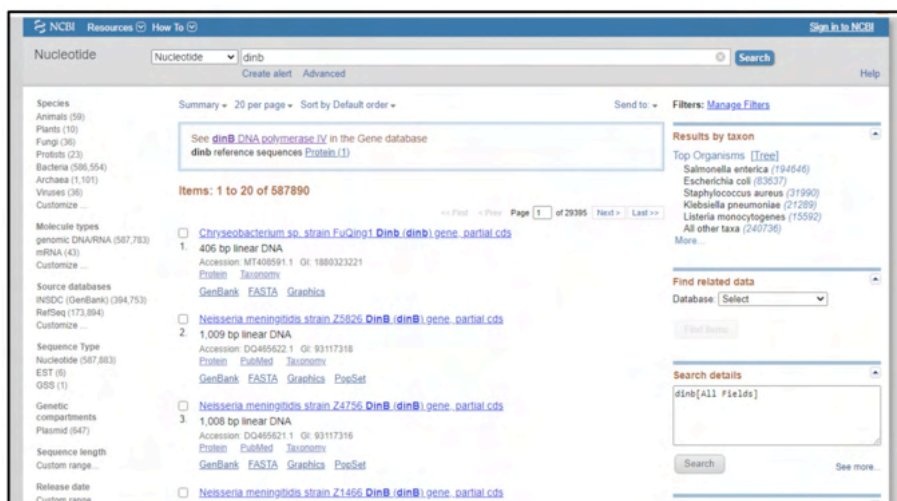


Figura 1: Busca pela sequência alvo no banco de dados.

- Escolher a espécie e clicar na opção desejada. Neste exemplo a *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655, no link <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/944922>:

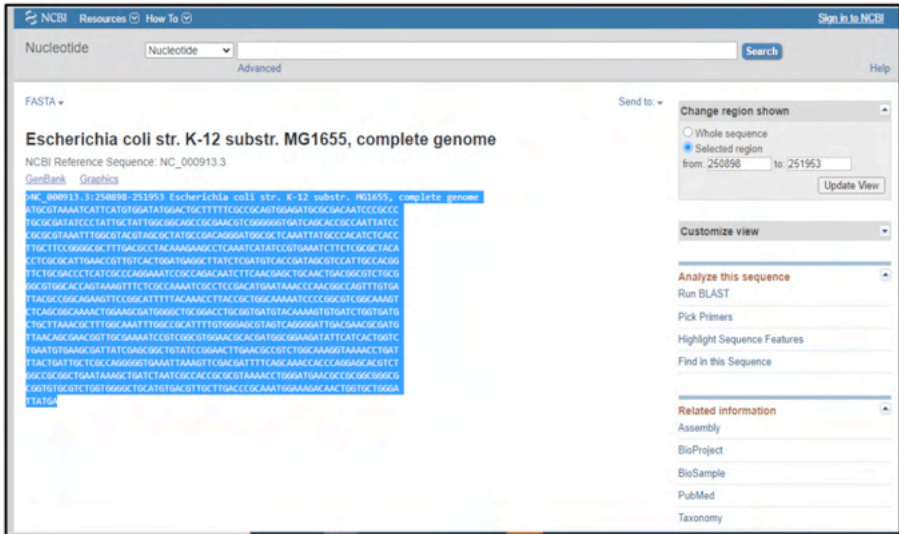


Figura 4: Obtenção da sequência no formato FASTA.

Tradução da Sequência de DNA (*Translate tool*)

- Acessar o link <https://web.expasy.org/translate/>
- Inserir a sequência de nucleotídeos anteriormente selecionada do gene *dinB* e clicar em *Translate!*

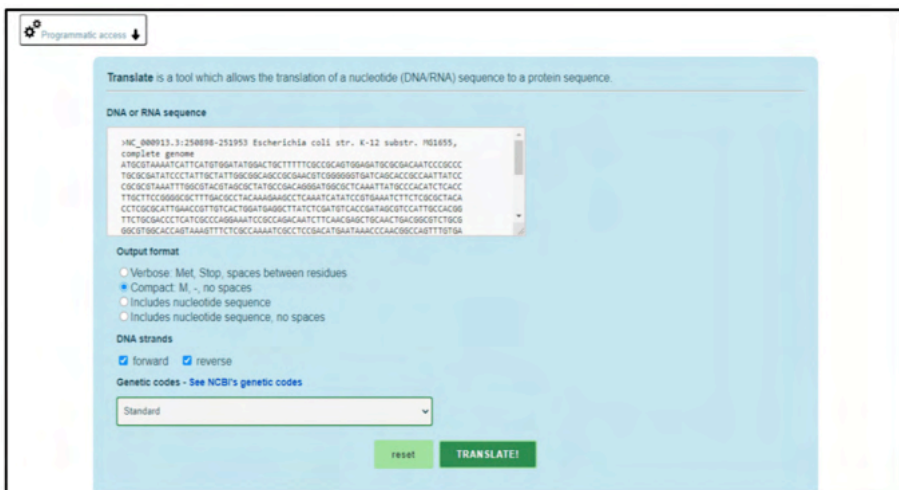


Figura 5: Tradução da sequência nucleotídica.

Alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool – BLAST*)

- Acessar o link <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Clicar nas opções “Nucleotide BLAST” para alinhamento de nucleotídeos contra banco de dados de nucleotídeos. “BLASTx” para alinhamento de nucleotídeos contra banco de dados de proteínas. “tBLASTn” para alinhamento de proteínas contra banco de dados de nucleotídeos. “BLASTp” para alinhamento de proteínas contra banco de dados de proteínas.

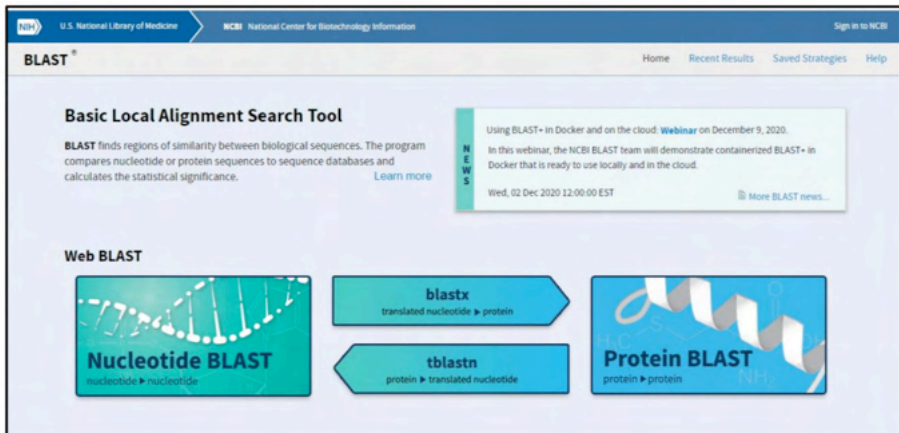


Figura 6: Interface da página do alinhamento Local.

- Inferir homologia funcional através do programa “BLASTx”, inserindo a sequência fasta do gene *dinB* obtida anteriormente e clicar em “BLAST”:

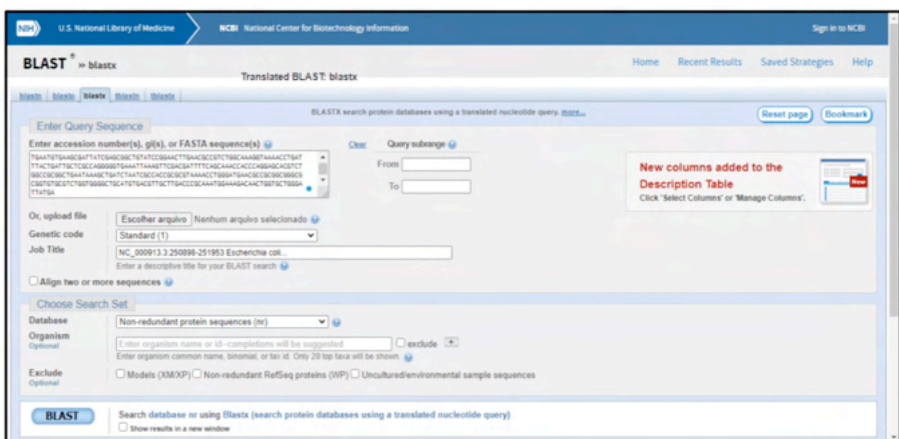


Figura 7: Alinhamento Local usando o BLASTx.

- Analisar e identificar os melhores os resultados através dos *scores* de percentual de identidade, *e-value*, entre outros:

The screenshot displays the BLAST search results interface. At the top, it shows the NIH logo and search parameters: Job Title 'NC_000913.3:250898-251953 Escherichia coli...', RID 'ZB8VCG4X013', Program 'BLASTX', Database 'nr', Query ID 'lcl|Query_62693', and Description 'NC_000913.3:250898-251953 Escherichia coli str. K-12 substr. ...'. The 'Filter Results' section allows filtering by Organism, Percent Identity, E value, and Query Coverage. Below this, the 'Sequences producing significant alignments' table is shown, with 100 sequences selected. The table columns are: Description, Scientific Name, Max Score, Total Score, Query Cover, E value, Per. Ident, Acc. Len, and Accession. The top results are all 'DNA polymerase IV (Escherichia coli)' with a Max Score of 685, Total Score of 685, Query Cover of 99%, E value of 0.0, Per. Ident of 99.72%, Acc. Len of 351, and various Accession numbers.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	685	685	99%	0.0	99.72%	351	WP_001647714.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	685	685	99%	0.0	99.72%	351	EFN5243583.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_113315203.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	EGJ7833362.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_112922004.1
MULTISPECIES_DNA polymerase IV (Enterobacteriaceae)	Enterobacteriaceae	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_094318827.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_097402619.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_097741661.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	EF68739982.1
MULTISPECIES_DNA polymerase IV (Enterobacteriaceae)	Enterobacteriaceae	684	684	99%	0.0	100.00%	351	WP_001226164.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_096253440.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_114505516.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_096996165.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_172703706.1
DNA polymerase IV (Escherichia coli)	Escherichia coli	684	684	99%	0.0	99.72%	351	WP_047644081.1

Figura 8: Resultado obtido no alinhamento Local usando o BLASTx.

Caracterização físico-química da proteína (*ProtParam*)

- Acessar o link <https://web.expasy.org/protparam/>
- Inserir a sequência de aminoácidos gerados “ExpAsy - Translate tool” do gene *dinB* e clicar em *Compute Parameters*:

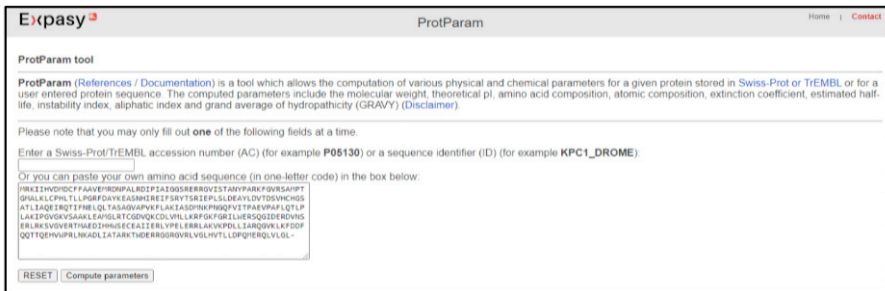


Figura 9: Caracterização físico química da proteína.

Modelagem da proteína (SWISS-MODEL)

- Acessar o link <https://swissmodel.expasy.org/interactive>
- Inserir a sequência de aminoácidos gerados “ExPASy - Translate tool” do gene *dinB* e clicar em *Build Model*:

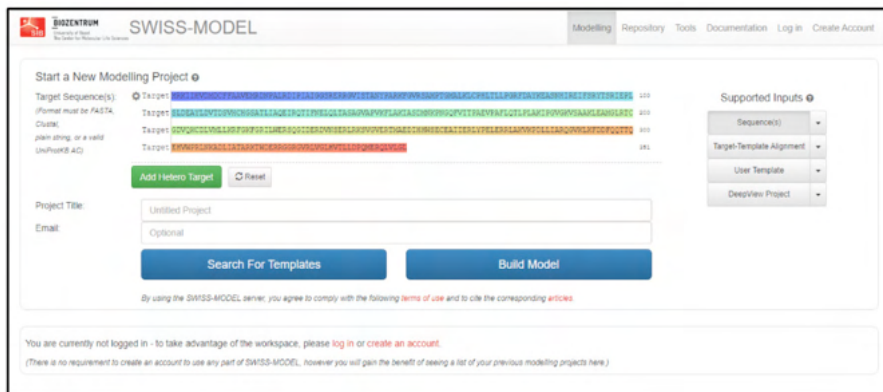


Figura 10: Modelagem Comparativa usando a ferramenta SWISS-MODEL.

- Analisar e identificar os melhores modelos gerados através dos *scores* de percentual de identidade, GMQE, QMEAN, entre outros:

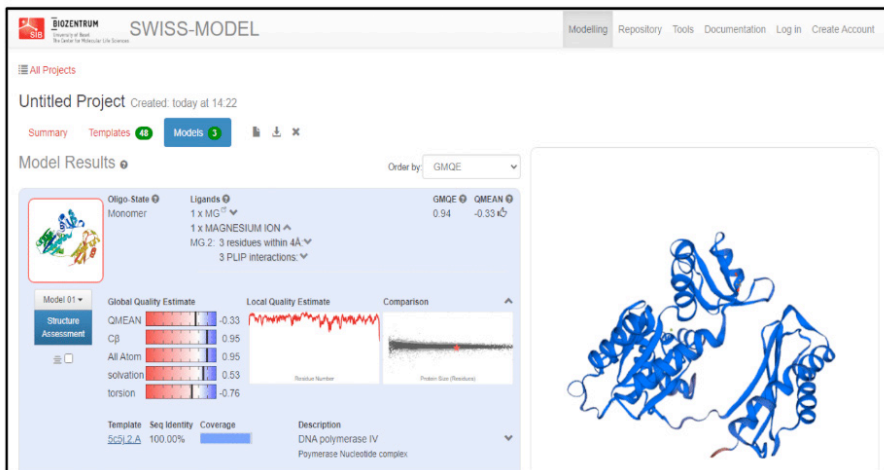


Figura 11: Escolha dos melhores modelos na ferramenta *SWISS-MODEL*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No *Genbank*, como saída do gene escolhido, é esperado que seja fornecida uma sequência de nucleotídeos, cujo cabeçalho deve iniciar por ">" para identificação nos diversos programas de bioinformática. No *ExpASY Translate Tool* espera-se como resultado uma sequência de aminoácidos de tamanho equivalente a um terço da sequência original. A ferramenta também permite o uso de algoritmos específicos para determinados organismos. O programa *BLAST* realiza o alinhamento local de sequências de entrada com o banco de dados, sendo que o pesquisador pode escolher o tipo de sequência de entrada e saída e ainda o algoritmo e pontuação a serem usados. O *ProtParam* calcula vários parâmetros físicos e químicos para uma determinada sequência de proteína, que incluem o peso molecular, *pI* teórico (ponto isoelétrico), composição de aminoácidos, composição atômica, coeficiente de extinção, meia-vida estimada, índice de instabilidade, índice alifático e grande média de hidropaticidade (*GRAVY*). O *SWISS-MODEL* é um software on-line de modelagem baseado em homologia de estruturas proteicas totalmente automatizado. Os resultados são dispostos na ordem de GMQE, QMEAN, "Oligo-State" entre outros, sendo necessário observar qual score é o mais adequado a sua análise.

Dessa forma, o uso de ferramentas de bioinformática proporcionará ao estudante uma melhor compreensão da biologia molecular através da caracterização *in silico* de um gene/proteína conhecida ou hipotética de um organismo específico.

REFERÊNCIAS

[1] Pinho, MSL. Pesquisa em Biologia Molecular: Como fazer? Revista Brasileira Coloproct., v. 26, n. 3: p.331-336, 2006.

[2] Thampi, S. M. Introduction to Bioinformatics.arXiv preprint arXiv. Computational Engineering, Financeand Science, 2009.

[3] Griffiths, AJF; Wessler, SR; Lewontin, RC; Carroll, SB. Introdução a Genética. 9ed. Guanabara Koogan, 2008.

[4] Ribeiro, DCD. Ferramentas de Bioinformática: Manipulação de sequências e recuperação de regiões flanqueadoras de um alvo. IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba: p.182-185, 2005.

[5] Araújo, E. O biólogo das telas de computador. Boletim do Conselho de Informações Sobre Biotecnologia. ano 2, n. 7, 2004.

Links:

Analisando resultados de sequências de genes alinhados com o software BLAST
<https://www.youtube.com/watch?v=RzC-V67z5LA>

Design de primer para PCR em tempo real usando NCBI Primer BLAST
<https://www.youtube.com/watch?v=tGNPkiY0WJU>

Ferramenta OligoAnalyzer para análise de dímeros de primers e cálculo de TM
<https://www.youtube.com/watch?v=lcEbvNYzrSQ>

PIPETAGEM

OBJETIVO

Manusear de forma correta pipetas automáticas e praticar a técnica de pipetagem para promover a medição e transferência de volumes líquidos com precisão.

INTRODUÇÃO

Nos primórdios da ciência, a técnica de pipetagem para volumes pequenos exigia que o líquido fosse sugado pela boca até a delimitação desejada na pipeta de vidro. O uso dessa estratégia dificultava a obtenção de volumes exatos e dependia da prática do usuário, que corria o risco de ingerir o material sugado^[1].

As primeiras pipetas que surgiram eram de pistão de metal. Elas eram delicadas, quebradiças e apresentavam alto risco de contaminação da amostra e do pipetador. O marco do aperfeiçoamento da pipetagem em relação a micro volumes ocorreu no final da década de 1950 pelo alemão Heinrich Schnitger, fundador da empresa Eppendorf, através do desenvolvimento da micropipeta contendo a ponta de plástico movida a pistão. Essa pipeta foi patenteada em 1957 e comercializada pela primeira vez em 1961^[1].

As pipetas foram aperfeiçoadas ao longo dos anos e no atual cenário, as micropipetas são indispensáveis ao desenvolvimento da pesquisa científica em diversos campos da biotecnologia, biologia molecular, bioquímica, fisiologia e outras áreas afins^[1]. Em biologia molecular, é essencial que a pipeta seja utilizada de forma correta e habilidosa para obter sucesso na condução dos experimentos, visto que, na maioria das vezes, os volumes usados são demasiadamente pequenos, na ordem de microlitros. Dessa forma, antes de realizar qualquer experimento, é importante que o usuário receba um treinamento acerca do funcionamento deste equipamento e pratique exaustivamente até que seja conseguido sucesso na técnica, para produzir resultados confiáveis^[2].

As pipetas podem ser divididas em dois grupos: i) Mecânicas: são as pipetas volumétricas graduadas e tipo Pasteur e ii) Eletrônicas: são os pipetadores automáticos, as micropipetas digitais monocal e multicanal, que têm de 8 a 12 canais simultâneos. No laboratório de Biologia Molecular as micropipetas automáticas mono e multicanal são as mais usadas, devido a sua capacidade de permitir a transferência de microlitros na faixa 0,1 μL a 10.000 μL . A nomenclatura das pipetas é dada conforme o volume suportado, capacidade máxima e mínima de trabalho, por exemplo: a P1.000 permite aspirar/dispensar volumes entre 200 a 1.000 μL , a P100 de 10 a 100 μL , a P10 de 1 a 10 μL e a P2 trabalha com volumes de 0.1 a 2 μL .

As pipetas são compostas por 5 partes importantes: o embolo de ajuste do volume, que também é usado para a sucção e dispensa do líquido, a alça para segurar a pipeta, o display de visualização do volume, a faixa de volume que a pipeta suporta e o botão de

ejeção da ponteira (Figura 1). O primeiro passo da pipetagem é a escolha da pipeta, que vai variar conforme o volume a ser usado. É necessário determinar o volume específico a ser usado, o líquido a ser pipetado e também as ponteiras a serem usadas, dado que estas são específicas para cada pipeta (10, 100, 1.000, 5.000 μL).



Figura 1: Partes da micropipeta automática monocanal.

MATERIAIS

Reagentes:

- 3 Caixas de ponteiras: P10, P100 e P1000
- 1 Filme plástico ou parafilme
- 1 Barca para a pipeta multicanal
- 1 Tubo de 10 mL contendo líquido azul a ser pipetado
- 1 Placa de 96 poços
- 1 Estante para armazenar os tubos
- 1 Balde ou lixeira para descarte

Equipamentos:

- 3 Pipetas monocanal - P10, P100, P1000
- 1 Pipeta multicanal P100
- 1 Pipeta repetidora monocanal

MÉTODOS

- Escolher a pipeta desejada, conforme o volume a ser pipetado, e adequar o micrômetro/display de visualização usando o êmbolo da pipeta.
- Adicionar a ponteira na ponta da pipeta e se for necessário ajustá-la.
- Pressionar lentamente o botão do êmbolo até o primeiro estágio, sem entrar em contato com a solução.
- Para aspirar, inserir a ponteira da pipeta na solução e liberar gradualmente o botão do êmbolo até que o mesmo retorne a sua posição inicial, aspirando o líquido. O retorno lento e gradual do êmbolo evita a entrada de ar na pipeta.
- Para dispensar, pressionar o botão do êmbolo passando pelo primeiro estágio e segurar até atingir o segundo estágio (ponto máximo permitido), dispensar todo o volume do líquido no local desejado (parafilme, tubo ou placa).
- Apertar o botão ejetor para expulsar a ponteira no descarte apropriado.
- Usando o material pipetado, repetir a técnica descrita acima para verificar se o conteúdo pipetado apresenta a precisão descrita pela pipeta. Caso contrário, realizar a prática novamente quantas vezes for necessário até obter o resultado almejado.
- Realizar a pipetagem de 1, 5, 20, 100 500 e 1000 μL em um parafilme.

Obs:

- A amostra pode ou não ser homogeneizada, dependendo do protocolo seguido.
- Caso fique líquido na ponteira, a pipetagem não teve sucesso. Verificar se a ponteira está adequadamente encaixada e tentar novamente.
- No caso da pipeta multicanal, o procedimento é exatamente o mesmo, mas deverá ser usado uma barca ou suporte para retirar o líquido de todos os canais simultaneamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso de qualquer experimento em biologia molecular está intimamente relacionado ao processo de pipetagem, que deve apresentar precisão na transferência do reagente. Caso o usuário verifique o mau funcionamento de uma pipeta, ele deve comunicar ao técnico responsável para ser feita uma limpeza/descontaminação e calibração do equipamento, evitando assim, que outros usuários comprometam seus experimentos.

Durante a pipetagem os olhos devem estar posicionados na altura do mesmo, garantindo o acerto e conferência do menisco. Após aspirar o líquido, é importante movimentar a pipeta sempre na posição vertical, evitando que o líquido entre em sua parte mecânica e cause a contaminação e corrosão do seu pistão (parte mecânica interna). Caso

o líquido seja acidentalmente aspirado para dentro da pipeta, ela deve ser desmontada e o pistão deve ser imediatamente limpo com álcool isopropílico a 70%.

Para evitar contaminação é indispensável trocar a ponteira após cada manipulação e se possível, usar ponteiras com filtro ou ponteiras de deslocamento positivo para evitar que o aerossol da amostra passe para o corpo da micropipeta e contamine a próxima amostra. Se suspeitar de contaminação da micropipeta, ela deve ser limpa e/ou autoclavada, conforme as instruções do fabricante. A frequência da verificação da calibração depende do quanto a pipeta é utilizada e da qualidade e condição de uso. Para armazenar as pipetas de forma correta, é necessário mantê-las na posição vertical em estantes apropriadas e realizar a conferência de precisão e exatidão das mesmas com periodicidade.

REFERÊNCIAS

[1] Klingenberg, M. When a common problem meets an ingenious mind. *EMBO Rep.*, 6(9): 797-800, 2005.

[2] Miller, JS; Sass, ME; Wong, SJ; Nienhuis, J. Micropipetting: An Important Laboratory Skill for Molecular. *The American Biology Teacher*, 66(4): p.291-296, 2004.

Links:

Curiosidades sobre pipetagem

<https://www.youtube.com/watch?v=gaNwXV4enWA>

Como usar as micropipetas

https://www.youtube.com/watch?v=WrkFFw0LzL8&ab_channel=UniversidatedoDNA

https://www.youtube.com/watch?v=uEy_NGDfo_8

SÍNTESE DE INICIADORES (PRIMERS)

OBJETIVOS

Desenhar iniciadores específicos de DNA (primers) para um gene.

INTRODUÇÃO

A técnica de PCR, também conhecida como *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da DNA polimerase), é a técnica que realiza a amplificação de uma sequência específica de DNA a partir de um DNA molde (DNA genômico). O desenvolvimento da PCR revolucionou a ciência e trouxe inúmeros avanços no campo da biologia molecular. A teoria desta técnica foi proposta por Keppe e colaboradores em 1971, no entanto, somente 14 anos depois o procedimento completo da PCR foi descrito e experimentalmente testado por Kary Mullis (1985), ganhador do prêmio Nobel de Química do ano de 1993^[1].

A PCR é uma das técnicas mais utilizadas na ciência em todo o mundo e apresenta diversos propósitos e finalidades, sendo eles: sequenciamento de DNA, aplicações no diagnóstico clínico, identificação de subtipos de vírus, diagnóstico de doenças hereditárias, identificação de “impressão digital” genética (usado em testes de paternidade e na medicina forense), detecção de doenças infecciosas, criação de organismos transgênicos, entre outros^{[1][2]}.

Projetar iniciadores específicos é essencial para que a PCR seja bem sucedida. As primeiras reações de PCR utilizavam primers projetados manualmente, ou seja, baseados apenas na sua complementaridade com a sequência alvo. Os pesquisadores utilizavam um algoritmo simples para o cálculo da temperatura de anelamento dos primers (T_m) usando a fórmula $T_m = 2 \cdot (A+T) + [4 \cdot (C+G)]$, onde A, T, G e C são as quantidades de cada base componente do primer^[3].

Atualmente existem diversos softwares disponíveis online e de uso gratuito que facilitam o desenho de primers, poupando tempo e dinheiro, gastos na padronização de reações em busca de uma amplificação específica. Esses programas possuem algoritmos que calculam parâmetros importantes como: a temperatura de anelamento, tamanho, composição, similaridade com outros genes, conteúdo GC, sentido dos iniciadores, formação de grampos, homodímeros e heterodímeros, de modo a obter iniciadores capazes de anelar especificamente na sequência alvo^[1, 4].

Para se projetar um par de iniciadores para uma região específica do DNA, é necessário o conhecimento prévio da sequência alvo, ou seja, o local onde os iniciadores se anelarão. Ao desenvolver os iniciadores, um deles deve se anelar na fita positiva, que por convenção é orientada na direção 5' - 3' (também conhecida como fita *sense*) e o outro iniciador deve ser complementar a fita negativa, que é orientada na direção 3' - 5' (conhecida como fita *antisense*), e os dois devem ter temperaturas de anelamentos próximas ou iguais,

embora não necessitem apresentar o mesmo tamanho. De posse da sequência de primers desenhada, as mesmas podem ser encaminhadas às empresas de biologia molecular para serem sintetizadas.

MATERIAIS

- 1 Sequência nucleotídica no formato FASTA.
 - 1 Computador pessoal *Desktop* ou *Notebook* com acesso à internet.
- Programas de Bioinformática disponíveis *online*.

MÉTODOS

Obtenção da sequência alvo

- Primeiramente, deve-se obter a sequência gênica alvo (gene ou parte dele) para o desenho dos iniciadores.
- Entrar no endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Selecionar a busca por “Gene”.
- Digitar: o nome de um gene ou de um organismo: Ex: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.
- Escolher o gene de interesse e clicar duas vezes para abrir a sequência. Observação: sugere-se que todos os alunos escolham o mesmo gene para desenho dos iniciadores na aula.
- Ir até “mRNA and proteins” e clicar no código do RNA mensageiro.
- Após abrir a nova página, clicar em “FASTA” para selecionar a sequência gênica sem espaços entre os nucleotídeos.
- Copiar a sequência nucleotídica e salva-la em um documento “word”.

Obs: Caso a sequência escolhida seja um gene, verificar se a sequência é múltipla de 3 e verificar se a sequência inicia com ATG e termina com códon de parada (*stop códon*).

Desenvolvimento manual do primer:

Para a construção manual do primer seguir as informações abaixo:

- Usando a sequência alvo, desenhar os iniciadores, que podem ter de 15 a 30 resíduos de nucleotídeos (bases). É importante lembrar que eles não precisam ter o mesmo tamanho.
- Os primers deverão ser complementares a sequência alvo, sendo que cada um deles será desenhado para uma das fitas de DNA (5'-3')

- O conteúdo ideal de GC do primer pode variar entre 40-60%.
- Para calcular a temperatura de anelamento utilizar a fórmula; $T_m = 2 \times (A+T) + [4 \times (C+G)]$.
- A T_m para o par de iniciadores deve ser a mesma, e é importante que ela fique na faixa de 50 a 60 °C (ideal), embora a faixa possa ser expandida para 45-65 °C, caso seja necessário.
- Caso os dois primers desenhados não tenha a mesma temperatura de anelamento, continuar aumentando/diminuindo um dos primers para que os requisitos acima sejam atendidos.

Obs: Repetições de duplas de nucleotídeos (por exemplo, ATATATAT OU GCGCGCGC) ou de base única (por exemplo, GGGG OU CCCC) devem ser evitadas na sequência dos iniciadores, pois podem formar grampos, homodímeros e heterodímeros.

ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS INICIADORES

A) Verificar o anelamento inespecífico dos iniciadores no genoma

- Entrar no endereço eletrônico do programa *Nucleotide BLAST* https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- Colar a sequência de um dos primers e clicar em BLAST.
- Anotar os resultados (print da tela).
- Fazer o mesmo procedimento com o outro primer.

B) Verificar a possibilidade de formação de grampos, homodímeros e heterodímeros

- Entrar no endereço eletrônico do programa Oligo Analyzer tool <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> e criar login e senha.
- Colar a sequência de um dos primers e clicar em “Hairpin”, anotar os resultados. Fazer o mesmo procedimento com o segundo primer.
- Colar a sequência de um dos primers e clicar em “Selfdimer”, anotar os resultados. Fazer o mesmo procedimento com o segundo primer.

Colar a sequência de um dos primers e clicar em “Heterodimer”, colar a sequência do outro primer na segunda janela e calcular. Anotar os resultados.

Nota: Existem muitos *softwares* que auxiliam na projeção de iniciadores feitos de forma automática. As ferramentas recomendadas para essa finalidade são:

- Design NCBI Primer: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Primer3: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

- OligoPerfect Primer Designer: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-design-tools.html>.

Após o desenho dos primers, enviar a sequência para síntese

As sequências dos iniciadores devem ser enviadas para as empresas que irão realizar a síntese, sempre no sentido 5' → 3'.

- Iniciador direto 5' → 3' (Primer *forward*).
- Iniciador reverso 5' → 3' (Primer *reverse*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

É esperado que a projeção dos iniciadores atinja todos os requisitos citados anteriormente, evitando a construção de um primer com pouca ou nenhuma eficiência, que muitas vezes só será percebido após várias tentativas de padronização da PCR, desperdiçando tempo e recursos financeiros.

Algumas vezes a reação pode gerar produtos múltiplos e inesperados, como fragmentos de tamanhos variados que aparecem como uma escada na eletroforese. Esse resultado ocorre devido ao anelamento inespecífico dos iniciadores, ou seja, eles se ligam em regiões fora da sequência alvo. Como resultado pode-se também ser observado a ausência de qualquer produto de amplificação em decorrência do não anelamento dos iniciadores ao DNA alvo^[1].

O programa BLASTn é uma importante ferramenta na busca de primers específicos, pois ele compara a sequência do primer com as sequências depositadas no banco de dados e indica a possibilidade de anelamentos inespecíficos em outras sequências parecidas (famílias gênicas).

Como a interação entre os primers é espontânea (delta G negativo) e vai depender do conteúdo de cada um dos primers, é importante a utilização do programa Oligo analyzer para prever as possíveis interações entre eles (homodímeros, heterodímeros, grampos), evitando a diminuição do rendimento da PCR devido à baixa ligação à sequência alvo.

Os iniciadores obtidos manualmente podem produzir resultados satisfatórios, no entanto, é recomendável projetá-los utilizando as ferramentas de bioinformática, para garantir maior confiabilidade.

REFERÊNCIAS

[1] Lorenz, TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J Vis Exp., (63): p.3998, 2012.

[2] Ye J; Coulouris G; Zaretskaya I; Cutcutache I; Rozen S; Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 13(134): p.1-11, 2012.

[3] Kubistaa M; Andrade JM; Bengtsson M; Forootan A; Jonáke J; Lind K; Sindelka R; Sjöback R; Sjögreen B; Strömbom L; Ståhlbergag A; Zorica N. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27(2–3): p.95-125, 2006.

[4] Chuang LY; Cheng YH; Yang CH. Specific primer design for the polymerase chain reaction. Biotechnology Letters, 35: p.1541-1549, 2013.

Links:

Como desenhar primers do zero à PCR:

<https://www.youtube.com/watch?v=M5YRPELAE8Y>

Desenho de primers para PCR:

<https://youtu.be/O6hvNWg7yKE>

Dicas para o desenho dos primers:

<https://youtu.be/OcN6mML3DGI>

Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846334/>

Aplicação da PCR na área da saúde:

https://www.ted.com/talks/cella_wright_how_do_you_know_if_you_have_a_virus

EXTRAÇÃO DE DNA HUMANO

OBJETIVO

Realizar a extração do DNA genômico humano a partir de células da mucosa bucal.

INTRODUÇÃO

Em 1869, o Bioquímico suíço Friedrich Miescher, isolou pela primeira vez o DNA genômico de linfócitos, ao qual chamou nucleína, um material rico em oxigênio, nitrogênio e fósforo, que foi posteriormente chamado ácido nucleico. Somente em 1929, o Bioquímico inglês Phoebus Levene revelou que o DNA era composto por bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina, timina), açúcar e fosfato^[1].

A extração e a purificação de ácidos nucleicos a partir de diversas amostras (bactérias, fungos, tecidos vegetais e tecidos animais) é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de estudos moleculares, incluindo a alta eficiência na amplificação de segmentos genômicos através da reação em cadeia da polimerase (PCR)^[1]. Para cada tipo de amostra (sangue, tecido, sêmen, bactéria, planta, fungo) vários protocolos de extração podem ser testados, adaptados e otimizados. Eles podem ser realizados usando kits comerciais ou mesmo por protocolos caseiros, que podem ser rápidos, práticos, baratos, livres de contaminação e de toxicidade e, eficazes no que tange à quantidade e qualidade, dependendo do objetivo desejado^[1, 2].

O Processo de extração de DNA inclui basicamente dois procedimentos principais: a lise, que consiste na ruptura da membrana e liberação do conteúdo e a purificação, que é a separação do DNA do debris celular ou pellet (mistura da parede/membrana celular e demais macromoléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos). Após a extração as amostras de DNA podem também ser submetidas a processos de concentração e de purificação, com a finalidade de se obter amostras mais puras e em maior quantidade^[2].

A extração de DNA pode ser feita de várias formas, usando sais, fenol clorofórmio, resinas, kits, entre outros. A extração de DNA usando a resina chelex 100, é rápida, simples e de baixo custo. Trata-se de uma resina iônica constituída de polímeros de Estireno-Divinilbenzeno pareados com íons iminodiacetato que agem como quelantes, por se ligarem a íons metálicos polivalentes. A resina chelex, é fornecida em diferentes graus de pureza, sendo que na biologia molecular é normalmente usado a mais pura, a chelex 100. Uma importante propriedade desta resina é a atração por cátions divalentes como o Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} , sendo o último cofator da enzima DNAse, prevenindo a degradação do DNA^[3]. A extração pode ocorrer em condições neutras ou alcalinas e nestas condições, a resina apresenta afinidade aumentada por esses cátions. Além disso, as “beads” da resina são polares e se ligam a componentes celulares polares depois que a célula é lisada, enquanto o DNA e o RNA permanecem em solução^[4, 5].

MATERIAIS

Reagentes:

- 1 mL de água deionizada (autoclavada)
- 200 μ L de resina chelex 100
- 1 Microtubo de 1,5 mL (estéril)
- 2 Caixas de ponteiras: P100 e P1000
- Balde ou lixeira para descarte

Tipo de amostra biológica:

- Células da mucosa bucal (swab bucal)

Equipamentos:

- Conjunto de micropipetas de P10, P100, P1000
- Câmara de banho-maria
- Centrífuga
- Vortex

MÉTODOS

Método de extração pela resina chelex 100

- Transferir 1 mL de água deionizada (autoclavada) para o microtubo de 1,5 mL.
- Raspar com o cotonete (swab) a mucosa bucal, fazendo movimentos circulares por aproximadamente 1 minuto.
- Colocar a ponta do cotonete dentro do microtubo contendo água deionizada e rodar por alguns instantes, retirar o cotonete apertando-o contra o microtubo para coletar o máximo de material possível.
- Agitar o tubo no vórtex rapidamente por 2 vezes.
- Centrifugar a amostra a 13.000 RPM por 5 minutos à temperatura ambiente.
- Cuidadosamente, aspirar o sobrenadante com o uso da pipeta de 1 mL (P1000) e descartar no local apropriado, deixando apenas o pellet no fundo do microtubo.
- Aspirar 200 μ l da resina chelex 100 e esperar a resina precipitar na extremidade da ponteira. Em seguida, adicionar 3 a 4 gotas ao pellet da amostra.
- Agitar a amostra em vórtex até ressuspender o pellet.

- Incubar a amostra em banho-maria a 56 °C por 1 hora.
- Agitar no vórtex e em seguida centrifugar a amostra a 15.000 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar a leitura do DNA em espectrofotômetro para verificar a concentração e pureza da amostra (230, 260, 280 nm).
- Conservar o DNA (amostra) entre 4°C e - 20°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do DNA é o primeiro passo para a execução de outras técnicas moleculares e o planejamento do método/protocolo usado, é essencial para garantir o sucesso nas etapas seguintes ^[5]. Alguns métodos de extração se destacam pelo rendimento do DNA extraído, outros pela pureza, outros pelo preço e outros pela praticidade, assim, o protocolo pode ser escolhido baseado nas etapas subseqüentes e também na disponibilidade de recursos.

A extração pelo método chelex 100 apresentou ótimos resultados quanto a sensibilidade em testes de PCR, quando comparado com outros métodos de extração, entretanto, embora apresente alto rendimento é necessário um passo extra para realizar a purificação da amostra e eliminar contaminantes: proteínas e resina^[3, 5].

O DNA, em sua forma original de dupla fita, apresenta alta estabilidade e se mantém preservado em várias condições: liofilizado, em solução, armazenado a -20 °C ou no freezer -80 °C, podendo ser mantido em laboratório por muitos anos, sem o risco de degradação.

REFERÊNCIAS

[1] Chee Tan S; Yiap Beow Chin. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. Journal of Biomedicine and Biotechnology: p.1-10, 2009.

[2] Alves EA; Souza DS. Biologia molecular. *In*: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR (org). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.3. Rio de Janeiro: EPSJV: p.134-185, 2013.

[3] Scorsato AP; Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. J Bras Patol Med Lab., 47(5): p.541-548, 2011.

[4] Barea JÁ; Pardini MIMC; Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). Rev Bras Hematol Hemoter., 26(4): p.274-281, 2004.

[5] Viana GMR; Barbosa DRL; Carmo EL; Peres JMV; Nascimento JMS; Póvoa MM. Comparação entre dois métodos de obtenção de DNA a serem usados como protocolos alternativos para a detecção de parasitas humanos causadores de malária por nested PCR. Rev Pan-Amaz Saude v.1 n.2, 2010.

Links:

Extração de DNA - teoria

<https://youtu.be/1YgVH6LmGd0>

Protocolo de extração de DNA - parte 1

https://youtu.be/tcPgdr9_t64

Protocolo de extração de DNA - parte 2

<https://youtu.be/1PisbDhKXTU>

PRECIPITAÇÃO E DOSAGEM DE DNA

OBJETIVO

Realizar as técnicas de precipitação e dosagem de DNA, a fim de garantir a máxima pureza e quantificação do material.

INTRODUÇÃO

O processo de extração do DNA pode ser realizado através de vários protocolos e aplicado a diversos tipos de amostra, cada um com suas peculiaridades. Alguns tipos de extração, embora simples e de alto rendimento, podem necessitar de um passo adicional, de modo a conseguir uma amostra de DNA sem contaminantes^[1].

O processo subsequente à extração, usado a fim de garantir a pureza da amostra é denominado precipitação do DNA, processo que também pode ser realizado usando diferentes protocolos e reagentes como: etanol, isopropanol, diferentes tipos de sal ou com fenol^[1, 2, 3]. O uso do etanol é o mais amplamente difundido sendo realizado pela primeira vez visando concentrar ácido nucleico biologicamente ativo por J. Lionel Alloway e descrito por seu colega Maclyn McCarty em 1985^[2].

A precipitação realizada com álcool, na presença de cátions monovalentes, promove uma transição estrutural na molécula de ácido nucléico, resultando em agregação e precipitação do material genético ^[1, 2, 3]. A dosagem do produto obtido na extração do DNA é essencial o rendimento do processo de precipitação e também para avaliar a eficácia da precipitação, ou seja, a pureza da amostra. Para isso, é importante o auxílio de um espectrofotômetro tipo nanodrop para ler de pequenas amostras de DNA (1 μ L) nos comprimentos de onda: 230 (carboidrato, resina, fenol), 260 (DNA) e 280 (proteínas)^[4, 5].

A seguir será descrito o passo-a-passo de como a precipitação do DNA é realizada a partir de uma metodologia que utiliza o etanol como o agente principal.

MATERIAIS

Reagentes:

- 10 mL de etanol 100% gelado
- 5 mL de etanol 70% gelado
- 1 mL de água Milli-Q autoclavada
- 1 Microtubo contendo amostra de DNA a ser dosado
- 2 Microtubos de 1,5 mL
- 2 Caixas de ponteiras: P10 e P1000

1 Caixa de isopor com gelo

Papel toalha

Descarte

Equipamentos:

Espectrofotômetro

Centrífuga

Nanodrop

Estufa

Conjunto de micropipetas de P10, P100, P1000

MÉTODOS

Precipitação do DNA

- Dosar o DNA em espectrofotômetro para quantificar o DNA a ser precipitado ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e verificar as relações 260/230 nm e 260/280 nm apresentadas pela amostra. Anotar os resultados na Tabela 1.
- Adicionar 1/10 volume de NaAc 3M, pH 5,2 e 3 volumes de etanol absoluto à amostra a ser precipitada. Misturar por inversão e incubar a -20°C por 20 minutos.
- Decorrido esse intervalo, centrifugar a amostra a 14.000 RPM a 4°C por 10 minutos e descartar o sobrenadante, cuidadosamente, por aspiração com a pipeta p100.
- Lavar o precipitado com 5 volumes de etanol 75% gelado.
- Centrifugar a 14.000 RPM por 10 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante, como descrito anteriormente. Não deixar nenhuma gotícula, se for necessário deixar o tubo aberto sobre a bancada para secagem total.
- Ressuspender o DNA em 50 mL H₂O Milli-Q.
- Deixar no banho a 37°C por 5 minutos
- Homogeneizar e dosar o DNA em espectrofotômetro para quantificar o DNA precipitado e verificar as relações: 260/230 nm e 260/280 nm, para confirmar a pureza.
- Anotar os resultados na Tabela 1.

Dosagem de DNA no nanodrop

Ligar o aparelho nanodrop, abrir o programa (nanodrop 2000) e escolher a opção

ácido nucleico (DNA fita dupla).

Limpar o pedestal com lenço de papel e colocar 1 μL de água. Em seguida, zerar o aparelho “blank”.

Limpar o pedestal com lenço de papel e colocar 1 μL da amostra homogeneizada e medir a concentração da amostra “measure” e anotar na Tabela 1. Os valores de relação 260/280 e 260/230 nm também são fornecidos na leitura e devem ser anotados para fins de comparação.

Amostra	Dosagem $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Antes	Razão 260/230	Razão 260/280	Dosagem $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Depois	Razão 260/230	Razão 260/280

Tabela 1: Quantificação de DNA por espectrofotometria: antes e após a precipitação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA é comumente solúvel em álcool, porém, na presença de sal, como o NaAc, o sódio se liga ao fosfato presente na estrutura do DNA, fazendo com que ele precipite. O etanol absoluto adicionado também auxilia na precipitação do DNA. A adição do etanol 70%, é utilizado para lavagem do DNA, permitindo a solubilização e remoção dos sais durante a lavagem^[3].

Após a retirada do etanol 70% e secagem do tubo, o DNA pode ser ressuspenso em água e em seguida dosado. É normal acontecer a perda de DNA durante o processo de precipitação, então, é importante dosar o DNA para verificar a quantidade inicial e a final, obtida após a precipitação. O processo de precipitação é aplicado com o intuito de obter uma amostra pura de DNA, e essa pureza pode ser verificada pela razão 260/280 nm, 260/230 nm, sendo que valores inferiores a 1,8 são referentes a resultados de amostras contaminadas com proteínas, carboidratos, resina, etc^[4, 5].

REFERÊNCIAS

[1] Oliveira, MCDS; Regitano, LCA; Roese, AD; Anthonisen, DG; Patrocínio, E, Parma; MM, Scagliusi; SMM, Timóteo; WHB and Jardim, SN. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>>, 2007.

[2] McCarty M. The transforming principle: Discovering that genes are made of DNA. Norton, 1985.

[3] Green MR; Sambrook J. Precipitation of DNA with Ethanol. Cold Spring Harb Protoc. 1; (12), 2016.

[4] Lucena-Aguilar G; Sánchez-López AM; Barberán-Aceituno C; Carrillo-Ávila JÁ; López-Guerrero JÁ; Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. Biopreserv Biobank. 14(4): p.264–270, 2016.

[5] García-Alegria AM; Anduro-Corona I; Pérez-Martínez CJ; Corella-Madueño MAG; Rascón-Durán ML; Astiazaran-Garci H. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. Int J Anal Chem. 2020: 8896738, 2020.

Links:

Como precipitar o DNA

<https://youtu.be/3T5DVW-lfT8>

Medindo a concentração do DNA (NanoDrop):

<https://youtu.be/y3lCiyCWeCA>

NanoDrop: microvolume na quantificação de ácido nucleico:

<https://youtu.be/FiGZnNs2xXY>

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

OBJETIVO

Realizar a amplificação do DNA de interesse.

INTRODUÇÃO

Descrita pela primeira vez em 1985 por Mullis e colaboradores, a reação em cadeia da DNA Polimerase, comumente conhecida por sua abreviação em inglês 'PCR', é uma tecnologia simples usada para amplificar *in vitro* sequências de DNA, a partir de iniciadores específicos para a sequência alvo^[1]. Essa metodologia se baseia no princípio de replicação enzimática dos ácidos nucleicos^[2] e consiste no uso da enzima DNA polimerase derivada de bactérias termostáveis (*Thermus aquaticus*). A termoestabilidade da Taq DNA polimerase é indispensável para a sua atividade nos ciclos repetidos de desnaturação e renaturação em altas temperaturas, os quais são submetidos aos reagentes da PCR^[1].

A amplificação do DNA através da PCR usa como reagentes: i) os primers, que são oligonucleotídeos que geram especificidade à reação e fornecem as extremidades 3'OH livres para que a DNA polimerase possa fazer a extensão da cadeia, ii) os dNTPs, que são os desoxinucleotídeos que irão compor os fragmentos a serem amplificados (A, C, G, T), iii) o Mg^{2+} , cátion divalente requerido para a atividade da enzima termoestável, iv) um tampão para manter o pH da reação e v) um molde de DNA, contendo a sequência-alvo da amplificação^[3].

A reação de PCR ocorre em três fases, chamadas de: desnaturação, anelamento e extensão, todas acontecem em um equipamento chamado termociclador. Na primeira fase, a amostra é aquecida a 95°C, quando a energia térmica é suficiente para superar a ligação de hidrogênio entre os pares de base complementares nas duas fitas de DNA, o que leva à separação e abertura da dupla fita. Na segunda etapa, chamada anelamento, a amostra é resfriada entre 37°C e 70°C, temperaturas nas quais os primers se ligam aos seus sítios complementares na fita simples da molécula de DNA. Em sequência, a terceira fase é a extensão, a temperatura é elevada a 72°C e a Taq polimerase começa a sintetizar as novas sequências direcionadas da extremidade 5' a 3'. No final de cada ciclo, os fragmentos recém-sintetizados servem de modelo para a reação subsequente, o que resulta na acumulação exponencial do DNA^[1].

MATERIAIS

Reagentes:

1 Alíquota da enzima Taq DNA polimerase (0.5 µL/reação)

- 2 Alíquotas dos primers específicos: forward e reverse (estoque 10 μM = 10 pmol/ μL)
- 1 Alíquota do mix de dNTPs (estoque 1 mM)
- 1 Alíquota do tampão de reação 10X (100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 500 mM KCl)
- 1 Alíquota de MgCl_2 (estoque 50 mM)
- 1 Alíquota de água Milli-Q (autoclavada)
- 1 Alíquota de DNA (100 ng/ μL)
- 2 Caixas de ponteiras: P10 e P100
- Microtubos de 200 μL
- Balde de descarte

Equipamentos:

- Conjunto de micropipetas de P10 e P100
- 1 Termociclador

Sequência dos Iniciadores usados:

- F: 5'- GGATCCAGACCCCCACAGTTTACGAG – 3' $T_M=59.06^\circ\text{C}$
R: 5'- CTCGAGGATGGTGGTATCCAGGTGAAC – 3' $T_M= 59.1^\circ$

MÉTODOS

Preparo do pré-mix

É extremamente importante que exista no laboratório uma área específica para a manipulação dos reagentes da PCR. Ela deve ser mantida limpa e livre de qualquer fonte de contaminação e para isto, alguns cuidados especiais devem ser tomados:

- 1 - O operador deve usar sempre avental limpo e luvas novas e estéreis.
- 2- Todo material usado deve ser livre de DNases e RNases.
- 3 - Não manipular material amplificado nesse ambiente.

Antes de Iniciar a PCR

- Antes de dar início à prática, fazer os cálculos referentes aos volumes dos reagentes a serem pipetados, usando as concentrações dos estoques descritas em “Materiais”, e concentrações de uso, descritas abaixo. Usar a Tabela 1.

A reação deverá ter um volume final de 20 μL .

- Primers: na concentração final = 1 μM

- dNTP: na concentração final = 0,2 mM
 - Tampão: na concentração final 1X
 - MgCl₂: na concentração final= 2,5 mM
 - Enzima Taq: 0,5 ui (0.5 µl)
 - DNA: concentração final = 10 a 100 ng/µL
- Após os cálculos, colocar todos os tubos dos reagentes a serem usados no gelo.
 - Pipetar no fundo do tubo de 200 µL os reagentes na seguinte ordem: Primers, dNTP, Tampão, MgCl₂, DNA e enzima, totalizando um volume final de 20 µL.
 - Colocar o tubo contendo a reação no gelo.
 - Centrifugar por aproximadamente 10 segundos e coloca-los novamente no gelo.
 - Programar o termociclador (ver abaixo) e colocar os tubos na máquina.
 - Iniciar a corrida (run).

Reagente	Concentração Estoque	Concentração Final	Volume
Primer 1	10 µM	1 µM	
Primer 2	10 µM	1 µM	
dNTP	1mM	0,2 mM	
Tampão	10X	1X	
MgCl₂	50 mM	2,5 mM	
Água	-	-	
Taq DNA Polimerase	0.5 µL	0.5 µL	
DNA	100 ng/ µL	10- 100 ng	
Volume final			20 µL

Tabela 1: Cálculo dos reagentes usados na PCR.

Termociclagem

- Programar o termociclador com as condições de PCR apropriadas para cada par de primers:

1º Passo: Desnaturação inicial - 94 °C por 10 minutos

2º Passo: Desnaturação - 94 °C por 1 minuto

3º Passo: Anelamento- 59 °C por 1 minuto

4º Passo: Extensão- 72 °C por 2 minutos

5º Passo: Voltar ao passo 2 x 30 vezes

6º Passo: Extensão final: 72 °C por 10 minutos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado final de múltiplos ciclos é o acúmulo exponencial de um fragmento específico. Visto que os primers são incorporados ao produto final da amplificação e que a inserção de sequências específicas no início ou final do primer não alteram a amplificação, novas informações, como sítios de enzimas de restrição, podem ser incorporadas ao produto final. Através da PCR é possível detectar: polimorfismos genéticos, mutações pontuais, deleções, inserções e até mesmo amplificar sequências de interesse para a clonagem em vetores de expressão, para produzir proteínas heterólogas.

Alguns problemas podem ocorrer durante a PCR, como: erros de pipetagem, contaminação, ou mesmo não amplificação. Assim, fazer os controles da reação de PCR é extremamente importante para e entender os resultados obtidos na PCR. O controle negativo informará a existência de contaminação e o positivo a eficiência da técnica^[1, 2, 3].

REFERÊNCIAS

[1] Rameshi, R; Munshi, A; Panda, SK. Polymerase chain reaction. The National Medical Journal of India, Vol.5, No.3, 1992.

[2] Staněk, L. Polymerázová řetězová reakce: princip metody a využití v molekulární patologii. Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology. Cesk Patol., 49(3): p.119-21, 2013.

[3] Green, MR; Sambrook, J. Polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Protoc. 1; (12), 2016.

Links:

PCR - Conceito e etapas:

https://youtu.be/tYY9B1_Crqs

PCR - Amplificação de fragmentos de DNA:

<https://youtu.be/iARqzqU9rhw>

PCR - Aplicação da técnica

https://youtu.be/s7dZw_WOGAA

Animação 3D:

<https://youtu.be/5YlfZwzRPa4>

Rotina de uma reação de PCR:

<https://youtu.be/rn40R5w5Fkw>

DIGESTÃO ENZIMÁTICA

OBJETIVOS

Realizar uma reação de digestão enzimática dupla para retirar um inserto de um plasmídeo circular.

INTRODUÇÃO

No início da década de 1950 alguns estudos foram publicados com intuito de relatar a resistência de algumas cepas bacterianas contra infecções por bacteriófagos^[1]. No ano de 1971 os pesquisadores Kathleen Danna e Daniel Nathans mostraram pela primeira vez que a enconuclease R (KpnI) isolada de *Klebsiella pneumoniae* possuía a capacidade de cortar o DNA do vírus símio 40 (SV40), produzindo fragmentos específicos e de forma reprodutível, ou seja, sempre com o mesmo padrão de fragmentos^[5]. Esse mecanismo foi mais tarde descrito como uma forma de defesa do hospedeiro contra material genético exógeno, atuando de forma a fragmentar o material genético do invasor e restringindo sua entrada, daí o termo enzimas de restrição^[1].

As enzimas de restrição, também conhecidas como endonucleases de restrição, são proteínas que reconhecem sequências de DNA curtas, específicas e frequentemente palindrômicas. Essas sequências são compostas por 4 – 6 nucleotídeos, que são clivadas dentro do sítio de restrição ou adjacentes às suas sequências de reconhecimento (pontas cegas ou coesivas)^[2]. Há quatro classes de enzimas de restrição, sendo que as pertencentes à classe II são as mais utilizadas na área da biologia molecular, elas necessitam de Mg^{2+} para atuarem. As endonucleases do tipo I, III e IV são menos empregadas devido à baixa especificidade de corte, realizado distante do sítio de restrição e, porque, geralmente, essa reação é dependente de ATP^[1].

As enzimas de restrição ficaram conhecidas como tesouras moleculares e sua descoberta proporcionou um avanço significativo no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante. Essas tesouras moleculares permitiram a clonagem de fragmentos do DNA de um organismo em plasmídeos, que foram inseridos em outros organismos (hospedeiro), criando na biologia molecular uma gama de possibilidades. A descoberta de que o DNA de diferentes espécies podiam ser clonados e propagados em outras espécies, marcou o início da clonagem dos genes e expressão de proteínas recombinantes, tendo a insulina humana, ganhado destaque naquela época^[2, 3, 4]

Além da clonagem, as enzimas de restrição têm sido muito utilizadas em diversas técnicas moleculares como: diagnóstico molecular, mapeamento, manipulação do DNA recombinante, análise de polimorfismos, entre outros. Ao utilizar diferentes combinações de enzimas de restrição, há muitas maneiras possíveis de caracterizar e manipular o DNA^[1].

MATERIAIS

Reagentes:

Aliquota das enzimas de restrição que serão utilizadas para a digestão dupla (ex: *Bam*HI e *Hind*III).

Aliquota de Plasmídeo (pUC18, pET21, pET28) 100 a 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Tampão das enzimas (10X)

Aliquota de BSA

Água Milli-Q

2 Caixas ponteiras: P10 e P100

Gases de algodão

Microtubos 500 μL

Parafilme

Manual das enzimas de restrição

Equipamentos:

Espectrofotômetro Nanodrop

Conjunto de micropipetas de P10 e P100

Banho-maria

Rack estante termooestável para microtubos (ou um suporte com gelo para os microtubos).

MÉTODOS

Digestão enzimática dupla (utilização de duas enzimas de restrição):

- Ao escolher as enzimas a serem usadas, verificar se não existe sítio de restrição dentro do inserto.
- Após selecionadas as enzimas, verificar no manual do fabricante as condições ideais de reação para cada enzima. Verificar o tampão indicado, a temperatura da reação, o tempo de reação e concentrações indicadas.
- Escolher um tampão em que as duas enzimas funcionem com maior eficácia, simultaneamente. Dê preferência para enzimas da mesma marca/fabricante (tampões universais)
- Descongelar a amostra contendo o plasmídeo e colocá-la no gelo juntamente com os demais reagentes.

- Dosar a amostra de DNA usando espectrofotômetro (260 nm)
- Ligar o banho-maria e programá-lo para a temperatura de 37 °C.
- Fazer os cálculos da quantidade de cada reagente a ser usado, em volume final de 20 μL de reação. Anotar na Tabela 1.
- Pipetar todos os reagentes da reação em um microtubo de 500 μL . Deixar sempre a enzima por último.
- Fechar o microtubo e passar parafilme para evitar a evaporação da amostra.
- Incubar a reação por 3 horas à 37 °C.

Reagentes	Volumes
Água milli-Q estéril	
Tampão 10X	
Enzima 1	
Enzima 2	
DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	
Volume Final	20 μL

Tabela 1: Reação de digestão enzimática.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nomenclatura das enzimas de restrição deriva do nome científico da espécie onde é extraída seguido da sua ordem de isolamento. Por exemplo, a enzima *EcoRI*, é a primeira endonuclease a ser isolada da estirpe R da bactéria *Escherichia coli*^[5].

As enzimas de restrição devem ser selecionadas considerando a sequência do inserto a ser clonado, do plasmídeo que receberá o inserto (sítio múltiplo de clonagem) e o propósito (subclonagem em outro vetor). Após o planejamento e execução da digestão dupla é esperado que o inserto de interesse seja retirado do plasmídeo de origem. Entretanto, em algumas condições, algumas enzimas podem cortar o DNA em locais inespecíficos, ou seja, em sequências diferentes do seu sítio de restrição. O nome deste fenômeno é “atividade estrela” (*star activity*) e acontece quando a reação de digestão do DNA não segue as condições consideradas ótimas para o funcionamento da enzima, descritos pelo fabricante.

A digestão do DNA será avaliada através de eletroforese em gel de acrilamida ou agarose, sendo que a escolha do gel irá depender do tamanho dos fragmentos esperados na reação. Para confirmar a digestão, é importante aplicar no gel a mesma amostra, não digerida (controle negativo) e ao padrão de peso molecular.

REFERÊNCIAS

[1] Felice FD; Micheli G; Camilloni G. Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. J Biosci, v. 44, n. 38: p.1-8, 2019.

[2] Bennett SP; Halford SE. Recognition of DNA by Type II Restriction Enzymes. Current Topics in Cellular Regulation, v. 30, n. 1: p.57-104, 1989.

[3] Celie PHN; Parret AHA; Perrakis A. Recombinant cloning strategies for protein expression. Current Opinion in Structural Biology, v. 38, n. 1: p.145-154, 2016.

[4] Vajo O; Fawcett J; Duckworth WC. Recombinant DNA Technology in the Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. Endocrine Reviews, v. 22, n. 5: p.706-717, 2001.

[5] Roberts, RJ; et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. Nucleic Acids Research, v. 37, n. 7: p.1805-1812, 2005.

Links:

Enzimas de restrição do DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=jCThfx-7tnM>

Enzimas de restrição - Análise da reação em eletroforese

<https://www.youtube.com/watch?v=8yqEEyigais>

Utilização de enzimas de restrição para clonagem de DNA

https://www.youtube.com/watch?v=EDF_T0t7gN0&t=171s

CLONAGEM EM PLASMÍDEO

OBJETIVO

Promover a ligação do inserto ao plasmídeo pET-21a (+).

INTRODUÇÃO

A clonagem molecular é uma técnica da engenharia genética também conhecida como tecnologia do DNA recombinante, clonagem gênica ou manipulação gênica. Esta tecnologia permite combinar partes ou sequências distintas de DNA, incluindo aquelas provenientes de organismos distintos, sendo capaz de produzir várias cópias dessas combinações genéticas. A tecnologia do DNA recombinante (rDNA) foi realizada pela primeira vez por Paul Berg, professor da Stanford University (USA), em 1972. A descoberta veio quando Berg utilizou enzimas de restrição e uma DNA ligase para criar a primeira molécula de DNA recombinante, resultando em um Prêmio Nobel em Química no ano de 1980 [1, 2].

Para ter sucesso na clonagem gênica, é importante ter em mente a finalidade do experimento, para que os materiais e estratégias sejam planejadas adequadamente. Por exemplo, um vetor de expressão bacteriano pode ser utilizado para expressar uma proteína humana em bactérias, entretanto, não terá sucesso se o hospedeiro for uma célula eucariota.

Existem quatro tipos de vetores de clonagem: i) o plasmídeo, ii) os fagos, iii) os cosmídeos e iv) os YAC's e BAC's (*yeast/bacterial artificial chromossomes*). Esses vetores se diferem no tamanho do fragmento de DNA que conseguem incorporar, na capacidade de expressar em determinados tipos celulares e no tempo de expressão. O mapa do vetor contendo a localização do promotor, dos sítios de restrição/sítio múltiplo de clonagem, do marcador de resistência à antibiótico ou gene repórter, devem ser cuidadosamente analisados antes de iniciar o experimento (Figura 1) [3].

Um ponto que deve ser considerado, juntamente com a escolha do vetor, é a célula escolhida para realizar a expressão gênica. O vetor e o hospedeiro estão intimamente ligados, principalmente pelo promotor presente no vetor que só responde a determinados tipos de células. Portanto, se o vetor não corresponder ao tipo celular escolhido, a expressão gênica pode não ocorrer.

De posse do vetor e inserto, o próximo passo da clonagem gênica é a ligação, reação executada pela enzima ligase. Essa enzima é extremamente importante para as células, pois está envolvida na replicação celular (junção dos fragmentos de Okazaki) e no sistema de Reparo (atua em quebras de fita simples/dupla unindo as cadeias). Essa enzima forma duas ligações fosfodiéster covalentes entre a extremidade 3' hidroxila de um nucleotídeo ("recetor") com a extremidade 5' fosfato de outro nucleotídeo ("dador"),

na presença de energia fornecida pelo ATP. Assim, as extremidades coesivas de dois fragmentos de DNA, obtidos por ação de enzimas de restrição, tendem a emparelhar devido à complementaridade das bases, e a ligação dos fragmentos é feita pela ação da ligase do DNA^[3, 4, 5].

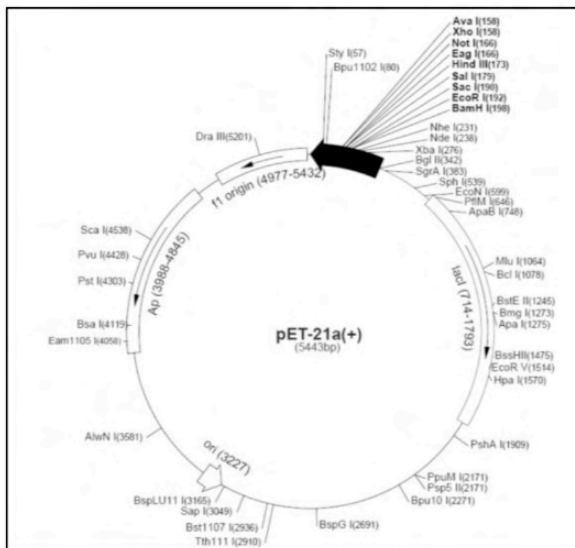


Figura 1: Mapa do vetor de Expressão pET21a. Addgene: pET-21a(+)-IS200.

MATERIAIS

- 100 ng de vetor
- 50 ng de inserto
- 1 μ L de tampão 10X (DNA ligase)
- 0,1 - 1 μ L T4 DNA ligase
- 10 μ L de água Milli-Q estéril
- 1 Microtubo de 0,2 mL
- 2 Caixas de ponteiras:P10 e P200
- 1 Descarte

Equipamentos:

- Termociclador ou banho-maria
- Centrífuga
- Conjunto de micropipetas de P10 e P100

METODOLOGIA

- Dosar o vetor e o plasmídeo a ser usado na prática (260 nm)
- Fazer o cálculo da quantidade de reagentes a ser adicionar na reação. Usar a fórmula abaixo.

$$\text{razão molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} \times \frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb so inserto}}{\text{kb do vetor}} = \text{ng do inserto}$$
$$\frac{3}{1} \times \frac{100 \text{ ng do vetor} \times 0,5 \text{ kb so inserto}}{3 \text{ kb do vetor}} = 50 \text{ ng do inserto}$$

Obs1: A quantidade sugerida é de 1:3 de vetor : inserto, essa quantidade varia conforme o tamanho do vetor e do inserto. Alguns autores recomendam adicionar uma quantidade de inserto maior que a do vetor, pois existe uma baixa probabilidade de ligação do inserto ao vetor ^[3]. A fórmula ilustra a conversão de razão molar em razões de massa, para saber a quantidade de inserto a ser adicionado.

Obs2: Como modelo será usado um vetor de 3 Kb e um inserto de 0,5 Kb. Reações de ligação usam de 100 a 200 ng de vetor, nesta prática será usado 100 ng de vetor^[4].

- Adicionar os reagentes ao microtubo de 0,2 mL, seguindo as quantidades descritas na Tabela 1. O Volume final da ligação será de 10 μ L.

Reagente	Quantidade
Vetor de DNA	100 ng
Inserto	50 ng
Tampão Ligase (10X)	1 μ L
T4 DNA Ligase	0,1- 1 μ L
Água Milli-Q	Completar para 10 μ L

Tabela 1: Cálculo dos reagentes usados na ligação.

- Incubar a reação em um termociclador ou banho usando uma das seguintes condições abaixo:
 - 1- Por 3 horas à temperatura ambiente.
 - 2- Por 16 a18 horas à temperatura de 4 °C.
 - 3- Por 4 a 18 horas à temperatura de 15 °C.
- Decorrido o intervalo, proceder à eletroporação das células hospedeiras de interesse com o produto de ligação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O marco científico da clonagem e expressão heteróloga bem sucedida foi representada pela produção da insulina recombinante no ano de 1977, que promoveu o tratamento de pacientes diabéticos^[3, 4, 5].

A prática da clonagem gênica usa como produtos provenientes de outras práticas: 1-síntese de primers, 2- extração do DNA genômico, 3-PCR, digestão enzimática do inserto e do plasmídeo e por fim, 4- a ligação. Aqui, os produtos da digestão enzimática dupla, tanto do plasmídeo quanto do produto de PCR (inserto), foram ligados de forma unidirecional, na presença da enzima DNA ligase. Essa enzima permitiu o pareamento dos fragmentos digeridos e a reconstrução das ligações fosfodiéster entre as duas fitas de DNA utilizando a energia liberada pelo ATP. Essa união forma o que chamamos DNA recombinante. Nos passos seguintes veremos como ocorre a inserção deste DNA dentro de uma célula hospedeira, no processo de eletroporação^[6, 7, 8].

O sucesso da reação de ligação depende da adição dos reagentes nas concentrações e volumes corretos, visto que o funcionamento da DNA ligase depende diretamente da sua concentração, da concentração de ATP, do tamanho e coesão dos fragmentos, da temperatura, e por fim, do pH da reação, que deve estar entre 7,8 e 8,0. Outros fatores responsáveis pelo insucesso da reação podem estar relacionados a complementariedade das extremidades do vetor e a sucessivos descongelamentos do tampão de ligação que contém ATP, devido às cargas negativas dos grupos fosfatos em pHs entre 5 e 8. Essas cargas negativas geram repulsão dentro da própria molécula de ATP e com uma certa sequência de descongelamentos pode resultar na sua degradação^[9].

Vários vetores estão disponíveis no mercado para expressão de proteínas recombinantes em diferentes hospedeiros. A *Escherichia coli* é um modelo padronizado em muitos laboratórios devido à praticidade do crescimento dessa célula, entretanto, é importante lembrar que essa célula não faz modificações pós traducionais. Os plasmídeos mais comuns para expressão heteróloga nesse modelo são os da série pET (*plasmid for expression by T7 RNA polimerase*) que também apresentam marcadores de resistência a antibióticos, como a ampicilina.

REFERÊNCIAS

[1] Os princípios da clonagem molecular: DNA recombinante. KASVI, 2017. Disponível em: <<https://kasvi.com.br/clonagem-molecular-dna-recombinante/>>. Acesso em: 08 de outubro de 2021.

[2] ARAGÃO F. A trajetória dos organismos transgênicos. EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/olhares-para-2030/artigo/-/asset_publisher/SNN1QE9zUPS2/content/francisco-jose-lima-aragao?inheritRedirect=true>. Acesso em: 08 de outubro de 2021.

[3] Vedoneli NCPS; CASTRO VP. Manual de Construção de Vetores de Expressão. Universidade De São Paulo. Ribeirão preto, 2016.

[4] T4 DNA Ligase Protocol. Promega Corporation, 2018.

[5] Siqueira FF. Caracterização molecular, clonagem e expressão de isoformas da toxina alfa de Clostridium perfringens e sua aplicação na imunização de animais. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p.42, 2013.

[6] Molinaro EM; Caputo LFG; Amendoeira MRR. (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v. 3. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2013.

[7] College O. Biology. Houston: OpenStax, Cnx Biology, 2012.

[8] Pascal J.M. DNA and RNA ligases: structural variations and shared mechanisms. Current Opinion in Structural Biology. Epub, 18(1): p.96-105, Feb, 2008.

[9] Chauhan T. What is DNA Ligase? And How T4 DNA Ligase Works? Genetic Education, 2019. Disponível em:<https://geneticeducation.co.in/what-is-dna-ligase-and-how-t4-dna-ligase-works/#The_function_of_DNA_ligase_in_recombinant_DNA_technology>. Acesso em: 08 de janeiro de 2022.

Links:

Clonagem de DNA e DNA recombinante

https://youtu.be/EDF_T0t7gN0

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE E COLORAÇÃO

OBJETIVO

Desenvolver habilidades quanto ao preparo do gel de acrilamida, montagem da cuba, realização da eletroforese e revelação do gel através da coloração por prata.

INTRODUÇÃO

A eletroforese em gel é uma técnica bioquímica para separação de moléculas com base na sua carga elétrica e peso molecular. A separação de partículas utilizando a carga elétrica foi proposta por Tiselius em 1937, mas só foi aplicada para separação de DNA em meados dos anos 60 por Vin Thorne^[1, 4].

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são exemplos de moléculas que possuem carga elétrica (negativa), devido à presença do grupo fosfato na molécula. Essa característica é usada para impulsionar a migração destas moléculas através de um gel utilizando corrente elétrica e pode separá-las conforme o tamanho. Uma vez isolado o fragmento de DNA de interesse, ele pode ser utilizado para diversos propósitos: PCR, clonagem, digestão enzimática, sequenciamento, etc^[1, 2].

O gel de eletroforese pode ser obtido usando diferentes reagentes que formam malhas, dentre eles os mais usados são a acrilamida e a agarose. A acrilamida é um dos principais e mais versáteis materiais para a produção do gel eletroforético. A reação de ligação entre a molécula linear de acrilamida a uma molécula ramificada da bisacrilamida é capaz de gerar uma malha fina o suficiente para apresentar resistência à passagem das moléculas de DNA. A polimerização da mistura de acrilamida é conseguida pela adição de persulfato de amônio, que vai ceder o átomo de enxofre que se posicionará na junção entre as moléculas de acrilamida na formação do polímero. Essa reação é catalisada pela adição do Temed (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina), tudo sempre na presença do tampão TBE (Tris borato EDTA)^[2].

A concentração de acrilamida total para a produção do gel pode ser alterada de acordo com a faixa de tamanho do DNA de interesse, de forma que a malha fique mais ou menos fina (Tabela 1). A eletroforese também pode ser realizada no modo desnaturante, com a adição de componentes como ureia e formamida, que vão manter o DNA em fita simples durante a eletroforese^[2].

Concentração do Gel %	Bis Acrilamida 29:1 (mL)	Água (mL)	TBE 5X (mL)	Persulfato de Amônia 10% (µL)	Temed (µL)
3,5	11,6	67,7	20	700	30,5
5	16,6	62,7	20	700	30,5
8	26,6	52,7	20	700	30,5
12	40	39,3	20	700	30,5
20	66,6	12,7	20	700	30,5

Tabela 1: Lista de soluções e proporção de mistura para o preparo do gel de acrilamida em diferentes concentrações (para 100 mL).

O conhecimento prévio da amostra também vai auxiliar na escolha do padrão de peso molecular, que é uma amostra contendo fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos. Eles são vendidos comercialmente e vem acompanhados de um mapa de migração dos fragmentos presentes. Esse padrão deve ser aplicado no gel, ao lado das amostras de estudo e, a distância de migração dos seus fragmentos são comparados aos da amostra de interesse, permitindo estimar o tamanho aproximado das bandas da amostra. O seu uso também permite, em alguns casos, fazer uma estimativa da concentração do DNA presente na amostra de estudo, através da comparação da intensidade de brilho das bandas do padrão e da amostra desconhecida (Figura 1).

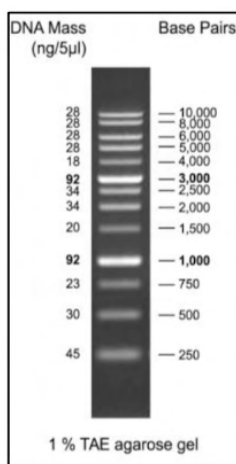


Figura 1: Mapa do Padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder RTU da empresa Simply®.

Perfil eletroforético de um padrão de peso molecular mostrando o padrão migratório de fragmentos de diferentes tamanhos pontuados à direita (*base pair*: pares de base), e bandas de diferentes intensidades relacionadas com a concentração de cada fragmento pontuado à esquerda (*DNA mass*: massa de DNA).

Visto que o gel está polimerizado entre placas de vidro com aparato (pente) para

formação das canaletas, ele é mergulhado em uma cuba eletroforética, contendo tampão de corrida TBE (Tris borato EDTA). Em seguida, prossegue a aplicação das amostras e, para garantir que o DNA em solução aquosa alcance o fundo da canaleta preenchida pelo tampão de corrida, a amostra deve ser misturada ao chamado tampão de carregamento. Este contém glicerol, um reagente com alta densidade, o que permite com que o DNA seja carregado para o fundo do poço. Além disso, esse tampão possui corantes específicos, que vão auxiliar no acompanhamento da migração das amostras pelo gel. Os corantes presentes no tampão de amostra também migram pelo gel no mesmo sentido do DNA, porém podem ser observados a olho nu durante o experimento. Os corantes mais usados são azul de bromofenol e xileno cianol (Tabela 2).

Concentração do Gel (%)	Tamanho dos fragmentos separados (pb)	Azul de Bromofenol (pb)	Xileno Cianol (pb)
3,5	100 a 1000	100	460
5,0	100 a 500	65	260
8,0	60 a 400	45	160
12,0	50 a 200	20	70
15,0	30 a 150	15	60
20,0	5 a 100	12	45

Tabela 2: Migração dos corantes Azul de Bromofenol e Xileno Cianol em diferentes concentrações de géis de poliacrilamida não desnaturante.

O experimento eletroforético é então realizado através da aplicação de uma voltagem específica, que é diretamente responsável pela velocidade de migração. Voltagens em média de 80 a 120 V são recomendadas na eletroforese em poliacrilamida.

Após a finalização da corrida, a posição do(s) fragmento(s) de DNA no gel precisa ser revelada. Para isto é usada a coloração por prata, um reagente com alta sensibilidade, que consegue marcar o DNA presente no gel, mesmo que este esteja em concentrações muito baixas. A coloração por prata é um método de simples execução, em que são usadas três soluções específicas para tratar o gel: 1) a solução fixadora, que é responsável por estabilizar o DNA e evitar sua dispersão pelo gel; 2) a solução corante, que contém os íons de prata, responsáveis por se ligar no DNA e por fim 3) a solução reveladora, que possui formaldeído na sua composição e promove a oxidação dos íons de prata ligados ao DNA. Nessa etapa ocorre a revelação do gel, com o aparecimento de regiões escuras correspondentes às bandas/fragmentos de DNA^[3].

MATERIAIS

Reagentes:

- 3 mL de Bis acrilamida 29:1
- 10 mL de Água deionizada
- 70 μ L de Persulfato de amônio
- 4 μ L Temed
- 2 mL de TBE 5X (tampão de corrida)
- 1 L de TBE 1X
- 1 mL Tampão de carregamento (tampão de amostra)
- 1 rolo de Parafilme
- 1 Tubo tipo Falcon de 50 mL
- 10 μ L de Padrão de DNA 100 pb ou 1 Kb
- 1 Lixeira para descarte
- 3 Caixas de ponteiras: P10, P100 e P1000

Equipamentos:

- Cuba vertical com placas, pentes, espaçadores e fios
- Fonte de eletroforese
- Transiluminador
- Computador para programa captura da imagem
- Conjunto de micropipetas de P10, P100, P1000
- Agitador de placa

SOLUÇÕES

Acrilamida 29:1 (bis acrilamida)

- 145 g de Acrilamida
- 5 g de Bis-acrilamida
- Água qsp 500 mL

TBE 5X

- 54 g de Tris base

27,5 g de Ácido bórico

3,72 g de EDTA

Água qsp 1000 mL

Ajustar pH para 8,3

Soluções coloração do gel

250 mL de solução fixadora (10% de etanol, 0,5% de ácido acético);

250 mL de solução com prata (0,5 g de nitrato de prata para 250 ml de solução fixadora)

250 mL de solução de revelação (3% NaOH, 0,5% formaldeído)

MÉTODOS

Preparação do Gel e Corrida

- Preparar as placas e a cuba onde será realizada a corrida, verificar a espessura dos pentes e espaçadores, eles devem ser compatíveis.
- Preparar 10 mL de solução para gel a 8% de bisacrilamida, seguindo as indicações contidas na Tabela 3, adicionar os reagentes em um Falcon de 50 mL, exceto o Temed, que deverá ser colocado por último.

10 mL de gel 8%
2,66 mL de bisacrilamida
5,27 mL de água
2 mL de TBE5X
70 µL de Persulfato de amônia
4,0 µL de Temed

Tabela 3: Protocolo para produção de 10 mL de gel de poliacrilamida 8%.

- Adicionar o Temed quando a cuba e os aparatos de gel estiverem prontos para receber o gel.
- Colocar a solução na placa e em seguida colocar os pentes.
- Aguardar aproximadamente 15 a 30 minutos para a polimerização do gel.
- Colocar o gel na cuba, posicionando adequadamente para evitar vazamento e para a passagem adequada da corrente elétrica.
- Adicionar TBE 1X, para preencher a cuba.
- Fazer o mapa da placa, com o posicionamento das amostras.

- Colocar padrão de peso molecular 100 pb ou 1 Kb em uma das canaletas (primeira ou última).
- Misturar a amostra ao tampão de carregamento 6X e em seguida aplicar na canaleta.
- Após a aplicação de todas as amostras, o sistema deve ser fechado e os fios ligados aos polos corretos, na cuba e na fonte.
- Programar a corrida na fonte. Correr o gel a 80 volts por aproximadamente 1h e 30 min.
- Decorrido o intervalo, retirar o gel da cuba e proceder à coloração pelo método da prata.

Procedimento de coloração pela prata:

- Colocar o gel em solução fixadora por 15 minutos sob agitação.
- Retirar a solução fixadora.
- Adicionar solução de prata e deixar por 10 minutos sob agitação.
- Decorrido este intervalo, retirar a solução de prata. Cuidado ao manusear o gel, pois ele pode manchar.
- Lavar 2 vezes com água destilada.
- Adicionar a solução de revelação e agitar por 10 minutos ou até aparecerem as bandas.
- Retirar da solução reveladora e levar o gel ao aparelho transiluminador para capturar a imagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira observação que deve ser feita com a coloração em prata é a aparição das bandas do padrão seguido pela aparição das bandas da amostra. A coloração de prata marcou sua amostra com intensidade suficiente para análise? Deve-se analisar o padrão de bandas da amostra com o conhecimento prévio da amostra. As bandas do padrão se separaram o suficiente para permitir distinção entre elas com qualidade? Uma corrida mais extensa pode ajudar na separação das bandas que vai facilitar a validação do resultado, por outro lado, a aplicação de alta voltagem pode elevar muito a temperatura de todo sistema, o que gera deformidades na migração do DNA pelo gel. Quantas bandas foram observadas na amostra? A coloração de prata é capaz de marcar DNA em baixas concentrações, revelando contaminantes na sua amostra. Essa banda é difusa ou bem definida? Alterações no pH das soluções tamponantes podem levar a uma corrida difusa das amostras de DNA no gel; tempo excessivo em soluções corantes têm o mesmo efeito. Qual o tamanho das

bandas, em pares de base, quando usamos o padrão para comparação?

REFERÊNCIAS

[1] Cantor CR; Smith CL. Genomics: The Science and Technology Behind the Human Genome Project. Copyright John Wiley & Sons, Inc: p.596, 1999.

[2] Slater GW; Guillouzic S; Gauthier MG; Mercier JF; Kenward M; McCormick LC; Tessier F. Theory of DNA electrophoresis (~ 1999–2002½). Electrophoresis, 23(22-23): p.3791-3816, 2002.

[3] Bassam BJ; Caetano-Anollés G; Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 196(1): p.80-83, 1991.

[4] Roberts GA; Dryden DTF. DNA Electrophoresis: Historical and Theoretical Perspectives. DNA Electrophoresis: p.1-9, 2013.

Links:

Eletroforese - Técnica e equipamentos

<https://youtu.be/Y-sl523tDEE>

Animação da eletroforese

<https://youtu.be/ZDZUAleWX78>

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E COLORAÇÃO

OBJETIVO

Desenvolver habilidades na preparação de gel de agarose, praticar os passos compreendidos desde a montagem da cuba até a realização da eletroforese e visualização do gel corado pelo brometo de etídeo.

INTRODUÇÃO

A eletroforese em gel de agarose, assim como no caso de géis de poliacrilamida, é uma metodologia desenvolvida nos anos 60. A agarose oferece algumas vantagens em relação à acrilamida, como menor custo, rapidez e facilidade no preparo do gel. No entanto, sua resolução é menor que a poliacrilamida, porém é o suficiente para separar ácidos nucleicos através do tamanho utilizando suas cargas negativas para forçar a migração.

O preparo do gel de agarose é mais simples, a adição da agarose em pó em tampão salino TAE ou TBE, seguida de aquecimento é suficiente para acelerar a dissolução da agarose que ao se resfriar, solidifica em forma de gel. Esse gel é montado em fôrmas horizontais com formação de canaletas para aplicação das amostras e mergulhado também em tampão TAE ou TBE. Assim, como realizado na prática do gel de acrilamida, as amostras de DNA são preparadas em tampão de carregamento, composto por glicerol, que é responsável por carrear a amostra para o fundo do poço e dos corantes: azul de bromofenol e xileno cianol, que auxiliam no acompanhamento visual da corrida^[1, 2].

A escolha da voltagem também é importante na eletroforese em gel de agarose. Voltagens altas podem levar ao aquecimento do sistema e conseqüente derretimento da agarose, o que compromete o experimento, 10 V/cm de distância entre os eletrodos da cuba eletroforética é a voltagem aconselhada para o experimento, cerca de 80 V para as cubas convencionais. O padrão de peso molecular com fragmentos conhecidos de DNA, também é usado no gel de agarose para comparação com as bandas da amostra e estimativa dos tamanhos da amostra. Ao fim da corrida, o gel é banhado em uma solução contendo brometo de etídeo, composto capaz de intercalar a molécula de DNA, revelado ao ser exposto à radiação UV. Uma banda ou fragmento de DNA de interesse pode, inclusive, ser retirada e purificada a partir do gel e, posteriormente, ser usada em futuros ensaios ^[1, 2].

Nota: O brometo é um potente agente mutagênico, a manipulação deve ser feita com luvas e o material contaminado deve ser mantido separado dos demais.

QUANDO USAR TAMPÃO TAE OU TBE?

Ambos tampões, tanto TAE (1X) como TBE (1X ou 0,5X) podem ser usados para moléculas de DNA menores que 12 a 15 Kpb. Para fragmentos de DNA maiores, é

recomendável utilizar TAE associado a um baixo campo de força (1 a 2 V/cm). Durante longas corridas eletroforéticas, a maior porosidade e menor campo de força diminui a tendência à quebra do DNA. O TBE também é preferido para a separação de moléculas pequenas de DNA (< 1kb), quando a recuperação do DNA não é necessária. A interação do tampão TBE com a agarose resulta em poros menores. Esse gel mais compacto reduz a expansão das bandas de DNA, causado pela dispersão e difusão.

A taxa de depleção de tampão depende do tampão usado e sua capacidade tamponante. Um tampão TBE 0,5X possui uma capacidade tamponante maior do que TAE 1X, no pH utilizado, pois o pKa do Borato é mais próximo ao pH inicial do tampão do que o pKa do acetato. Cubas de eletroforese de tamanho padrão (15 x 30 cm) com capacidade de 1,5 a 2 litros podem tolerar 40 a 50 Watt-horas antes da perda da capacidade tamponante. A perda da capacidade tamponante em mini-cubas de eletroforese, não ocorre antes de 10 a 13 Watt-horas. As indicações de perda da capacidade tamponante advém da fusão do gel, formação de rastro de DNA, e/ou sobre-aquecimento. Esses efeitos de perda de capacidade tamponante e desenvolvimento de gradiente de pH podem ser reduzidos pela recirculação do tampão. Isso é normalmente necessário apenas quando a eletroforese é feita por longos períodos ou o tampão de eletroforese possui baixa capacidade tamponante.

MATERIAIS

Reagentes:

- 0,4 g de Agarose
- 1 Erlenmeyer de 250 mL
- 1 μ L de Brometo de etídeo
- 10 μ L de Padrão de peso molecular
- 1 L de TAE 1X (tampão de corrida)
- 1 mL de Tampão de carregamento (tampão de amostra)
- 1 conjunto de cuba de eletroforese com pentes
- 1 Fonte de eletroforese
- 1 Espátula
- 1 rolo de papel filme
- 3 Caixas de ponteiras: P10, P200 e P1000
- 1 Lixeira para descarte

Equipamentos:

Microondas
Transiluminador
Computador com programa captura de imagem
Conjunto de micropipetas de P10, P100, P1000

SOLUÇÕES

Tampão TAE (50x)

242 g- TRIS base (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) (40 mM)
57,1 mL- Ácido acético glacial (40 mM)
100 mL- Solução de EDTA dissódico (Na_2 EDTA) 0,5 M (pH 8,0)
Água destilada qsp 1 litro

Solução de EDTA dissódico 0,5 M (pH 8,0)

186.1 g de etilenodiaminotetraacetato dissódico (EDTA)
800 mL de água destilada. Agitar vigorosamente. Ajustar o pH a 8,0 com hidróxido de sódio, NaOH.
Acertar para 1L e esterilizar por autoclavagem.

MÉTODOS

Preparação do Gel:

- Pesar 0,4g de agarose em um erlenmeyer e adicionar 40 mL de TAE (1X), tampar com papel filme.
- Colocar o material 1 minuto no microondas, com as luvas térmicas retirar o material.
- Homogeneizar e caso não tenha dissolvido colocar mais um minuto no microondas.
- Esperar o líquido esfriar, até que seja possível segurar o recipiente sem se queimar (aproximadamente 5 minutos).
- Preparar as camas e pentes.
- Verter o líquido na cama e em seguida colocar os pentes, que irão formar as canaletas (Evitar bolhas).

Corrida

- Colocar o gel na cuba de eletroforese.
- Colocar o TAE 1X até cobrir todo o gel.
- Adicionar 5 μL do marcador de peso molecular na primeira ou última canaleta do gel.
- Em um microtubo de 0,2 mL misturar 10 μL do produto de DNA com 2 μL da solução carreadora 6X (tampão de amostra).
- Aplicar todo volume do tubo em um dos poços do gel (12 μL). Fazer esse procedimento com todas as amostras.
- Fechar o sistema e aplicar uma voltagem de 80 V na fonte, já conectada à cuba.
- Verificar a formação de microbolhas no eletrodo quando a corrida iniciar, indicando que a corrida está acontecendo.
- Aguardar em torno de 45 minutos.

Obs: Se, no próprio equipamento de aplicação de corrente, os valores de miliamperagem estiverem zerados, significa ausência de passagem de corrente, checar se os eletrodos estão definitivamente conectados. Lembre-se de orientar o DNA para correr em direção ao polo positivo da cuba.

COLORAÇÃO

- Retirar o gel da cuba e colocar na solução de coloração de brometo de etídeo por cerca de 30 minutos na câmara escura ou cobrindo o recipiente com papel alumínio.
- Levar o gel ao transiluminador.
- Capturar as imagens.

Obs: o Transiluminador emite luz UV para excitar o Brometo de etídeo. Proteja o rosto, mãos e principalmente os olhos utilizando *face shield* ou óculos de proteção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O brometo de etídeo vai marcar o DNA em um sinal luminoso que pode ser visualizado através do transiluminador e pode ainda ser registrado ou documentado a partir de equipamento de imagem conectado. A qualidade das bandas reveladas deve ser analisada em relação à definição e separação das bandas do padrão. Algumas questões devem ser consideradas durante as análises, como: quantas bandas foram observadas

na amostra? Essa banda é difusa ou bem definida? Qual seu tamanho em pares de base quando usamos o padrão para comparação?

Alterações no pH das soluções tamponantes podem levar a uma corrida difusa das amostras de DNA no gel; tempo excessivo em soluções corantes têm o mesmo efeito.

REFERÊNCIAS

[1] Charles R; Cantor CL. Smith Genomics: The Science and Technology Behind the Human Genome Project. John Wiley & Sons, Inc. Copyright © 2004.

[2] Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. Electrophoresis, 30(S1): p.188-S195, 2009.

Links:

Eletroforese horizontal de DNA em gel de agarose:

<https://www.youtube.com/watch?v=vL3EfRx78P0>

Agarose Gel Electrophoresis of DNA fragments amplified using PCR

<https://www.youtube.com/watch?v=kjJ56z1HeAc>

PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES

OBJETIVOS

Produzir células eletrocompetentes com capacidade de hospedar e replicar um DNA exógeno, treinar os procedimentos de manuseio, crescimento e cultivo de células bacterianas.

INTRODUÇÃO

Em 1928 Fred Griffith descreveu que o material biológico de uma cepa de *Streptococcus* patogênico foi capaz de transformar em patogênica uma cepa de *Streptococcus* não patogênica^[1]. Posteriormente, foi descoberto que esse material transformador é o DNA^[2, 3, 4]. Além dessa captação natural do material genético do ambiente descrita por Griffith, há outros dois processos naturais nos quais as bactérias podem obter DNA exógeno: a conjugação e a transdução. A conjugação consiste na transferência de DNA de uma célula para outra célula por contato direto e a transdução é transferência do material genético através das infecções por bacteriófagos (vírus de bactérias)^[5, 6, 7].

A partir dessas observações surgiu a necessidade de desenvolver sistemas de transferência de genes mais eficientes, em que o DNA deve ser facilmente transferível e mantido de forma estável em qualquer espécie bacteriana. A inserção de moléculas exógenas em células vivas pode ser obtida, por vários métodos distintos, sendo os dois principais o choque térmico e a eletroporação, onde as células são submetidas às mudanças de temperatura e ao choque elétrico, respectivamente. Em ambos os métodos a função é abrir momentaneamente a membrana celular e permitir assim, a entrada das moléculas de interesse para o interior da célula.

A eletroporação é amplamente utilizada para inserção de genes e também de drogas e em uma célula viva. Nessa técnica, as células são submetidas a um intenso e curto pulso elétrico, o que provoca flutuações térmicas espontâneas dos lipídios de membrana. Como consequência, ocorre a abertura de poros hidrofílicos e o aumento da permeabilidade da bicamada lipídica^[8].

Durante a eletroporação as células passam por uma sequência de fases: primeiro ocorre a formação momentânea dos poros decorrente do curto e intenso pulso elétrico; em seguida, ocorre uma expansão do tamanho dos poros que é dependente do tempo de duração dos pulsos elétricos e geralmente, tem duração de micro a milissegundos; por fim, após a aplicação do pulso elétrico, ocorre a recuperação da membrana que consiste no fechamento dos poros com duração vários minutos^[9].

A técnica de eletroporação foi, inicialmente, introduzida por Potter et al. em 1984^[10] com a transformação de células de mamíferos. Em seguida, a técnica foi aplicada em protoplastos de plantas por Watts et al., 1987^[11] e neste mesmo ano, Chassy et al., 1987

produziram bactérias eletrocompetentes, *Lactobacillus casei*, um microrganismo gram-positivo^[12]. Desde então, novos protocolos, visando melhorar a eficiência de transformação através da desestabilização da parede celular das células, foram desenvolvidos^[13,14,15], o que torna as células mais permeáveis às macromoléculas exógenas.

Os processos de replicação de genes e a obtenção de seus produtos exigem o uso de células hospedeiras capazes de receberem os fragmentos de DNA exógenos e de expressá-los em grande escala. Células hospedeiras capazes de receber o DNA exógeno são ditas competentes e seu preparo é uma etapa central do processo e tem grande impacto na eficiência da transformação, ou seja, na obtenção de células contendo a molécula exógena.

MATERIAIS

Reagentes:

- 1L Meio LB (L-Broth) autoclavado
- 2 Erlenmeyers: 1 de 50 mL e 1 de 2000 mL- estéril
- 1 Proveta 100 mL- estéril
- 4 Pipetas sorológica (1 mL, 5 mL, 10 mL e 25 mL)- estéril
- 3 Caixas de ponteiras: P10, P100, P1000 estéril
- 1 Caixa de isopor média com Gelo
- 6 Tubos de centrifuga gelados- estéril
- 1 L de solução de glicerol 10% autoclavado e gelado- estéril
- 40 Microtubos de 0,1 mL gelados - estéril

Obs: por não ser usado antibiótico na preparação das células eletrocompetentes, é essencial que todo material usado seja esterilizado.

Equipamentos:

- Capela de fluxo laminar
- Centrífuga refrigerada
- Shaker a 37 °C
- Cubetas para espectrofotômetro
- Espectrofotômetro
- Autoclave
- Conjunto de micropipetas de P10, P100, P1000

MEIO DE CULTURA

Meio LB (L-Broth):

10g de Bacto-triptona

5g de extrato de levedura

5g de NaCl

H₂O qsp 1000 mL

Ajustar o pH para 7,2 e autoclavar a 121 °C por 20 minutos. Armazenar a temperatura ambiente

MÉTODOS

Pré-inóculo bacteriano

- Irradiar a capela de fluxo laminar com luz UV (Ultravioleta) por 20 minutos.
- Em um erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio LB, adicionar 10 µL do estoque de bactérias (XL-Blue ou DH5α).
- Incubar sob agitação de 200 a 300 RPM por 16 horas a 37 °C.

Inóculo bacteriano

- Irradiar a capela de fluxo laminar com luz UV (Ultravioleta) por 20 minutos.
- Em um erlenmeyer de 2000 mL contendo 500 mL LB, adicionar 5 mL da cultura do pré-inóculo.
- Verificar a OD₆₀₀ inicial, ela deve estar entre 0,08 – 0,1.
- - Incubar sob agitação (300 RPM) a 37 °C, até que a cultura atinja a OD₆₀₀ (densidade óptica a 600 nm) de 0,4 – 0,6.
- Resfriar o erlenmeyer contendo a cultura em banho de gelo por 20 minutos.
- Em capela de fluxo laminar, transferir de forma equilibrada a cultura para frascos de centrifuga, previamente gelados.
- Centrifugar os frascos em centrífuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos a 4000 g.
- Descartar todo o sobrenadante cuidadosamente.
- Ressuspender gentilmente as células bacterianas utilizando o mesmo volume de solução de glicerol 10% gelada.
 - **Obs1**: todos os procedimentos seguintes são realizados sob banho de gelo.
 - **Obs2**: inicialmente, adicione pequeno volume para o deslocamento das células, em seguida complete o volume. Usar a proveta estéril para medir o

volume a ser adicionado.

- Centrifugar os frascos em centrífuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos a 4000 g.
- Descartar todo o sobrenadante cuidadosamente.
- Ressuspender gentilmente as células bacterianas utilizando metade do volume de solução de glicerol 10% gelada.
- Centrifugar os frascos em centrífuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos a 4000 g.
- Descartar todo o sobrenadante cuidadosamente.
- Ressuspender gentilmente as células bacterianas utilizando 20 mL de solução de glicerol 10% gelada.
 - **Obs3:** nesta etapa, juntar as células bacterianas dos distintos frascos em um único tubo de centrifugação.
- Centrifugar o frasco em centrífuga refrigerada a 4°C por 15 minutos a 4000 g.
- Descartar todo o sobrenadante cuidadosamente.
- Ressuspender gentilmente as células bacterianas utilizando cerca de 1 a 2 mL de solução de glicerol 10% gelada. A concentração de células de ser em torno de $1-3 \times 10^{10}$ células/mL.
- Distribuir alíquotas de 50 µL da cultura bacteriana eletrocompetente em tubos de 100 µL estéreis, previamente gelados e manter em banho de gelo.
- Armazenar no freezer a -80 °C por até 6 meses.

Leitura da OD₆₀₀:

- Ajustar o espectrofotômetro para a leitura a 600 nm.
- Em uma cubeta limpa adicionar 1 mL do meio LB (branco).
- Em uma segunda cubeta limpa adicionar 1 mL da cultura em crescimento.
- Zerar o aparelho utilizando a cubeta contendo somente o meio LB.
- Realizar a leitura da cultura em crescimento e anotar a OD600.
- Caso não tenha atingido o valor desejado (0,4 - 0,6), incubar a cultura novamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As etapas de preparo de células eletrocompetentes devem ser rigorosamente seguidas para otimizar a obtenção de células com alta eficiência de transformação. Uma dessas etapas, é o recolhimento das células de *E. coli*, que deve ser realizada na fase exponencial tardia de crescimento, o que é conseguido através das leituras regulares da

OD₆₀₀^[15]. É importante ter em mente que a cultura bacteriana usada (*E.coli*) o número de células duplica a cada 20 ou 30 minutos.

Outra etapa também crucial é lavar as células para remover íons presentes no meio de cultivo, dado que o processo de eletroporação na presença de alta força iônica causa aquecimento elétrico, gerando fagulha, o que conseqüentemente, leva ao aumento de temperatura, matando as células. A solução de glicerol 10% usada para as lavagens das células e, também usada como meio para a eletroporação, aumenta a resistência elétrica e, conseqüentemente, o tempo de duração do pulso elétrico, bem como limita o extravasamento citoplasmático durante a formação dos poros transitórios na membrana e parede celular^[6].

REFERÊNCIAS

[1] Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hyg.*, 27(2): p.113-159, 1928.

[2] Avery OT; MacLeod CM; McCarthy RL. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. *J Exp Med.*, 79(2): p.137-158, 1944.

[3] McCarty M; Avery OT. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal type 2. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transformation substance. *J Exp Med.*, 83(2): p.89-96, 1946.

[4] McCarty M; Avery OT. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal type 3. An improved method for the isolation of the transforming substance and its application to Pheumococcus type-II, type-III, and type VI. *J Exp Med.*, 83(2): p.97-104, 1946.

[5] Johnsborg O; Eldholm V; Havarstein LS. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *ResMicrobiol.*, 158(10): p.767-778, 2007.

[6] Chen I; Christie PJ; Dubnau D. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science*, 310: p.1456-1460, 2005.

[7] Lederberg J. Infectious history. *Science*, 288(5464): p.287-293, 2000.

[8] Neumann E; Toensing K; Kakorin S; Budde P; Frey J. Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells, *Biophys. J.*, 74(1): p.98-108, 1998.

[9] Leontiadou H; Mark AE; Marrink SJ. Molecular dynamics simulation of hydrophilic pores in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 86, p.2156-2164, 2004.

[10] Potter H; Weir L; Leder P. Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: p.7161-7165, 1984.

[11] Watts JW; King JM; Stacey NJ. Inoculation of protoplasts with viruses by electroporation. *Virology*, 157: p.40-46, 1987.

[12] Chassy BM; Flickinger JL. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Lett.* 4: p.173-177, 1987.

[13] Lelie D; Vosson J; Venema G. Effect of plasmid incompatibility on DNA transfer to *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: p.865-871, 1988.

[14] Calvin NM, Hanawalt PC. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.*, 170: p.2796-2801, 1988.

[15] Kim AY; Blaschek HP. Construction of an *Escherichia coli*–*Clostridium perfringens* shuttle vector and plasmid transformation of *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol.*, 55: p.360-365, 1989.

Links:

Sistema de eletroporação

<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006217A.pdf>

TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA (ELETROPORAÇÃO)

OBJETIVO

Introduzir DNA plasmidial em bactérias competentes através da utilização de um campo elétrico.

INTRODUÇÃO

Neumann e colaboradores, em 1982, publicaram o primeiro estudo sistemático feito em relação a eletroporação através da transferência eficiente de DNA plasmidial às células de camundongos. Durante a década de 1990, Tsong publicou um conjunto de artigos que apresentou de forma clara o que é o processo de eletroporação e suas aplicações, a partir da compreensão da biofísica. A eletroporação se tornou, no século XXI, umas das técnicas de transfecção mais utilizadas devido a sua fácil execução e versatilidade, podendo, inclusive ser aplicada a diversos tipos celulares^[1].

A técnica de eletroporação ocorre quando um campo elétrico pulsado é aplicado nas células em suspensão, promovendo a polarização da membrana e a formação de nanoporos, e, aumentando assim, a permeabilidade celular. Durante esse período pode ocorrer a entrada de diversos compostos para o interior da célula, como produtos químicos, medicamentos, RNA, DNA ou peptídeos. Após a passagem do pulso, a célula irá retornar ao seu estado inicial, recuperando sua integridade celular^[2]. No campo da biologia molecular, o processo de eletroporação é muito utilizado para transformar bactérias, leveduras e protoplastos vegetais, que recebem um novo material genético e adquirem novas características^[3].

MATERIAIS

- 10 mL de meio de cultura LB sem antibiótico
- 6 placas de petri com meio LB contendo antibiótico
- 3 Caixas de ponteiras: P10, P100 e P1000
- 03 Cubetas
- 01 Recipiente com gelo
- 03 Microtubos de 1.5 ml
- 01 Estante para tubos
- 01 Tubo tipo Falcon 50 mL
- 01 Estante para tubo Falcon 50 mL
- 01 Alça para plaquear (estéril)

01 Pisseta com álcool 70%
Alíquota de vetor fechado (1-10 ng)
Alíquota produto de ligação (1-10 ng)
Alíquota de célula eletrocompetente
01 Balde ou lixeira para descarte

Equipamentos:

Conjunto de micropipetas de P10, P100, P1000
Eletroporador
Capela de fluxo laminar
Shaker 37° C
Autoclave
pHmetro
Banho-maria
Centrífuga
Freezer -80° C
Freezer -20 °C
Geladeira
Estufa 37 °C

MEIOS DE CULTURA

Meio LB

- 10 g NaCl
10 g Peptona
5 g Extrato de levedura
- Adicionar os componentes em um béquer contendo 800 ml de H₂O e aguardar até completar a dissolução.
 - Colocar a solução já diluída em uma proveta e completar o volume obtido para 1 litro.
 - Acertar o pH para 7,2.
 - Misturar bem e autoclavar por 20 minutos.
 - Retirar o Erlenmeyer da autoclave e colocar no banho a 56 °C e aguardar a

queda da temperatura para utilizá-lo.

Meio LB líquido ágar com antibiótico

- Fazer o mesmo procedimento acima e adicionar 15 g de ágar por litro de meio LB.
- Autoclavar e em seguida deixar esfriar em banho-maria 56 °C.
- Quando a temperatura do meio estiver suportável ao toque, adicionar a ampicilina (100 mg/mL).
- Homogeneizar e despejar nas placas. Aguardar até que elas se solidifiquem.

Obs: O manuseio do meio autoclavado deve ser realizado em capela de fluxo laminar.

MÉTODOS

Eletroporação

- Na capela de fluxo laminar, identificar as cubetas e coloca-las no gelo. Fazer o mesmo procedimento com os tubos contendo as células competentes.
- Realizar 3 reações:

Reação 1: Adicionar 2 µL do produto de ligação (teste) ao tubo contendo as células competentes. Em seguida, transferir todo o conteúdo do tubo na cubeta e coloca-la no gelo.

Reação 2: Adicionar 2 µL do vetor fechado (controle positivo) ao tubo contendo as células competentes. Em seguida, transferir todo o conteúdo do tubo para a cubeta e coloca-la no gelo.

Reação 3: Adicionar apenas células competentes (controle negativo) na cubeta e coloca-la no gelo.

Obs: Fazer todo o procedimento na capela e evitar deixar as cubetas muito tempo fora do gelo.

- Submeter as células contidas nas cubetas ao choque elétrico em eletroporador sob voltagem 2,5kV.
- Após o “choque”, colocar 1 mL do meio LB na cubeta, homogeneizar e transferir todo conteúdo para tubo de 1.5 mL.
- Incubar os tubos em shaker sob agitação de 180 RPM por 45 a 60 minutos a 37 °C.

Plaqueamento e seleção de clones

- -Abrir as placas na capela por 5 minutos.
- Colocar 100 μL da cultura sob a placa de petri com meio sólido e antibiótico.
- Espalhar o meio por toda a superfície com auxílio da alça estéril.
- Incubar as placas de petri em estufa a 37 °C por 18 horas.

Obs: As tampas das placas devem estar voltadas para baixo e o lado do ágar para cima. Isto evita que a água de condensação acumulada na tampa não caia sobre as colônias, o que evita a contaminação dos clones.

- Analisar os resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de realizar a eletroporação, as células precisam receber um tratamento adequado para se tornarem “eletrocompetentes”, ou seja, serem capazes de receber DNA exógeno. Esse tratamento permite também que as células sejam armazenadas por longos períodos no freezer a -70°C. Após descongeladas, as células eletrocompetentes são misturadas ao material genético, que após o pulso elétrico, pode ser transferido para as células.

A inserção do novo material genético pelas células pode ter como finalidade, por exemplo, a expressão de novas proteínas, processo conhecido como expressão heteróloga. Após o pulso elétrico as células precisam se recuperar do estresse sofrido para poderem aumentar a população e começar a produzir suas proteínas, inclusive aquelas inseridas via plasmídeo. Assim, imediatamente após a eletroporação o meio LB não deve conter antibiótico, porque a resistência será conferida após a inserção do plasmídeo contendo o gene de resistência ao antibiótico.

Alguns cuidados devem ser tomados durante o processo de eletroporação como, ligar a luz ultravioleta da capela ou fluxo laminar antes de todos os procedimentos, para evitar contaminação. Ao incubar as placas de petri elas devem permanecer com as tampas voltadas para baixo e com lado do ágar para cima, para evitar a condensação da água e possível contaminação.

REFERÊNCIAS

[1] Shi J, Ma Y, Zhu J, et al. A Review on Electroporation-Based Intracellular Delivery. *Molecules*, 23(11): p.3044, 2018.

[2] Luft C, Ketteler R. Electroporation Knows No Boundaries: The Use of Electrostimulation for siRNA Delivery in Cells and Tissues. *J Biomol Screen.*, 20(8): p.932-942, 2015.

[3] Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Electroporation. Cold Spring Harb Protoc., 1(7), 2019.

Links:

Conceito de eletroporação

<https://www.youtube.com/watch?v=InBnhL47IKo&feature=youtu.be>

Como realizar a eletroporação

<https://www.youtube.com/watch?v=0ob-cZkTntA&feature=youtu.be>

Curiosidade sobre eletroporação

<https://www.youtube.com/watch?v=KjRd-c-LzMo&feature=youtu.be>

EXTRAÇÃO DNA PLASMIDIAL (MINIPREP)

OBJETIVOS

Obter e purificar DNA plasmidial recombinante e manipular cultura bacteriana.

INTRODUÇÃO

A extração e purificação de plasmídeos consiste em uma técnica fundamental e necessária na biologia molecular, utilizada nas etapas de clonagem, expressão de proteínas, sequenciamento, transformação de organismos, introdução de modificações em sequências, mutagênese sítio-dirigida, ou mesmo para manter os plasmídeos em estoque.

O isolamento de DNA plasmidial tem sido usado por décadas^[1-3] e continua sendo um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de biologia molecular. A purificação do plasmídeo envolve duas etapas: lise bacteriana e isolamento do DNA.

Em 1969, Clewell e Helinski conseguiram isolar o DNA circular de *E. coli* utilizando na lise celular a enzima lisozima e o detergente desoxicolato de sódio, seguido de centrifugação^[1]. Mais tarde, em 1978, Colman e colaboradores desenvolveram um novo método, que envolveu a lise bacteriana na presença de lisozima e do detergente Triton X-100, seguido da purificação em cromatografia de hidroxapatita na presença de altas concentrações de fosfato e ureia^[2]. Logo em seguida, em 1979, Birnboim e Doly publicaram um novo método, em que a lise foi realizada empregando NaOH e SDS, seguida da precipitação do DNA plasmidial através da adição de acetato de sódio ao lisado^[3].

A técnica descrita por Birnboim e Doly é empregada até os dias atuais e seu princípio está na desnaturação alcalina (pH ~12) do DNA cromossômico de alto peso molecular, enquanto o DNA circular covalentemente fechado permanece em fita dupla, visto que suas fitas são topologicamente entrelaçadas. O controle adequado do pH é crucial, pois após a neutralização, o DNA cromossômico renatura para formar um coágulo insolúvel, juntamente com proteínas e restos celulares. Em contrapartida, o DNA plasmidial retorna a forma nativa de forma mais rápida que o DNA genômico, e assim, o DNA do plasmídeo fica solúvel no sobrenadante. Isto garante que DNAs de plasmídeos grandes e pequenos possam ser extraídos por este método^[3,4].

MATERIAIS

3 mL de cultura de bactéria *E. coli* contendo plasmídeo de interesse em meio LB

Microtubos de 2 mL

1 mL das Soluções I, II e III

1 mL de Etanol 75% gelado

1 mL de Isopropanol

1 mL de Água deionizada autoclavada

Caixas de ponteiras: P10, P100 e P1000

1 Frasco para descarte contendo hipoclorito de sódio

Equipamentos:

Microcentrífuga

Autoclave

Conjunto de micropipetas de P10, P100, P1000

SOLUÇÕES

Solução I: TE pH 8

25 mM Tris pH8

10 mM EDTA pH 8

Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e armazenar a 4°C

Solução II: SDS/NaOH

1% de SDS

0,2 M de NaOH

Esta solução deve ser fresca e mantida à temperatura ambiente.

Solução III: Acetato de sódio 3M pH 4,8

3 M de Acetato de sódio

Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e armazenar a 4 °C

MÉTODOS

- Crescer 3 mL de cultura em meio LB + ampicilina (100 µg/mL), durante 16 a 18 horas.
- Centrifugar 1 mL da cultura por 10 min a temperatura ambiente, desprezar todo o sobrenadante no frasco descarte contendo água sanitária.

Obs: Todas as centrifugações são realizadas a 13.000 RPM.

- Ressuspender bem o pellet com 200 µL da solução I (TE pH 8), homogeneizar usando a pipeta.

- Adicionar 200 μL de solução II (SDS/NaOH) e homogeneizar pipetando.
- Incubar a 56 °C por 5 minutos. A suspensão ficará transparente e viscosa.
- Adicionar 150 μL de NaAc 3M, pH 4,8.
- Homogeneizar por inversão, várias vezes, até formar “grumos”.
- Centrifugar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir, cuidadosamente, o sobrenadante para outro tubo e adicionar 1mL de isopropanol. Homogeneizar por inversão.
- Incubar a 37° C por 5 minutos.
- Centrifugar por 10 minutos a 4° C. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 1mL de etanol 75% gelado.
- Centrifugar por 5 minutos a 4° C.
- Secar o pellet a temperatura ambiente e suspendê-lo em 50 μL de H₂O deionizada autoclavada.
- Dosar o DNA.

Obs: Para remover o RNA da preparação, acrescentar TE pH 8 contendo 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Rnase, incubar a 37° C por 0,5-1 hora. Para reduzir a contaminação do DNA purificado com proteínas, pode ser empregado a extração com mesmo volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico e/ou clorofórmio: álcool isoamílico. Misture por inversão várias vezes e centrifugue na velocidade máxima por 2 minutos a 4 °C. Transfira a fase superior para um tubo novo e o DNA é então precipitado através da adição de álcool (0,6-0,8X volume de isopropanol ou 2,5X volumes de etanol) na presença de sais. Após a lavagem com etanol 70% para remoção do excesso de sais, o DNA é solubilizado em TE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor rendimento do processo, garanta que o pellet de bactérias seja completamente solubilizado na solução I, não deixar grumos de células, pois dificulta a interação com a solução de lise.

O SDS, um detergente aniônico, possui a função de lisar as membranas da célula e desnaturar as proteínas celulares, enquanto o NaOH eleva o pH do extrato para valores muito alcalinos (pH 12 a 12,5). Nestas condições, ocorre a desnaturação diferencial do DNA, o DNA cromossomal será desnaturado, enquanto o DNA plasmidial circular e menor permanece inalterado. Ao incorporar o Acetato de Potássio (ou Acetato de Sódio) com pH 5,5, o extrato é neutralizado sob condições de alta concentração de sais, fazendo com que o DNA cromossomal precipite, enquanto que o DNA plasmidial permaneça em solução. A adição dessa solução também causa a precipitação de proteínas complexadas ao SDS,

incorporado pela adição da solução II. A centrifugação final produz um extrato claro com o DNA plasmidial em solução.

REFERÊNCIAS

[1] Clewell DB; Helinski DR. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 62(4): p.1159-1166, 1969.

[2] Colman A; Byers MJ; Primrose SB; Lyons A. Rapid purification of plasmid DNAs by hydroxyapatite chromatography. *Eur J Biochem.*, 91(1): p.303-310, 1978.

[3] Birnboim HC; Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: p.1513-1523, 1979.

[4] Sambrook J; David WR. *Molecular cloning: a laboratory manual Vol 1.* Cold Spring Harbor Laboratory Pr. 2001.

Links:

Extração de DNA plasmidial

https://www.youtube.com/watch?v=nsv8py5ujA0&ab_channel=Abnova

EXPRESSÃO HETERÓLOGA

OBJETIVOS

Realizar produção da proteína recombinante em células *E. coli*.

INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante surgiu no início dos anos 1970 e possibilitou a produção de proteínas heterólogas que apresentam grande interesse comercial e tecnológico. Dentre essas proteínas, está a insulina, cuja expressão de forma recombinante a partir de 1977 possibilitou o tratamento efetivo de pacientes diabéticos. Dentre os organismos utilizados para a produção de proteínas heterólogas, estão as bactérias gram negativas, como a *Escherichia coli*. Este é um dos hospedeiros mais utilizados para esse propósito, por ser bem caracterizado geneticamente, ter à disposição inúmeros plasmídeos de expressão, possuir elevada taxa de multiplicação, fácil cultivo, baixo custo e alto potencial de produção^[1, 2].

A utilização do sistema bacteriano para a expressão de proteínas heterólogas possui duas principais desvantagens: i) o dobramento incorreto da cadeia proteica e ii) a produção de proteínas insolúveis, ou seja, em corpúsculos de inclusão. Durante o processo de expressão, é desejável que a proteína recombinante esteja na forma solúvel e na conformação estrutural correta, ou seja, biologicamente ativa. No entanto, caso ocorra o mau dobramento das proteínas produzidas, a molécula fica sujeita à degradação proteolítica no citoplasma da bactéria. Isto porque essas proteínas em sua conformação incorreta são rapidamente degradadas como forma de reciclagem de aminoácidos^[3].

Outro problema que pode surgir é a formação de corpúsculos de inclusão, que são agregados insolúveis formados pelo acúmulo da proteína expressa. A maioria das proteínas heterólogas produzidas em *E. coli* podem estar na forma de corpúsculo de inclusão. Isto porque essas células apresentam alto nível da expressão citoplasmática e uma pequena quantidade de chaperonas no seu citoplasma, que são as proteínas que auxiliam no dobramento correto das cadeias proteicas em crescimento. Por outro lado, a formação de corpúsculos de inclusão fornece uma grande quantidade de proteínas, o que facilita a produção e purificação em larga escala^[2].

Para a produção de proteína heteróloga em sistema de expressão que utiliza o modelo *E. coli*, é necessário a utilização de um plasmídeo de expressão bacteriano. O plasmídeo deve possuir uma origem de replicação, possibilitando a duplicação do número de cópias do gene de interesse e um promotor para transcrição e tradução do gene de interesse. O promotor é uma das regiões mais importantes para a transcrição do gene, pois controla a velocidade da transcrição do gene. Assim, um promotor forte aumenta a taxa de produção de mRNA, e a produção da proteína de interesse. Os promotores bacterianos

mais utilizados nos plasmídeos de expressão são: *lac*, *trp*, T7^[4].

Diversos plasmídeos bacterianos são utilizados para a expressão de proteínas recombinantes, dentre eles temos os plasmídeos da família pET (*plasmid for expression by T7 RNA polimerase*), muito utilizados para expressão em células *E. coli*. Os plasmídeos dessa família possuem o promotor T7-Lac, que permite a expressão da proteína heteróloga sob o controle do repressor *lac*, o que reduz assim, o *background* de expressão da proteína de interesse na ausência do agente indutor. A indução da transcrição é obtida através da adição de um análogo de lactose sintético e não degradável (tiogalactopiranosídeo de isopropila, IPTG), o qual se associa ao repressor, de modo a inibi-lo, deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e consequente transcrição do gene de interesse^[4,5].

Ao utilizar os plasmídeos da família pET, as proteínas expressas por células de *E. coli* podem ser purificadas por cromatografia de afinidade, pois o plasmídeo possui uma sequência que codifica seis resíduos do aminoácido histidina em fusão na porção N-terminal da proteína de interesse (*His-Tag*). A His-Tag possui grande afinidade por alguns íons metálicos, como Ni²⁺, Cu²⁺ e Co²⁺, o que permite com que o produto em fusão seja separado de outras proteínas existentes no meio, com pureza de até 95%^[2,4].

MATERIAIS

Célula ou clone de *E. coli* transformada com o plasmídeo contendo gene de interesse (ex: pET-21a + gene de interesse)

100 mL Meio de cultura (LB ou 2XYT)

Tampão de amostra DTT 2X

Alíquota de Ampicilina (100 mg/mL)

Alíquota de IPTG 1 M

Tubos para centrifugação com fundo cônico estéril de 50 mL

2 Microtubos de 2 mL

2 Cubetas de vidro ou plástico de 2 mL

1 Frasco/lixadeira para servir como descarte de material contaminado

Equipamentos:

Nanodrop

pHmetro

Shaker (temperatura de crescimento ótimo para *E. coli* – 37° C e rotação 180 RPM).

Capela de fluxo laminar

MÉTODOS

- O primeiro passo é realizar um pré-inóculo na capela de fluxo laminar. Adicionar 10 mL de meio de cultura ao tubo de fundo cônico estéril de 50 mL.
- Adicionar 10 μ L de ampicilina a 100 mg/mL ao meio de cultura.
- Com o auxílio de uma ponteira, coletar células de uma colônia isolada da placa que contenha as bactérias eletroporadas com o plasmídeo contendo o gene de interesse.
- Inserir a ponteira no tubo contendo o meio.
- Incubar os tubos no shaker a 37 °C a 180 RPM por 18 h.
- O segundo passo é realizar o inóculo para expressão da proteína de interesse em pequena escala. Em um tubo tipo Falcon de 50 mL adicionar 20 mL de meio de cultura (LB ou 2XYT), 20 μ L de ampicilina 100 mg/mL e 200 μ L do pré-inóculo.
- Incubar o frasco no shaker a 37 °C a 180 RPM até atingir uma densidade optica (DO) entre 0,6 e 0,8. O tempo para atingir esta DO varia conforme a linhagem bacteriana utilizada, sendo, o tempo usual, entre 2,5 e 4 h.
- Medir a densidade optica (DO) do inóculo após 1,5 h de incubação. Caso o valor esteja próximo do ideal (ex.: $A > 0,450$), monitorar a DO a cada 20-30 minutos.
- Após atingir a DO desejada, transferir uma alíquota de 2 mL do inóculo para um microtubo de 2 mL, que será a amostra de tempo zero (T0).
- Centrifugar e ressuspender o *pellet* no tampão de amostra (DTT).
- Adicionar o volume de IPTG (0.5 mM) desejado para a indução da expressão.
- Incubar o inóculo à 37 °C, 180 RPM por 4 horas.
- Retirar T0, T1, T2 e T4 horas de indução.
- Submeter o produto obtido a eletroforese em SDS-PAGE em condição desnaturante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do pré-inóculo crescido, um inóculo de 1% será realizado e o crescimento bacteriano acompanhado através da medição da DO. Após duas a três horas, é esperado que a DO do inóculo atinja valores entre 0,6 e 0,8 e então, nesse ponto, o agente indutor (IPTG) deve ser adicionado na concentração desejada. A cada duas horas uma alíquota deve ser retirada até completar 4 horas de expressão proteica. Essas alíquotas devem ser

centrifugadas e o pellet ressuspendido em tampão de amostra (DTT), e utilizadas para verificar a expressão através de uma eletroforese SDS-PAGE.

Espera-se que o indutor (IPTG) promova a expressão seletiva da proteína de fusão, que terá um aumento gradual de expressão a cada hora. O T0, será usado como controle negativo, ou seja, momento onde não se espera a produção da proteína de interesse, seguido pelos demais tempos, onde se espera um aumento da quantidade da proteína expressa. Para análise dos resultados é necessário o conhecimento prévio do tamanho da proteína de fusão (proteína recombinante) e aplicação de um padrão de peso molecular.

REFERÊNCIAS

[1] Vajo O; Fawcett J; Duckworth WC. Recombinant DNA Technology in the Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. *Endocrine Reviews*, v. 22, n. 5: p.706-717, 2001.

[2] Idalia VMN; Bernado F. *Escherichia coli* as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications, cap. 13: p.253-274, 2016.

[3] Huo L; *et al.* Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. *Natural Product Reports*, v. 36, n.10: p.1412-1436, 2019.

[4] Wingfield PT; Palmer I; Liang SM. Folding and Purification of Insoluble (Inclusion Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci.*, v. 78:6: p.51-65, 2014.

[5] Davy AM; Kildegaard HF; Andersen MR. Cell Factory Engineering. *Cell Systems*, v. 4, n.3: p.262-275, 2017.

Links:

Operon Lac.

https://www.youtube.com/watch?v=7_FrhNHBSW4

Família de plasmídeo pET utilizados para expressão heteróloga.

https://www.youtube.com/watch?v=_J9noI2UAN8

Expressão de proteínas heterólogas e purificação

https://www.youtube.com/watch?v=YJr_Xtj5NE&t=331s

GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

OBJETIVO

Verificar a expressão, permitir o fracionamento e conferir a massa molecular do conjunto de proteínas que compõem o extrato proteico estudado.

INTRODUÇÃO

Após a expressão da proteína alvo do estudo, é importante conferir a presença da mesma e também verificar o tamanho relativo ou peso molecular da molécula. Somado a isso, após as etapas de purificação e fracionamento por cromatografia, também é adequado verificar a pureza da amostra, ou seja, quão bem uma determinada etapa de purificação removeu as proteínas contaminantes. A técnica de Eletroforese em Gel de Dodecil Sulfato de Sódio-Poliacrilamida (SDS-PAGE) é amplamente utilizada para monitorar cada uma destas etapas, por se tratar de um método simples, rápido e relativamente barato^[1].

A eletroforese envolve a migração de moléculas eletricamente carregadas em soluções devido a um campo elétrico aplicado entre um ânodo e um cátodo. Trata-se de uma técnica amplamente difundida e já em 1897, Kohlrausch descreveu a ordem da migração eletroforética de íons, suas concentrações relativas e explicou o comportamento de substâncias em movimento em um campo elétrico. Mais tarde, em 1930, Tiselius publicou sobre a eletroforese de contorno móvel, que permitiu estudos das propriedades físico-químicas de proteínas. Ele mostrou que bandas nítidas de moléculas ionizadas podiam ser obtidas em tubos de vidro em forma de U e as bandas de proteínas podiam ser detectadas por fotografia com luz ultravioleta^[2].

A eletroforese em solução livre de Tiselius estava sujeita a uma baixa resolução devido à mistura dos componentes, ocupava grande espaço físico e exigia vários miligramas de proteína. Então, por volta de 1950, surge a eletroforese em papel, na qual o papel de filtro serve como meio de suporte. O método foi um sucesso e permitiu a análises com menores quantidades de amostra, de forma mais barata, maior resolução na separação e visualizados através da coloração das proteínas^[3].

A eletroforese em géis de poliacrilamida (PAG) foi descrita em 1959 por Raymond e Weintraub^[4]. Em 1967, foi relatada a relação proporcional entre a migração eletroforética de proteínas em PAG e seu peso molecular na presença de SDS^[5]. Posteriormente, foi introduzido o gel de placa para facilitar a resolução simultânea de várias amostras^[6,7] e um sistema tampão modificado inicialmente introduzido para melhorar a solubilização e resolução das proteínas^[1].

O sistema descontínuo desenvolvido por Laemmli^[1] tem sido usado e modificado por vários laboratórios. A técnica de SDS-PAGE é útil para separar moléculas de acordo com seu tamanho, na qual sua estrutura é composta por um gel de empilhamento na parte

superior, seguido de um gel de resolução na região logo abaixo. O gel de empilhamento possui uma porcentagem menor de poliacrilamida, o que permite com que as proteínas penetrem e se movam rapidamente, de forma empilhada umas sobre as outras, dentro da malha de poliacrilamida. Daí elas adentram o gel de resolução de maior porcentagem, o que leva à separação das distintas frações proteicas. É possível otimizar as porcentagens de poliacrilamida a fim de aumentar a resolução de separação, de acordo com a faixa de tamanho das moléculas presentes na amostra. Proteínas pequenas irão se mover mais rapidamente do que proteínas grandes através do gel de resolução. A visualização das proteínas é possível após coloração adequada das moléculas com diferentes corantes como coomassie ou prata, que revelam as bandas proteicas.

MATERIAL

- 2 Placas de vidro para eletroforese
- 2 Espaçadores de 1,5 mm de espessura
- 1 Pente para eletroforese de 1,5 mm de espessura
- 3 Caixas de ponteiras: P10, P100 e P1000
- 2 Pipetas de vidro: 10 mL
- 2 Tubos cônicos de polipropileno de 15 mL
- 9 µL de Temed – N,N,N',N' - Tetrametilenediamina
- 5 mL de Tris-Cl 1,5 M, pH 8,8
- 5 mL Tris-Cl 0,5 M, pH 6,8
- 5 mL SDS 10%:
- 1 mL Persulfato de amônio (APS) 10%:
- 0,5 mL Tampão da amostra
- 1 L Tampão Tris-Glicina/Eletroforético
- 5 mL Solução de acrilamida / bis (29: 1)
- 100 mL Solução de coloração:
- 100 mL Solução descorante rápida
- 100 mL Solução descorante lenta

Equipamentos:

- Fonte eletroforética
- Conjunto de micropipetas de P10, P100, P1000

SOLUÇÕES

Tris-Cl 1,5 M, pH 8,8:

Dissolver 90,7 g de Tris em aproximadamente 500 mL de água. Ajustar o pH para 8,8 adicionando HCl. Completar até o volume de 1 L com água e armazenar a 4 ° C

Tris-Cl 0,5 M, pH 6,8:

Dissolver 15 g de Tris em aproximadamente 200 mL de água. Ajustar o pH para 6,8 adicionando HCl. Completar o volume até 250 mL com água e armazenar a 4 ° C

Tampão da amostra:

2,5 mL de Tris-Cl 0,5 M, pH 6,8 (0,125 M)

4 mL de SDS a 10% (4%)

2 mL de glicerol (20%)

1 mL de β -mercaptoetanol (10%)

0,5 mL de azul de bromofenol a 1% (0,05%), armazenar a -20 ° C

Tampão Tris-Glicina/Eletroforético

3 g de Tris (0,025 M)

14,4 g de Glicina (0192 M)

10 mL de SDS a 10% (0,1%)

Completar até o volume de 1 L com água. Não há necessidade de se verificar o pH desta solução.

Solução de acrilamida / bis (29: 1)

29 g de acrilamida

1 g de bisacrilamida

Adicionar o volume de 100 mL com água, homogeneizar e armazenar a 4 ° C em uma garrafa coberta com papel alumínio.

Solução de coloração:

45 mL de metanol (45%)

10 mL de ácido acético (10%)

45 mL de água

0,25 g de Coomassie Blue R-250 (0,25%)

Dissolver completamente o Coomassie Blue R-250 no metanol por homogeneização.

Solução descorante rápida:

- 45 mL de metanol (45%)
- 10 mL de ácido acético (10%)
- 45 mL de água

Solução descorante lenta:

- 10 mL de metanol (10 %)
- 5 mL de ácido acético (5%)
- 85 mL de água. Homogeneizar bem todos os reagentes

MÉTODOS

- Limpar as placas de vidro, espaçadores e pentes e montar o sanduíche: placa maior, posicionar os espaçadores nas extremidades dessa placa, colocar a placa menor e por último fazer a vedação lateral e inferior do sistema.
- Preparar a solução do gel de resolução 12% nesta ordem:
 - 3,3 mL de água
 - 4 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1)
 - 2,5 mL de Tris-HCl 1,5M pH 8,8
 - 0,1 mL de SDS 10%
 - 0,1 mL de APS 10%
 - 0,004 mL de TEMED
- Distribuir a solução do gel de resolução 12% no sistema de placas, respeitando o limite máximo determinado.
- Distribuir uma pequena quantidade de isopropanol ou água para remover bolhas e alinhar a superfície do gel.
- Aguardar até a completa polimerização da solução do gel de resolução, por aproximadamente 40 minutos.
- Remover o isopropanol/água enxaguando o gel de resolução com água e remover o excesso de líquido com um papel de filtro.
- Preparar a solução do gel de empilhamento 5% nesta ordem:
 - 2,85 mL de água
 - 0,83 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1)
 - 1,26 mL de Tris-HCl 0,5M pH 6,8

0,05 mL de SDS 10%

0,05 mL de APS 10%

0,005 mL de Temed

- Pipetar a solução de gel de empilhamento sobre o gel de resolução, enchendo até a borda da placa anterior.
- Inserir o pente entre as placas do sanduíche até que fique totalmente apoiado sobre a placa menor anterior. Evitar a formação de bolhas entre os dentes do pente e a solução do gel de empilhamento. Caso necessário, adicionar solução de gel para preencher quaisquer áreas vazias.
- Aguardar até a completa polimerização da solução do gel de empilhamento, por aproximadamente 40 minutos.
- Retirar o sanduíche de placas do sistema de vedação, remover o pente e lavar as canaletas com um jato suave de água destilada.
- Inserir o sanduíche de placas e gel polimerizado na cuba eletroforética e preenchê-la com tampão de corrida Tris-glicina. Verificar o nível do tampão dentro na cuba, ele deve cobrir toda a parte superior do gel.
- Misturar 5 μ L (5–20 μ g de proteína) de cada uma da(s) amostra(s) de proteína em 5 μ L do tampão de amostra e aquecer a 95 °C por 5 minutos.
- Aplicar 5 μ L do marcador de peso molecular na primeira canaleta do gel.
- Aplicar cada uma das amostras proteicas nas canaletas individuais seguintes.
- Fechar a cuba eletroforética e conectar os cabos elétricos à fonte de alimentação. Ficar atento à combinação dos cabos vermelho e o preto da cuba aos conectores de mesma cor da fonte de alimentação.
- Ligar a fonte de alimentação a uma constante de 50 V até que a amostra penetre no gel e em seguida aumentar a voltagem para 100 – 120 V por 35 minutos por 1 h ou até que o corante azul de bromofenol atinja a parte inferior do gel.
- Desligar a fonte de alimentação e desconectar os cabos.
- Separar as placas de vidro para acessar o gel, posicionar uma espátula entre as placas na parte superior e inclinar cuidadosamente para liberar o gel.
- Transferir o gel para um recipiente contendo 100 mL da solução de coloração e incubar por 30 a 40 minutos, sob agitação lenta.

Obs: o gel ficará totalmente coberto e impregnado pelo corante Coomassie Blue R-250 e não será possível visualizar as bandas proteicas, o que só é possível após descoloração da superfície do gel.

- Retirar a solução de coloração.

Obs: a solução de coloração pode ser reaproveitada algumas vezes, assim, retornar

a solução para um frasco coberto com papel alumínio e armazenar a temperatura ambiente.

- Adicionar ao gel 100 mL da solução descorante rápida ou lenta e incubar sob agitação lenta até que se possa visualizar as bandas proteicas.

Obs: o aquecimento da solução descorante no micro-ondas pode acelerar o processo de descoloração do gel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O SDS atua como um agente solubilizante, é um detergente que desnatura as estruturas terciárias e secundárias, e também recobre as proteínas com cerca de uma molécula de SDS para cada resíduo de aminoácido. Desta forma o SDS contribui com uma grande carga final negativa, tornando a carga intrínseca da proteína insignificante^[8]. Ainda contribui para a total abertura e linearização da estrutura proteica, a adição de β -mercaptoetanol, composto responsável por reduzir as ligações dissulfeto. Assim, ao serem submetidas a um campo elétrico, as proteínas completamente desnaturadas e recobertas pelo SDS negativo, migram em direção ao eletrodo positivo sendo separadas conforme as massas moleculares.

O APS e o Temed catalisam a polimerização da acrilamida. O APS forma radicais livres de oxigênio em solução aquosa catalisados pelo Temed, uma amina terciária. Os radicais livres atuam na polimerização de acrilamida e bis-acrilamida, formando a matriz do gel ^[9].

Após a eletroforese, as proteínas são visualizadas pela adição de um corante, como o Coomassie R-250 que dão cor às bandas de proteína de forma reversível. Isto porque em um meio ligeiramente ácido, o ânion corante é atraído eletrostaticamente pelos grupos NH^{3+} da proteína e formam um complexo firme, mas que pode ser removido totalmente alterando o pH^[10].

Obs: Acrilamida é um composto neurotóxico, cancerígeno e mutagênico. Por isso, é necessário cuidado ao manusear essa substância, principalmente o pó. Evitar qualquer contato com a pele e os olhos, para isto, faça o uso de máscara e luvas e certifique-se de que a ventilação do ambiente é adequada. Pesem com cuidado, evitem a formação e dispersão de poeira, não inalam o pó ou vapores de acrilamida.

REFERÊNCIAS

[1] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: p.680-685, 1970.

[2] Vesterberg O. A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 14(12): p.1243-1249, 1993.

[3] Wieland T; Fischer, E. Naturwissenschaften. 35: p.29-30, 1948.

[4] Raymond S; Weintraub L. Science, 130: p.711, 1959.

[5] Shapiro AL; Vinuela E; Maizel IV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28: p.815-820, 1967.

[6] Reid MS and Bielecki RL. A simple apparatus for vertical flat-sheet polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 22: p.374-381, 1968.

[7] Studier, FW. Bacteriophage T7. Science 176 (4033): p.367-376, 1972.

[8] Nelson DL; Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6 ed. Porto Alegre:Artmed, 2014.

[9] Maurer HR. Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis De Gruyter; 2nd REV. and Expand. 1971. Reprint ed. Edição, 1978.

[10] St Groth FS; Webster RG; Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochim Biophys Acta., 71: p.377-391, 1963.

Links:

Animação da técnica de SDS-PAGE

https://www.youtube.com/watch?v=i_6y6Z5UvwE&ab_channel=BiologywithAnimations

Como fazer um SDS-PAGE

https://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4&ab_channel=labtricks

AVANÇOS EM BIOLOGIA MOLECULAR

Os primeiros relatos do uso de conceitos relacionados ao DNA e hereditariedade foi quando os seres humanos começaram a praticar a criação de forma seletiva, produzindo colheitas e rebanhos mais robustos. Alguns filósofos gregos também exploraram a ideia da herança humana e Aristóteles, inclusive, sugeriu que os traços adquiridos durante a vida de um organismo poderiam ser transmitidos a sua prole^[1]. Da observação à prática, iniciamos os primeiros relatos científicos da genética em 1865, quando Gregor Mendel, conhecido como pai da genética, propôs os fundamentos da hereditariedade. Em 1868 o médico suíço Friedrich Miescher chamou o material genético de nucleínas e em seguida, por volta de 1902, Theodor Boveri e Walter Sutton postularam que os cromossomas eram os portadores das unidades hereditárias. Desde então, muitos cientistas fizeram importantes descobertas na área da genética e biologia molecular como: Frederick Griffith (1928), Phoebus Levene (1929), Erwin Chargaff (1940), Rosalind Franklin (1952), Watson e Crick (1953)^[1, 2].

Analisando o histórico da pesquisa do DNA e hereditariedade verificamos que cada um desses pesquisadores atuou frente ao seu tempo, usando as tecnologias existentes em sua época e produzindo informação científica de qualidade. Atualmente as informações científicas são produzidas em grande escala pelos laboratórios de pesquisa, informatizados e possuem equipamentos com tecnologias de ponta. Além disso, a internet se tornou uma importante ferramenta científica para compartilhar os trabalhos e resultados obtidos, de forma rápida e brilhante.

Contraopondo às tecnologias de ponta, Mendel em seu laboratório improvisado, cultivando ervilhas ao fundo do prédio, atuou sem tecnologias avançadas, sem estudantes de mestrado ou doutorado, sem suporte financeiro e nem por isso deixou de ter notável papel na ciência: transformando o simples em um marco histórico. Infelizmente Mendel faleceu em 1884 e a importância dos seus trabalhos só foi conhecida 16 anos após sua morte^[1-3].

Os avanços em Biologia Molecular são cada vez mais surpreendentes e a cada ano surgem novas técnicas aplicadas ao estudo do DNA, como o sequenciamento, técnicas para manipulação de genes, edição de genomas, entre outras. A ciência está em expansão, sempre criando ou aprimorando técnicas de estudo para compreender a dinâmica da informação genética e a sua relação com a vida^[3-7].

SEQUENCIAMENTO DE DNA - PRIMEIRA GERAÇÃO

Após Watson e Crick desvendarem a estrutura tridimensional do DNA, surgiu a necessidade de entender o que estava por trás desta molécula, o que era o real sentido do código genético, e os mistérios que vinham por trás dele. Para alcançar tal objetivo, foi realizado, na década de 70, o sequenciamento genômico, cujo objetivo era ler todas

as informações contidas no DNA da célula humana. Esse sequenciamento, conhecido como primeira geração, usou a técnica de separação por comprimento de polinucleotídeos através da eletroforese em gel, onde os fragmentos de DNA eram separados conforme o comprimento das cadeias.^[3]

Essa técnica foi utilizada em dois protocolos: o procedimento de Alan Couson e Frederick Sanger, cujo princípio é baseado no uso da DNA polimerase e dos didesoxinucleotídeos (ddNTPs) para determinar a sequência de nucleotídeos por meio de uma fita simples de DNA; e o protocolo de Allan Maxam e Walter Gilbert, que utiliza a clivagem química para identificar a sequência das bases, após marcar radioativamente a terminação 5' dos fragmentos de DNA^[1].

SEQUENCIAMENTO DE DNA - SEGUNDA GERAÇÃO

No início do século XXI surgiu o método de pirosequenciamento (454 Roche), a primeira plataforma de sequenciamento de nova geração, essa técnica não utiliza a clonagem prévia de fragmentos e sequência milhares de DNA e amostras em paralelo. Nesse método, quando um nucleotídeo é agrupado na molécula de DNA, um pirofosfato é liberado na reação e sua luz é detectada^[4]. A partir disso, surgiram os chamados Sequenciamento de Nova Geração (NGS), com tecnologias que possibilitaram o sequenciamento de um volume maior de DNA de maneira mais rápida e com o custo menor, quando comparado com o sequenciamento de primeira geração. Outras metodologias foram criadas como o sequenciamento por ligação (SOLiD), metodologia de semicondutores (Ion), sequenciamento por síntese (Illumina) e o sequenciamento de moléculas únicas (Pacific Biosciences e o Oxford Nanopore)^[5].

SEQUENCIAMENTO DE DNA - TERCEIRA E QUARTA GERAÇÕES

Atualmente, com os avanços proporcionados pela ciência, novos métodos de sequenciamento estão sendo desenvolvidos como a terceira geração de sequenciamento, que utilizam do método *shotgun*, pois saltam a etapa da PCR, visto que esse processo está incluso no sequenciamento automatizado. O fato de não ser necessário fragmentar e amplificar o DNA permite um ganho na agilidade e precisão do sequenciamento.

A quarta geração do sequenciamento é ainda mais recente, essa geração iniciou após o surgimento dos sequenciadores portáteis, lançado pela primeira vez com o MinION da Oxford Nanopore. O método foi desenvolvido para uso em campo, com tecnologia que permite o sequenciamento de trechos curtos e longos de fragmentos do DNA, essa tecnologia utiliza de proteínas canais em um chip (flow cell), por onde os fragmentos de DNA passam, ao longo do processo são liberadas variações na corrente elétrica da flow

cell, permitindo a leitura^[6].

A capacidade de sequenciamento atual permite comparar grandes extensões de DNA em vários indivíduos diferentes. As técnicas são aprimoradas constantemente e os ganhos para a ciência são imensuráveis como, diagnósticos e terapias de doenças genéticas, melhoramento genéticos de animais e plantas, sequenciamento de vírus e bactérias, monitoramento ambiental, além de uma gama enorme de possibilidades a serem descobertas.

RT-PCR

A *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) é uma evolução da técnica de PCR, sendo capaz de quantificar um RNA específico utilizando a enzima transcriptase reversa para gerar DNA complementar (cDNA) a partir de um molde de RNA. Após esse procedimento, ocorre a reação em cadeia da polimerase com intuito de amplificar o cDNA presente, caso ele seja o equivalente ao primer utilizado.

A RT-PCR pode ser utilizada na análise de expressão gênica, visto que é possível analisar o RNA responsável pela síntese proteica. Além disso, essa técnica é amplamente utilizada para diagnosticar infecções, uma vez que ocorre a amplificação e detecção do cDNA quando um vírus está presente na amostra. Na pandemia do novo coronavírus (Covid-19), essa técnica foi considerada padrão ouro no diagnóstico, uma vez que a técnica permite identificar a presença do vírus em amostras com baixas quantidades de carga viral^[7].

CRISPR-CAS9

O Nobel de Química de 2020 foi concedido à duas pesquisadoras pela técnica de CRISPR, inspirada pela forma como as bactérias utilizam seu sistema imune primitivo. Basicamente, com essa técnica é possível modificar genomas com precisão e eficiência nunca antes alcançada^[8, 9, 10].

Nas bactérias, o *locus* CRISPR é uma região no seu material genético que é “misturada” com trechos de DNA de vírus que as infectaram no passado. Quando uma espécie de vírus, que já teve seu material genético incorporado ao DNA da bactéria, invade esse microrganismo, ela gera um RNA a partir desse trecho específico que se associa à enzima Cas-9 e cliva o DNA viral, inativando-o^[9].

A partir disso, como a ciência aplicou esse sistema na biologia molecular e engenharia genética? É simples, na célula existe um núcleo formado por cromossomos com longas cadeias de DNA. Com o auxílio da CRISPR, um trecho do material genético alvo é “cortado” e um RNA formulado com a sequência alvo de interesse serve como transportador que

auxilia a enzima Cas no corte preciso do DNA. Após esse processo, o DNA clivado pode ser reparado por meio das junções diretas a partir das pontas causadas pelo corte, ou pode ocorrer a inserção de um DNA “doador” que será inserido na região do corte. Sendo assim, é possível corrigir alterações na sequência do DNA ou inserir mutações específicas^[10].

REFERÊNCIAS

- [1] Jean Gayon. From Mendel to epigenetics: History of genetics, *C R Biol*, 016;339(7-8): p.225-230, 2016.
- [2] Dahm, R. Friedrich Miescher e a descoberta do DNA. *Biologia desevolvente*. doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028, 2005
- [3] Sanger F; Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, v. 94, n. 3: p.441-448, 1975.
- [4] Heather JM; Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, v. 107, n. 1: p.1-8, 2016.
- [5] Mardis ER. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual review of analytical chemistry*, v. 6: p.287-303, 2013.
- [6] Jain M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome biology*, v. 17, n. 1: p.1-11, 2016.
- [7] Freeman WM; Walker SJ; Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 26(1): p.112-125, 1999.
- [8] Zhang PH; Marraffini L; Barrangou R; Fauci A; Plummer F. Prêmio Nobel de Química 2020 a la edición génica con tecnología CRISPR/Cas9. *MEDICINA (Buenos Aires)*, v. 80, n. 6: p.738-740, 2020.
- [9] Driehuis E; Clevers H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 312, n. 3: p.257-265, 2017.
- [10] Arend M; Pereira J; Markoski M. O Sistema CRISPR/Cas9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 108, n. 1: p.81-83, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: A CIÊNCIA É CONSTRUÍDA COM A SOMA DE VÁRIOS ESFORÇOS

Testar novas metodologias e estratégias que possam permitir ao estudante uma experiência diferente daquela que ocorre nas aulas teóricas, além de melhorar o entendimento acerca do conteúdo, contribui também por despertar o interesse pela investigação científica. A vivência experimentada durante o desenvolvimento de práticas científicas pode levar a muitas reflexões, que seriam raramente alcançadas durante a aula teórica, simplesmente porque o indivíduo está fazendo parte do processo. As práticas aplicadas durante a graduação contribuem para uma proposta educacional que aproxima o discente do objeto de estudo e desperta, entre outras habilidades, o raciocínio científico ^[1, 2].

Na era da informação digital, das tecnologias avançadas e inúmeras descobertas científicas, a sala de aula não é mais a protagonista do processo ensino x aprendizagem^[3]. Fazer parte da descoberta científica é o que move os pesquisadores, e isso deve ser sempre incentivado pelo professor durante as aulas, para que o discente, futuro cientista, possa entender sua importância na solução de problemas que impactam a vida do homem.

Todos nós pesquisadores, quando graduandos, iniciamos a carreira científica sonhando em realizar grandes descobertas, e acho isso maravilhoso. Entretanto, com o passar do tempo, começamos a entender que “a cura do câncer”, por exemplo, só será feita com a soma de vários esforços, de vários pesquisadores, de várias áreas, que, ao contribuir com anos de trabalho, poderão fornecer informações importantes para outros pesquisadores que ainda virão... e talvez estes façam a descoberta. E cada achado tem a sua importância na história da ciência. Com o passar do tempo, terminamos o mestrado ou doutorado, extremamente honrados por contribuir com a ciência, mesmo que não tenha sido gerando um produto imediato.

Assim, termino dizendo que vivenciar a Ciência é um importante instrumento de motivação, que impulsiona o graduando em formação e exercita suas capacidades criativas, humanas e sociais, imprimindo em seu interior o desejo de transformar a sociedade ^[1, 2].

Débora de Oliveira Lopes

REFERÊNCIAS

[1] Paulo F. Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa. São Paulo, 25 ed: p.52, 2004.

[2] National Research Council. How Students Learn: Science in the Classroom. Washington. p.264, 2005.

SOBRE OS AUTORES

BRUNO CARVALHO RESENDE - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6755918379255189>.
Pós doutor - Biologia Molecular ICB/UFMG.

CÁSSIO SIQUEIRA SOUZA CASSIANO - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0491292205069465>. Aluno de doutorado - Ciências da Saúde - UFSJ.

DÉBORA DE OLIVEIRA LOPES - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1497095411339190>.
Professora Universidade Federal de São João del Rei.

DÉBORA PATRÍCIA MARTINS DE DEUS - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0982758135451642>. Aluna de graduação - Bioquímica - UFSJ.

DIEGO LISBOA RIOS - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0699520071972078>. Pós doutorando - Microbiologia ICB/UFMG.

JOSÉ ARIMATÉA DE ALELUIA JÚNIOR - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5489405361373363>. Técnico em Segurança do Trabalho e Especialista em Sistemas de Informação.

LETÍCIA DE AZEVEDO TEIXEIRA - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7340540807301893>.
Mestranda - Ciências da Saúde - UFSJ

PRISCILLA OLIVEIRA GIL - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3873152521932762>.
Mestranda - Bioquímica e Biologia Molecular - UFSJ.

SAMUEL GUIMARÃES COSTA PEREIRA - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3466710736942033>. Aluno de graduação - Bioquímica - UFSJ.

SAULO NASCIMENTO DE MELO - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2227481540925142>.
Doutorando - Ciências da Saúde - UFSJ.

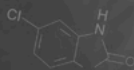
SIMONE DA FONSECA PIRES - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6176557291233456>.
Professora do Instituto Federal Sudeste MG.





THALIA QUEIROZ LADEIRA - Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1864284966848761>. Aluna de graduação - Bioquímica - UFSJ

SOBRE AS ORGANIZADORAS

DÉBORA DE OLIVEIRA LOPES - Cursou Ciências Biológicas (licenciatura) pela Universidade Federal de Minas Gerais (2001), onde também realizou Mestrado (2003), Doutorado (2007) e Pós-doutorado (2008) na área de Bioquímica e Biologia molecular. Foi pesquisadora Sênior da Capes (2018), onde realizou um projeto de pesquisa junto à Universidade de Surrey (Inglaterra). Atualmente é professora Associada III da Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ), onde coordena o laboratório de pesquisa de Biologia Molecular CT-Infra II (Finep) junto ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS-UFSJ). É vice presidente da comissão interna de Biossegurança da UFSJ-CCO e tutora do grupo PET Bioquímica (MEC). Atua nas áreas de biologia molecular, bioinformática e bioquímica.

SIMONE DA FONSECA PIRES – Cursou Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Federal de Minas Gerais (2002), com mestrado (2003), doutorado (2007) e pós doutorado (2007-2012) em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais. Atualmente é Professora do Instituto Federal Sudeste MG - Unidade Manhuaçu e atua nas áreas de bioquímica, com ênfase em biologia celular e molecular, abordagem proteômica e espectrometria de massas.



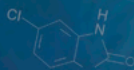
www.atenaeditora.com.br 
contato@atenaeditora.com.br 
[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 
www.facebook.com/atenaeditora.com.br 





Práticas de

Biologia

Molecular





www.atenaeditora.com.br 
contato@atenaeditora.com.br 
[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 
www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

Práticas de

Biologia

Molecular




Ano 2022