



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

INGRID BARBOSA DE MENDONÇA

**ACOMPANHAMENTO DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS BIOMOLECULARES NO
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR E NO
NÚCLEO DE GENÔMICA E BIOINFORMÁTICA**

**FORTALEZA
2016**

INGRID BARBOSA DE MENDONÇA

ACOMPANHAMENTO DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS BIOMOLECULARES NO
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA E BIOLGIA MOLECULAR E NO NÚCLEO DE
GENÔMICA E BIOINFORMÁTICA

Relatório apresentado à Coordenação do Curso de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências da disciplina Estágio Curricular Obrigatório.

Orientadores:

Prof.^a Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha

Prof. Dr. Raimundo Bezerra da Costa

FORTALEZA
2016

M494a Mendonça, Ingrid Barbosa de.
Acompanhamento das principais técnicas biomoleculares no laboratório de Biotecnologia e
Biologia Molecular e no núcleo de Genômica e Bioinformática./ Ingrid Barbosa de Mendonça. – 2016.
30 f.

Relatório (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
Departamento de Zootecnia, Curso de Zootecnia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha.

1. Biotecnologia 2. Biologia Molecular. 3. Biossegurança I. Título.

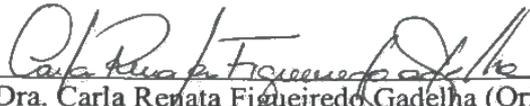
INGRID BARBOSA DE MENDONÇA

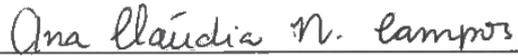
ACOMPANHAMENTO DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS BIOMOLECULARES NO
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLGIA E BIOLOGIA MOLECULAR E NO NÚCLEO DE
GENÔMICA E BIOINFORMÁTICA

Relatório apresentado à Coordenação do Curso de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências da disciplina Estágio Curricular Obrigatório.

Aprovada em: 20/01/2016

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª. Dra. Carla Renata Figueiredo Gadelha (Orientadora pedagógica)
Universidade Federal do Ceará


Prof.ª. Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos (Conselheira)
Universidade Federal do Ceará


Dr. Maurício Fraga van Tilburg (Conselheiro)
Universidade Estadual do Ceará

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que nunca me desamparou e me permitiu chegar até aqui, me dando forças para nunca desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha família, meu bem mais precioso, que sofreram, vibraram e torceram comigo. Obrigada por tudo, pelo apoio, amor incondicional, por acreditar e tornar possível a realização de mais um sonho. Amo vocês.

À minha orientadora, prof.^a Carla Renata Figueiredo Gadelha, por sua orientação durante a minha graduação, pela paciência, confiança, conselhos, mas acima de tudo, pelo carinho.

A todos os professores do Departamento de Zootecnia, em especial à prof.^a Ana Cláudia Nascimento Campos, que foi praticamente uma mãe e o prof. Pedro Henrique Watanabe, que foi bem mais que um tutor, se tornou um grande amigo.

Aos meus colegas de graduação, em especial Larissa Camacho e Eloisa Mendes, que se tornaram irmãs que a vida me deu. Muito obrigada por tudo, meninas. Vocês me provam a cada dia que é possível confiar, esperar e amar sem pedir nada em troca.

Aos companheiros do Laboratório de Estudos em Reprodução Animal e Programa de Educação Tutorial, por ter tornado minha graduação mais leve e divertida.

Ao José Clécio Bezerra Silva, pela paciência e por estar sempre disponível a ajudar.

À Universidade Estadual do Ceará, em especial ao Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular e Núcleo de Genômica e Bioinformática.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 OBJETIVO	09
3 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	10
4 BIOSSEGURANÇA E BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS	11
5 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS E ACOMPANHADAS	12
5.1 Extração de RNA	12
5.1.1 Amostras	13
5.1.2 Protocolo de extração	13
5.2 Quantificação do RNA	14
5.3 Desenho dos primers	15
5.4 Diluição dos primers	16
5.4.1 Diluição para estoque	16
5.4.2 Diluição para uso	17
5.5 Transcrição reversa	17
5.6 Reação em Cadeia da Polimerase	18
5.6.1 Reagentes e suas finalidades	20
5.6.1.1 Tampão para PCR	20
5.6.1.2 Cloreto de magnésio (MgCl₂)	20
5.6.1.3 DNA polimerase	20
5.6.1.4 Desoxinucleosídeos trifosfatos	21
5.6.1.5 Primers	21
5.6.1.6 DNA alvo	21
5.6.1.7 Água ultrapura	21
5.6.2 Protocolo da PCR	21
5.7 Eletroforese em gel de agarose	22
5.8 PCR em tempo real	24
5.9 Extração e purificação de plasmídeos de clonagem	25
5.10 Enzimas de restrição	26
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

A descoberta de que a informação genética está codificada ao longo de uma molécula polimérica composta por uma sequência de unidades monoméricas, os nucleotídeos, marcou o início de uma nova era (WASSARMAN et al., 1999). O ácido desoxirribonucleico (DNA), como foi designada essa molécula, é detentor de toda a informação genética da qual dependem todas as características estruturais e funcionais de cada organismo vivo. Este, encontra-se organizado em genes, unidades fundamentais da informação genética. Para serem ativos, os genes têm que ser expressos, ou seja, a informação contida nas sequências específicas de bases na molécula de DNA precisa ser codificada. Isso se torna possível através da sua transcrição em moléculas de ácido ribonucleico (RNA) e tradução em proteínas (SAMBROOK et al., 2002).

O conhecimento da complexidade desses ácidos nucleicos e a constante exigência por análises cada vez mais rápidas, confiáveis e específicas, conduziram ao desenvolvimento de diversas técnicas ao longo das últimas décadas (MACKAY *et al.*, 2007; PELT-VERKUIL *et al.*, 2008). Dentre estas, destacam-se os mais variados tipos de protocolos de extração de RNA, DNA e proteínas, permitindo a execução de diversas análises da expressão gênica (CALSA JUNIOR et al., 2004), a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite a amplificação de uma sequência do material genético de qualquer organismo de forma rápida, a partir de quantidades ínfimas de material (ELENIS et al., 2008), além da utilização de plasmídeos e enzimas de restrição no processo de formação de moléculas de DNA recombinante, usadas nos mecanismos de replicação gênica e produção de vacinas e enzimas industriais em larga escala.

Em consequência da grande quantidade de dados produzidos por esses e outros procedimentos, houve a necessidade de ferramentas para mapear sequências genéticas e levantar o maior número de informações biológicas e estatísticas em um curto espaço de tempo (ARAÚJO et al., 2008). Isso se tornou possível com o surgimento da Bioinformática, que proporcionou a criação de bancos de dados, que armazenam informações sobre as sequências nucleotídicas de diversas espécies, e de programas computacionais que possibilitaram a confecção de primers, o alinhamento de sequências genéticas diferentes, além da predição de relações funcionais e evolutivas entre indivíduos (PROSDOCIMI et al., 2002).

Atualmente, a área médica é a que mais usufrui com as técnicas moleculares, principalmente no diagnóstico de doenças genéticas e infectocontagiosas, bem como teste de paternidade e sua aplicação na Medicina Forense.

No tocante a área da produção animal, os pesquisadores utilizam-se de técnicas biomoleculares na pesquisa de genes responsáveis pela expressão de características zootécnicas (qualidade de carcaça, crescimento, produção de ovos, leite, entre outros), ou de regiões de genoma que estejam relacionados com a manifestação destas características, além do emprego de marcadores moleculares para características qualitativas (OLIVEIRA; HENKES, 2002), que possam ser utilizados em programas de acasalamento na seleção assistida por marcadores. A genética genômica vem se popularizando como uma nova ferramenta para auxílio nos programas de melhoramento e seleção animal. Enquanto a genética clássica Mendeliana baseia-se no fenótipo para deduzir o genótipo, a genética genômica determina o genótipo por análise direta das sequências de DNA (PEREIRA et al., 1998).

Alguns exemplos dos produtos comercialmente disponíveis e que foram gerados com o emprego de técnicas biotecnológicas na produção animal são: o hormônio de crescimento bovino, empregado para aumentar a produção de leite; vacinas recombinantes para prevenção de doenças e testes genéticos de DNA utilizados na seleção de animais com genótipos superiores em programas de melhoramento (DE LADEIRA, 2011).

Além disso, nos últimos anos existe também uma grande preocupação em conservar os recursos genéticos locais, com esforços aplicados na manutenção da variabilidade genética dos animais por várias organizações em diversos países do mundo (EGITO et al, 2002). Neste contexto, a caracterização genética é uma alternativa para quantificar a variabilidade e diversidade genética dos animais, auxiliando os programas de conservação. O conhecimento da variação genética é de grande importância para a conservação dos recursos genéticos a fim de evitar erosão genética dentro das populações, assim como, conhecerem relações genéticas entre populações para evitar a extinção desses valiosos recursos genéticos (MENEZES et al., 2005).

Sendo assim, é de fundamental importância o conhecimento das técnicas biomoleculares e suas aplicações na produção animal.

2 OBJETIVO

O presente relatório de conclusão de curso tem por objetivo descrever as atividades acompanhadas e/ou executadas em experimentos no Núcleo de Genômica e Bioinformática (NUGEN) e no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM), no tocante as principais técnicas e o manuseio de equipamentos da área genômica, incluindo os procedimentos como extração de RNA de tecido prostático até Reação em Cadeia da Polimerase, abrangendo, para tanto, o uso das principais ferramentas computacionais para fins de confecção de primers e comparação de sequencias, além da utilização de enzimas de restrição, digestão e purificação de plasmídeos bacterianos.

3 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado de conclusão do curso de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC) foi realizado no período de 14 de setembro a 18 de dezembro de 2015 no Núcleo de Genômica e Bioinformática (NUGEN) e no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM), da Universidade Estadual do Ceará.

O NUGEN foi criado por um grupo de professores da FAVET em 2003, a partir da aprovação da proposta de pesquisa intitulada de “Iniciativa genoma *Leishmania chagasi*: assistência e estratégia de sequenciamento ORESTES no PROGENE”, com o intuito de pesquisar e desenvolver trabalhos nas áreas de genômica, proteômica e bioinformática, sob orientação do prof. Dr. Raimundo Bezerra da Costa.

O LBBM é formado por uma equipe de pesquisadores e estudantes, os quais desenvolvem diversas atividades nas linhas de pesquisa dos efeitos dos produtos naturais em doenças crônicas, como dislipidemias e diabetes, além da produção de proteínas recombinantes para produção de vacinas e kits de diagnósticos, sob orientação da profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.

Os laboratórios possuem uma infraestrutura adequada para realização de pesquisas nas áreas de genômica, proteômica, bem como workstations e servidores que permitem trabalhos de Bioinformática. Durante o período do estágio foi possível manusear os principais equipamentos que estão relacionados diretamente e indiretamente nestas áreas, tais como: centrífuga refrigerada, balança analítica eletrônica, espectrofotômetro, termociclador, vortex, cuba de eletroforese em gel, transiluminador, entre outros.

4 BIOSSEGURANÇA E BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS

A biossegurança é um conjunto de ações, regras e procedimentos voltados para a prevenção, controle e minimização de riscos advindos da prática de diferentes tecnologias, seja em laboratório ou no meio ambiente, sendo regidos por lei ou diretrizes específicas, nos quais foram criadas a partir da necessidade e preocupação com as possíveis consequências das manipulações com modelos biológicos experimentais, tais como: animais, plantas e microrganismos que possam ter efeitos deletérios nos humanos e sistemas ecológicos.

Em 1995, foi criado e aprovado no Brasil a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), vinculado ao Ministério de Ciência e Tecnologia, na qual atribui-se as funções da CNTBio como órgão responsável por estabelecer normas de políticas nacionais de biossegurança e emitir parecer técnico conclusivo sobre qualquer atividade relacionada com os Organismos Geneticamente Modificados – OGMs no país (BRASIL, 1995).

Como o laboratório acompanhado durante o estágio abrange pesquisas que envolvem agentes naturais de risco moderado, amostras de indivíduos não patogênicos, bem como manuseio de equipamentos e reagentes tóxicos, torna-se necessário a compreensão destas normas de biossegurança a fim de evitar possíveis contaminações. Nesse sentido, deve-se seguir algumas regras para prevenção, tais como:

- Estar acompanhado em todas as atividades desenvolvidas;
- É proibido comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos dentro do laboratório;
- Não armazenar alimentos e bebidas juntos com os reagentes e amostras na geladeira;
- Usar vestimenta adequada;
- Jaleco deve ser utilizado dentro do laboratório, retirando-o antes da saída;
- Usar luvas para manuseio durante a manipulação das amostras, reagentes e equipamentos;
- Não manipular objetos de uso comum como telefones, maçanetas, jornais ou revistas enquanto estiver usando luvas, para não os contaminar;
- Não é recomendado pipetar com a boca;
- Vidros e objetos pontiagudos devem ser descartados em invólucros adequados;
- Descartar todas as ponteiros, eppendorfs e placas de 96 poços após o uso;
- Derramamentos e contaminações devem ser limpos imediatamente;
- Evitar descartar produtos químicos nas pias do laboratório.

5 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS E ACOMPANHADAS

5.1 Extração de RNA

O RNA é um polímero de nucleotídeos, em sua maioria de cadeia simples, responsável pela síntese de proteínas das células (MARTINS et al., 2009).

A extração de RNA é essencial para execução de diversas análises da expressão gênica, tais como a PCR, microarrays, construção de bibliotecas de cDNA (Ácido desoxirribonucleico complementar), sequenciamento de EST (Expressed Sequence Tags), entre outros (CALSA JUNIOR et al., 2004).

Para a obtenção de bons resultados nesses procedimentos é imprescindível que as sequências de RNA estejam, além de puras, em sua forma mais íntegra possível, pois moléculas fragmentadas originam dados de baixa qualidade e pouco confiáveis, em especial nas técnicas quantitativas. Uma das maiores preocupações no processo de extração é a sua degradação por ação de ribonucleases (RNAses), que são enzimas extremamente resistentes a diversos tratamentos, inclusive térmicos. Em geral, essa degradação se inicia imediatamente após o contato do material com as RNAses presentes no meio ambiente (CRONIN et al., 2004). Desta maneira, a primeira etapa em todos os métodos de isolamento de RNA é a exposição deste material a tampões de extração. Estes apresentam substâncias como o cloreto de lítio que auxilia a precipitação do RNA e isotiocianato de guanidina que permite a manutenção do RNA íntegro nas etapas posteriores da extração. Atualmente, há vários reagentes comerciais, como Trizol (Invitrogen®) e Brazol (Lab Trade do Brasil®), que possuem em sua composição reagentes combinados, como o isotiocianato de guanidina e fenol, possibilitando uma extração de RNA mais rápida que a dos protocolos convencionais e garantindo a integridade do material (SAMBROOK et al., 2002).

Além da escolha do protocolo a ser utilizado, outros fatores também são extremamente importantes para a obtenção e manutenção de um RNA de qualidade. Primeiramente, todas as soluções utilizadas devem ser feitas com água DEPC (dietilporocarbonato) autoclavada, pois esta atua inativando as RNAses através da degradação das histidinas presentes (WOLF et al., 1970). Todos os utensílios devem ser previamente esterilizados em estufa a 180 °C, por um período mínimo de quatro horas; as ponteiras e os tubos de polipropileno devem ser novos e livres de RNAses; as micropipetas devem ser utilizadas apenas para os procedimentos com RNA e a bancada deve ser constantemente limpa

com SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10% e com etanol 70% e, se possível, exclusiva para a manipulação de RNA. Além disso, devem ser tomados cuidados com as luvas utilizadas, de forma a mantê-las livres das RNAses, normalmente liberadas abundantemente pelas secreções da pele (BITENCOURT et al., 2011).

5.1.1 Amostras

Durante o estágio foi possível extrair RNA de próstatas de cães, que estavam acondicionadas em freezer a 80°C negativos. Essas amostras faziam parte de um experimento relacionado a marcadores de fertilidade.

Primeiramente, o tecido foi descongelado à temperatura ambiente e cortado em fragmentos menores (50 - 100mg), que posteriormente foram macerados em nitrogênio líquido.

5.1.2 Protocolo de extração

Existem várias metodologias para que o processo de extração do RNA seja eficientemente realizado (BASTARD et al., 2001). O método de extração utilizado foi o de tiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987), no qual consiste de:

01. Banhar os tecidos em 1mL de TRIzol®, em eppendorfs devidamente identificados;
02. Homogeneizar em vortex;
03. Incubar em temperatura ambiente por 5 minutos;
04. Acrescentar 200µL de clorofórmio para separar a solução em fase aquosa e orgânica;
05. Homogeneizar no vortex por 15 segundos;
06. Incubar em temperatura ambiente por 5 minutos;
07. Centrifugar a 12000G, a 4°C, por 15 minutos;
08. Remover fase aquosa e colocar em outro eppendorf;
09. Adicionar 500µL de álcool isopropílico e homogeneizar em vortex;
10. Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente;
11. Centrifugar a 9000G, a 4°C, por 10 minutos;

12. Descartar o sobrenadante;
13. Adicionar 1mL de etanol 75%;
14. Homogeneizar em vortex e observar se os pellets se desprenderam do eppendorf;
15. Centrifugar a 9000G, a 4°C, por 5 minutos;
16. Desprezar o álcool;
17. Secar o pellet;
18. Adicionar 100µL de água DEPC;
19. Homogeneizar até os pellets se dissolverem;
20. Armazenar a -20°C.

5.2 Quantificação do RNA

Para avaliar a pureza de uma amostra de RNA, assim como para quantificá-la, analisa-se o espectro de absorbância, usando um espectrofotômetro (WEBER et al., 2013).

O NanoDrop® é um tipo de espectrofotômetro mais sensível, que possui cobertura de espectro de 220 a 750nm e permite mensurar a concentração da amostra em um volume pequeno com rapidez, não havendo necessidade de diluição. Além disso, gera gráficos mostrando o espectro e fornece importantes relações de absorbância (260/280 e 260/230).

A relação 260/280 é utilizada para avaliar a contaminação por proteínas, uma vez que os ácidos nucleicos e as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 260 e 280nm, respectivamente. A razão 260/230 é empregada para estimar a contaminação por outros compostos, principalmente por resíduos de reagentes utilizados no processo de extração. Quanto mais puras forem as amostras de RNA, maiores serão essas razões. Utiliza-se valores acima de 1,8 como referência de pureza do RNA (CARVALHO, 2007).

Quantificação de ácidos nucleicos no NanoDrop®:

01. Abrir o software do NanoDrop® no computador e selecionar a opção do ácido nucleico;
02. Pipetar 2 µL do solvente em que a amostra foi ressuspendida (RNase free water);

03. Selecionar a opção branco. Se o campo ng/ μ L do programa mostrar o valor zero, a quantificação da amostra pode ser iniciada;
04. Secar o solvente com papel toalha e pipetar 2 μ L da amostra;
06. Digitar a identificação da amostra e quantificar;
07. Quando o aparelho terminar a quantificação, limpar as áreas que entraram em contato com a amostra com papel toalha, para que a quantificação da próxima amostra não seja afetada.

5.3 Desenho dos primers

Os primers, ou iniciadores, são oligonucleotídeos sintéticos complementares a regiões específicas do DNA alvo a ser amplificado (GARCÊS; LIMA, 2004).

O desenho de primers para PCR é o passo chave para uma reação bem-sucedida, sendo um procedimento simples quando a sequência do DNA alvo a ser amplificada é conhecida. Uma das formas para se desenhar primers é através da utilização de programas de bioinformática. Primeiramente, é necessário escolher a sequência desejada em banco de dados, como o Genbank do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Após a obtenção das sequências nas bases de dados, utiliza-se uma plataforma de desenho de primers, como a IDT DNA, PRIMER 3 e PRIMER BLAST, onde devem ser inseridas a sequência, tamanho desejado do primer, composição, temperatura de melting, espécie, entre outros (SAMBROOK et al., 2002).

A especificidade do primer é afetada principalmente pelo tamanho e temperatura de anelamento (DE LADEIRA, 2011).

Primers que contenham entre 18 e 28 bases tendem a ser específicos, anelando apenas na região a ser amplificada, e proporcionam temperaturas de anelamento pouco variáveis da temperatura de melting, temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice (DIEFFENBACH et al. 1993).

A temperatura de anelamento é a temperatura na qual os primers se pareiam ao DNA molde e é específica de cada primer, pois depende da quantidade de bases, principalmente guanina e citosina, que ele possui (BOCK, 1997). O ideal é que a porcentagem de conteúdo dessas bases fique entre 45 e 55%. Temperaturas de anelamento abaixo do ideal tendem a causar menor estringência, ou seja, o primer pode se anelar em qualquer lugar. Em contrapartida,

temperaturas de anelamento muito altas tendem a provocar maior estringência e o primer pode nem se anelar. Por isso, sua correta determinação em cada primer é primordial (DIEFFENBACH et al., 1993).

Após o desenho do primer é necessário a verificação da sua qualidade e especificidade, utilizando-se ferramentas como o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), do banco de dados do NCBI, usando a opção “nucleotide BLAST”. Os resultados do BLAST são apresentados de acordo com dois parâmetros: score bits e o e-value. O score depende do tamanho do alinhamento e do número de matches/mismatches/gaps. Para cada sequência da base de dados listada, ou cada hit, é associada uma pontuação que quantifica o grau de similaridade entre as duas sequências, logo, quanto maior o score melhor. Contudo, mesmo considerando um alto score entre duas sequências, nem sempre pode-se inferir um alto grau de homologia entre estas (DE SOUSA, 2007). Devido a aleatoriedade no processo de alinhamento, podem ser sequências que não tenham relacionamento algum. Utiliza-se assim o e-value para saber a possibilidade de um determinado alinhamento ter acontecido por acaso. O e-value corresponde à probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição, outro alinhamento com score igual ou superior. Desta forma, quanto mais próximo de zero for o e-value, maior a chance de evidenciar uma similaridade real (LIMA, 2007).

5.4 Diluição dos primers

Os primers quando são adquiridos das empresas que os sintetizam, se apresentam com alta concentração na forma liofilizada, sendo necessários diluir para estoque e para uso, a fim de maximizar a utilização dos mesmos, deixando-os em concentrações adequadas.

5.4.1 Diluição para estoque

A quantidade de água deionizada ou TE necessária para haver a diluição e se ter uma solução de estoque é específica para cada primer, sendo o volume necessário dez vezes o valor de Nmoles dos primers, para se ter uma concentração final de 100 μ M (BRANCO, 2010).

$$V_{\text{mili-Q ou TE}} = N \text{ moles do primer} \times 10$$

Após a diluição, homogeneizar e estocar a -20°C.

5.4.2 Diluição para uso

No momento da PCR, deve-se fazer a solução para trabalho ou uso, diluindo os primers em estoque numa proporção de 1:10 em água deionizada, obtendo-se uma concentração final de 10 μ M.

5.5 Transcrição reversa

Transcrição reversa é a reação de formação de cDNA a partir de mRNA por uma DNA polimerase RNA-dependente, ou seja, uma enzima que produz DNA a partir de um molde de RNA (DE LADEIRA, 2011).

Através da formação de pontes de hidrogênio entre a sequência de bases timina de oligonucleotídeos (oligo-dT) e a cauda poli-A do mRNA, da ação de uma enzima transcriptase reversa, como as sintéticas da SuperScript II, que têm atividade polimerase aumentada e nuclease, diminuída, e de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) há a síntese da primeira fita de cDNA (REBOUÇAS et al., 1999). Para que esta conversão seja feita são necessários ainda: cátions bivalentes de magnésio (Mg^{2+}), metal imprescindível à reação, que atua aumentando os pontos de interação entre NTPs/dNTPs; ditioneitol ou DTT, que tem como função proteger as enzimas e proteínas da oxidação; RNase H, utilizada para remover os híbridos no final da reação e RNase OUT®, que degrada as RNases presentes durante a síntese do cDNA (DE LADEIRA, 2011), seguindo o subsequente protocolo:

01. Descongelar e homogeneizar as amostras de RNA;

02. Preparar o RT Mix 01;

Quadro 01: RT Mix 01

Componente	Quantidade para uma amostra (μ L)
Amostra de RNA	n*
10 mM dNTP mix	1
Oligo dT 0,5 μ g/ μ L	1
Água DEPC (p/ 10 μ L)	n*
Total	10

* A quantidade de RNA e água DEPC vão variar de acordo com a concentração das amostras, não tendo um valor fixo.

03. Incubar o RT Mix 01 a 65°C por 5 min;

04. Esfriar em gelo por 1 minuto;

05. Preparar em um outro eppendorf o RT Mix 02;

Quadro 02: RT Mix 02

Componente	Quantidade para uma amostra (µL)
Buffer RT 10 X0	2
MgCl ₂ (25 mM)	4
0,1 M DTT	2
RNase out	1
Total	9

06. Adicionar os 9 µL do mix acima em cada eppendorf contendo o RT Mix 01 e dar um spin;

07. Incubar a 42 °C por 2 minutos;

08. Adicionar 1 µL (50 U) da enzima SuperScript RTII em cada eppendorf;

09. Incubar a 42°C por 50 minutos;

10. Incubar a 70°C por 15 minutos;

11. Dar um spin em todos os eppendorfs;

12. Adicionar 1 µL de RNase H;

13. Incubar a 37°C por 20 minutos;

14. Conservar a -20°C.

5.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é um método in vitro que amplifica enzimaticamente sequências específicas de DNA utilizando pequenos oligonucleotídeos que se ligam a determinadas regiões de interesse do genoma, os primers. O procedimento consiste de uma série de ciclos repetidos de

amplificação através de três fases: desnaturação pelo calor, anelamento e extensão (OLIVEIRA, 2010).

Na primeira fase, ocorre a separação da dupla hélice de DNA por aquecimento a uma temperatura elevada (94°C-96°C), originando duas cadeias separadas (GARCÊS; LIMA, 2004).

A fase de anelamento ocorre entre 50°C e 60°C. Durante esta fase, o par de primers se recombinam com as duas cadeias de DNA separadas, com elevada especificidade. O par de primers liga-se à sequência complementar de DNA, indicando os pontos inicial e final da nova cópia de DNA que irá ser sintetizada na fase seguinte (PELT-VERKUIL et al., 2008).

Durante a fase de extensão do DNA a temperatura é elevada até o intervalo de 72°C a 76°C, que coincide com a temperatura a que a DNA polimerase tem a sua máxima de atividade. Essa enzima reconhece os sítios onde os primers se recombinaram com o DNA alvo e liga-se a eles. A enzima sintetiza a cadeia complementar utilizando os nucleotídeos trifosfatados que estão livres e em excesso na solução da reação. A extensão começa sempre na zona 3' do primer. A DNA polimerase sintetiza exclusivamente na direção 5'-3'. Consequentemente, na construção da cadeia complementar da sequência alvo de DNA, os nucleotídeos livres na solução são somente adicionados à zona 3' dos primers (PELT-VERKUIL et al., 2008).

No fim de um ciclo da PCR obtém-se duas novas moléculas de DNA para cada alvo. Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo da técnica, fazendo com que se dê um crescimento exponencial, havendo ao fim de n ciclos, 2ⁿ vezes mais cópias do que havia no início (DELIDOW et al., 1993).

Para a realização da PCR convencional são necessários o DNA molde, primers e uma mistura de reagentes, denominada de Master Mix, composta por Taq DNA polimerase, desoxinucleosídeos trifosfatados (dNTP's), tampão e cloreto de magnésio (CHEN; JANES, 2002; PELT-VERKUIL et al., 2008).

Para que haja compreensão da PCR se faz necessário entendimento desses reagentes e sua ação durante a técnica.

5.6.1 Reagentes e suas finalidades

5.6.1.1 Tampão para PCR

O mercado disponibiliza o tampão para PCR de duas formas, separadamente ou em conjunto com a DNA Polimerase. O tampão frequentemente utilizado na PCR é o 10mM de Tris, que apresenta uma faixa de pH, a 25°C, entre 8,5 e 9,0. Basicamente, estas soluções contêm íons diversos (Na^+ , Cl^- , K^+ , entre outros) que otimizam as condições de reação. Alguns tampões contêm ainda detergentes (Tween 20, Triton X-100, Nonidet P-40), inibindo a formação de dímeros das cadeias enzimáticas, proteínas estabilizantes e algumas substâncias que agem na desnaturação da cadeia molde (VIEIRA, 2008).

5.6.1.2 Cloreto de magnésio (MgCl_2)

Um reagente de importância crítica é o MgCl_2 , doador estável de íons Mg^{2+} , que são cofatores indispensáveis para atividade da enzima DNA Polimerase, no anelamento dos primers e ponto de fusão dos produtos da PCR (BAUMFORTH et al., 1998). A concentração de magnésio é de 0,5 a 2,5 mM na mistura, sendo geralmente maior do que a concentração de dNTPs (INNIS et al., 1990). Algumas enzimas, como a *Thermus thermophilus*, podem utilizar também outros íons metálicos como cofatores.

5.6.1.3 DNA Polimerase

É uma classe de enzimas, presente tanto em células procarióticas como em eucarióticas, responsável pela polimerização das novas fitas de DNA, na direção 5' para 3'. Existem disponíveis no mercado algumas variedades de DNA polimerase, sendo que a mais utilizada é a Taq Polimerase que trabalha em condições ótimas de 72° C (DE LADEIRA, 2011).

Essa enzima é bastante termoestável, apresentando um tempo de meia vida de aproximadamente 35-40 minutos, a 95°C. Desta forma, poderá ser adicionada no início da reação e permanecerá ativa durante todos os ciclos de amplificação (CHEN; JANES, 2002; YAZD et al., 2009).

5.6.1.4 Desoxinucleosídeos trifosfatos

Os dNTPs são as matérias-primas propriamente ditas para a síntese das fitas-filhas, sendo compostos por nucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP) desoxilados no carbono 5' da desoxirribose, onde são adicionados a fita molde pela Polimerase numa área delimitada pelos primers. Concentrações de desoxinucleosídeos entre 20 e 200 μM promovem um melhor rendimento, especificidade e fidelidade na PCR (INNIS et al., 1990).

5.6.1.5 Primers

São oligonucleotídeos iniciadores utilizados para delimitar a sequência de ácidos nucleicos a ser amplificada, usados numa concentração de 0,1 – 0,5 μM de cada primer. Para a maioria das aplicações 0,2 μM é suficiente. Altas concentrações de primers promovem a formação de dímeros de primer ou a geração de produtos inespecíficos, reduzindo assim o rendimento desejado da PCR (INNIS et al., 1990).

5.6.1.6 DNA alvo

É o molde para a PCR, sendo de extrema importância estar livre de contaminações e possuir sequência intacta.

5.6.1.7 Água ultrapura

Além de permitir um meio aquoso para realização das reações químicas, a água ultrapura é utilizada também a fim de completar o volume final da reação.

5.6.2 Protocolo da PCR

01. Adicionar o mix da PCR em todos os eppendorfs, composto por: 12,5 μL de Master Mix, 0,5 μL de cada primer (R e F) e 10,5 μL de água DEPC;
02. Adicionar 1,0 μL da amostra de DNA, exceto no controle (branco da reação);
03. Homogeneizar;

04. Levar ao termociclador e adicionar a programação, que é específica para cada tipo de primer, uma vez que há variação na temperatura de anelamento. Programação utilizada: um ciclo de desnaturação a 94°C por 4 minutos; seguidos de 30 ciclos de desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; encerrando o processo com uma extensão final a 72°C por 10 minutos;
06. Após o termino, retira-se os eppendorfs do termociclador, e seu produto o amplicon, pode ser armazenado a -20°C ou ser utilizado para validar a amplificação do DNA, por meio do gel de agarose.

5.7 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da reação da PCR são normalmente visualizados através da eletroforese em gel. Outros métodos analíticos também podem ser aplicados, tais como, Southern blotting, ensaio ELAHA (enzyme-linked amplicon hybridization assay), ensaio ELOSA (enzyme-linked oligosorbent assay), entre outros (MACKAY et al., 2007; PELT-VERKUIL et al., 2008).

A eletroforese em gel consiste na separação de moléculas com carga elétrica não nula sob a influência de um campo elétrico, geralmente usado para separar proteínas, RNA e DNA (WESTERMEIER, 2005).

Como os ácidos nucleicos possuem carga elétrica negativa, devido ao grupamento fosfato, a migração das partículas ocorre em direção ao pólo positivo, gerando um conjunto de bandas (MIGUEL, 2007). A visualização destas bandas é realizada através de radiação ultravioleta e da adição de um composto fluorescente, como o brometo de etídeo e o nitrato de prata (OLIVEIRA, 2009). Por meio da comparação dessas bandas pode-se estimar o tamanho do produto, através da utilização de um marcador de massa molecular previamente conhecida, o ladder (CHEN; JANES, 2002).

O tipo de gel utilizado depende do tamanho das moléculas a separar. Utiliza-se gel de poliacrilamida para separar moléculas de pequenas dimensões e agarose para moléculas maiores (OLIVEIRA, 2010).

A concentração de agarose atua de forma importante na eletroforese, pois ela determina a faixa de tamanho das moléculas de DNA que podem ser separadas. Geralmente, a

matriz do gel é composta por cerca de 1 a 2% de agarose, dependendo do tamanho dos produtos da PCR (CHEN; JANEs, 2002; PELT-VERKUIL et al., 2008).

Protocolo de preparação do gel de agarose a 1% e eletroforese em cuba horizontal:

01. Pesar 1,3g de agarose e diluir em 130mL de TAE (Tampão de eludicação – 0,4M Tris Acetato, pH 8,3; 0,01M EDTA), com uma concentração de uso de 1X, em um erlenmeyer;
02. Levar o erlenmeyer para o micro-ondas por ciclos de 30 segundos, até que a solução se apresente homogênea, ou seja, até que a agarose se dissolva totalmente;
03. Retirar do micro-ondas e levar para a torneira com água corrente, a fim de reduzir a temperatura para o brometo de etídeo não evaporar;
04. Adicionar 6,5 µL de brometo de etídeo e homogeneizar;
05. Transferir a solução do erlenmeyer para a cuba;
06. Observar a presença de bolhas. Caso existir, retirar com uma ponteira;
07. Colocar os pentes para formação dos poços, onde serão aplicadas as amostras;
08. Depois de gelificado, retirar cuidadosamente os pentes e transferir o gel para a cuba horizontal de eletroforese, deixando os poços para o lado negativo;
09. Adicionar o tampão de corrida (TAE 1X) na cuba. A finalidade de se usar um tampão de corrida, se deve ao fato de possuir agente espessante (glicerol), que evitará o refluxo da amostra ao ser aplicado o corante (blue juice);
10. Adicionar em cada poço 5µL de amostra e 1 µL de blue juice;
11. Adicionar no último poço 5 µL de ladder e 1 µL de blue juice;
12. Conectar a fonte na cuba;
13. Programar a corrida para 120 V;
14. Após a corrida dos produtos de amplificação, fotovisualizar o gel em um aparelho transiluminador sob radiação ultravioleta (ImageQuant 300).

5.8 PCR em tempo real

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou simplesmente qPCR, foi descrita pela primeira vez por Higuchi (1993). O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional, diferindo essencialmente em uma característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do DNA amplificado em cada ciclo de amplificação. Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real (HEID et al., 1996).

A análise *in vitro* dos produtos da amplificação por PCR em tempo real é realizada através da utilização de compostos fluorescentes. Os métodos químicos de fluorescência disponíveis podem ser agrupados em dois grandes grupos: as sondas de sequência específica e os corantes intercalantes, como o SYBR® Green (MACKAY et al., 2007; PELT-VERKUIL et al., 2008).

A tecnologia SYBR Green® baseia-se num conjunto de moléculas com a capacidade de se ligar de forma covalente à dupla cadeia de DNA e quando excitadas emitem uma fluorescência verde que é medida e convertida em uma quantidade de DNA (MACKAY et al., 2007).

No início do processo a fluorescência é reduzida, visto que as moléculas livres do SYBR Green® não estão ligadas ao DNA de dupla cadeia e como tal, o sinal produzido é mínimo. Ao longo do processo, após a detecção dos primers, quantidades crescentes dos fluorocromos ligam-se à dupla cadeia de DNA, pré-sintetizada pela enzima Taq DNA polimerase. No fim da fase de extensão de cada ciclo, a fluorescência é monitorizada e quantificada e, conseqüentemente o DNA amplificado é determinado (CORREIA, 2007; MACKAY et al., 2007).

Protocolo da PCR em tempo real:

01. Preparar o Mix para PCR: 12,5 µL do SYBR Green, 0,5 µL de cada primer (R e F) e 10,5 µL de água;
02. Colocar os 24 µL do mix em cada poço da placa;
03. Adicionar 1 µL do cDNA e homogeneizar;
04. Lacrar cuidadosamente a placa;

05. Dar um pulso por centrifugação, a 3.000 rpm;
06. Colocar a placa no termociclador;
07. Adicionar o programa de amplificação do gene de interesse.

5.9 Extração e purificação de plasmídeos de clonagem

Plasmídeos são moléculas de DNA de fita dupla, circulares e extracromossomais, capazes de replicar-se independentemente dos cromossomos bacterianos (LEVINSON et al., 2014). Por esse motivo, são muito utilizados como veículos para clonagem gênica, permitindo inserir genes ou promotores em organismos de interesse.

Em função da importância dessas moléculas nas células hospedeiras e de seu uso como ferramentas moleculares, várias técnicas para a extração e a purificação dos plasmídeos têm sido otimizadas (GITAHY et al., 2005).

A técnica de extração mais utilizada é a lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989), que foi um dos primeiros métodos desenvolvidos e pode ser empregado na obtenção de plasmídeos de vários microrganismos diferentes (GITAHY et al., 2005).

Para garantir a transferência eficiente do DNA plasmídico para as células e o sucesso de expressão da proteína codificada é essencial que o plasmídeo produzido se apresente majoritariamente (acima de 80%) na conformação superenrolada e esteja livre de contaminantes. Esta recomendação é baseada na percepção de que a isoforma superenrolada tem uma atividade biológica superior, quando comparada com outras isoformas (PILLAI et al., 2008).

O DNA plasmideal representa apenas 2% do total de ácidos nucleicos presentes no lisado celular obtido e, portanto, grandes quantidades de RNA e proteínas remanescentes devem ser removidas (FERREIRA et al., 2001). Essas impurezas (RNA, proteína, fenol, clorofórmio, etanol EDTA, SDS e elevada concentração de sais) podem inibir por completo a ação de determinadas enzimas de restrição. Por isso, a purificação dos plasmídeos é de suma importância.

O processo de extração e purificação plasmideal acompanhado durante o estágio foi realizado com o intuito de produzir proteínas recombinantes de vírus relacionados a doenças, seguindo-se o subsequente protocolo:

01. Centrifugar 1-10 mL do meio de cultura overnight por 5 minutos, a 13000 rpm;
02. Descartar o sobrenadante;
03. Ressuspender o pellet com 250 μ L da solução de ressuspensão celular;
04. Adicionar 250 μ L da solução de lise celular. Homogeneizar por inversão, invertendo o mix por 4 vezes;
05. Adicionar 10 μ L da solução protease alcalina. Inverter 4 vezes e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente;
06. Adicionar 350 μ L da solução de neutralização. Inverter 4 vezes;
07. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos;
08. Inserir uma coluna spin em um tubo de coleta e transferir o lisado do eppendorf para esta coluna;
09. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto. Descartar o sobrenadante e reinserir a coluna de spin;
10. Adicionar 750 μ L da solução de lavagem (wash solution). Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto. Descartar o sobrenadante e reinserir a coluna de spin;
11. Adicionar 250 μ L da solução de lavagem (wash solution). Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos. Descartar o sobrenadante;
12. Transferir a coluna de spin para um eppendorf, tomando cuidado para não levar nenhum resíduo de solução de lavagem nessa coluna;
13. Adicionar 100 μ L de nuclease free water na coluna de spin. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto;
14. Descartar a coluna e estocar o DNA plasmidial a -20°C .

5.10 Enzimas de restrição

As endonucleases ou enzimas de restrição atuam como tesouras moleculares capazes de reconhecer uma sequência específica de nucleotídeos, cortando-o na ligação açúcar-fosfato, produzindo fragmentos de DNA (NICHOLL et al, 2006).

Esses fragmentos podem ser identificados e separados através da técnica de eletroforese e serem utilizados para a construção de uma molécula de DNA recombinante (PIERCE, 2004).

As enzimas de restrição são extremamente caras e de grande instabilidade. Assim, deve-se ter o maior cuidado ao pipetar estes produtos para evitar desperdícios e desnaturações.

Protocolo de digestão total de DNA com enzima de restrição:

01. Adicionar em um eppendorf 2 μL de tampão (10X Buffer H), 1 μg de DNA e completar o volume do mix em 20 μL com água ultrapura. Homogeneizar suavemente;
02. Adicionar 1 μL da enzima de restrição (EcoR1), mergulhando o mínimo possível da ponteira e mantendo o eppendorf no gelo;
03. Incubar a mistura a 37°C, durante 1 hora;
04. Inativar a enzima por aquecimento, incubando a 65°C por 20 minutos;
05. Analisar os produtos da reação em gel de agarose.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da vivência no Núcleo de Genômica e Bioinformática e Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular, proporcionada pelo estágio de conclusão de curso, foi possível conhecer e aprender na teoria e na prática as principais técnicas laboratoriais envolvidas nessas áreas. Embora estas não sejam abordadas no curso de Zootecnia, com a profundidade em que foi explorado no decorrer do estágio, mostra-se de suma importância para o Zootecnista, pois o seu emprego pode proporcionar um maior incremento na produtividade animal, bem como o uso para elucidar inúmeros eventos biológicos. Permitiu também uma visão multidisciplinar em relação à pesquisa na área de Biotecnologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, N. D. D., FARIAS, R. P. D., PEREIRA, P. B., FIGUEIREDO, F. M. D., MORAIS, A. M. B. D., SALDANHA, L. C., & GABRIEL, J. E. A era da bioinformatica: seu potenciale suas implicacoes para as ciencias da saude. **Estudos de biologia**, 30(70-72), 143-148, 2008.
- BASTARD, J. P., CHAMBERT, S., CEPPA, F., COUDE, M., GRAPEZ, E., LORIC, S., TSE, C. RNA isolation and purification methods. In: **Annales de biologie clinique**. 2001. p. 513-523.
- BAUMFORTH, K. R. N.; NELSON, P. N.; DIGB, J. E.; O'NEIL, J. D.; MURRAY, P. G. The polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 52, p. 1-10, 1999.
- BITENCOURT, G. A.; CHIARI, L.; VALLE, C. B.; LAURA V. A.; MORO, J. R. Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária. **Campo Grande: Embrapa Gado de Corte**, 2011.
- BOCK, R. Biolistic of transformation of plants with anion exchange purified plasmid DNA. **Qiagen News Issue**, n. 5, 1997.
- BRANCO, S. B. C. **Aplicação de FISH e RQ-PCR no estudo da leucemia mielóide crónica**. 2009. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Aveiro, 2009.
- CALSA JUNIOR, T.; BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A. V. O. Análise serial da expressão gênica. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília**, n. 33, p. 86-98, 2004
- CARVALHO, L. F. **Adaptação de técnicas de imunohistologia e de um novo modelo animal ao estudo de infecções por microbactérias**. 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Algarve, 2007.
- CORREIA, F.L.A. (2007). **Desenho e montagem de método rápido para diagnóstico da Borreliose de Lyme por PCR em tempo real**. Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 70 pp.
- CHEN, B. Y., JANES, H.W. PCR cloning protocols. Second Edition. **Humana Press** 192, 439 pp, 2002.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-clorophorm extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p.156-159, 1987.
- CRONIN, M., P. H. O., M., DUTTA, D., STEPHANS, J. C., SHAK, S., KIEFER, M. C., BAKER, J. B. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptasepolymerase chain reaction assay. **Am J Pathol**, v. 164, n. 1, p. 35-42, 2004.
- DELIDOW, B. C., LYNCH, J. P., PELUSO, J. J., WHITE, B. A. PCR protocols: current methods and applications. Edition A White. **Totowa**, NJ, 2 pp, 1993.
- DE LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Revista de Medicina**, v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011
- DE SOUSA, D. X. **Avaliação do E-value para Execução do BLAST sobre Bases de Dados Fragmentadas**. 2007. Monografias em Ciência da Computação. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO DE JANEIRO, 2007.

- DIEFFENBACH, C.W.; LOWE, T.M.J.; DVEKSLER, G.S. General Concepts for PCR Primer Design. **Genome Res.** v. 3: p. S30-S37. 1993.
- EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa Brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, p. 39-52, 2002.
- ELENIS, D. S.; KALOGIANNI, D. P.; GLYNOU, K.; IOANNOU, P. C.; CHRISTOPOULOS, T. K. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. **Anal bioanal chem**, v. 392, p. 347-354, 2008.
- FERREIRA, G. N. M.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S., SCHLEEF, M. Plasmids for Therapy and Vaccination, in: SchleeF, M. (Ed.), Plasmids for Therapy and Vaccination, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, p. 193-236, 2001.
- GARCÊS, S. P. S.; LIMA, A. O. S. Desenho e Validação in silico de Primers Intragenéricos. In: **II Workshop de Tecn. da Inf. aplicada ao Meio Ambiente–CBComp**. 2004.
- GITAHY, P. M.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. L. S.; SOUZA, M. T.; BALDANI, J. I. Purificação de DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο. **Seropédia: Embrapa Agrobiologia**, V. 8, 20 p, 2005.
- HEID, C. A., S., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, V. 6, 986-994, 1996.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. **Nature Publishing Company**, V. 11, 1026-1030, 1993.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., & WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic press, 1990.
- LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia-12**. McGraw Hill Brasil, 2014.
- LIMA, R. S. Sistema multiagente para anotação manual em projetos de seqüenciamento de genomas. 2007. 141f. Dissertação (Mestrado em Informática). Universidade de Brasília, 2007.
- MACKAY, I. M., MACKAY, J.F., NISSEN, M.D., SLOOTS, T.P. (2007). Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization* . Caister Academic Press Norfolk, UK.
- MARTINS, A. R. N. **Purificação de RNA por cromatografia de afinidade com histidina imobilizada**. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2009.
- MENEZES, M. P. C. **Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibérica e canárias**. 2005. 126 p. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005.
- MIGUEL, A. (2007). **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogênicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL**. Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico de Lisboa. Lisboa, 106 pp.
- OLIVEIRA, J. F. C., & HENKES, L. E. Marcadores moleculares em reprodução animal. In: *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: **Varela Editora e Livraria**, 261-279, 2002.

- OLIVEIRA, A. R. R. **Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real**. 2009. Tese de mestrado, Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências. Lisboa, 131 pp, 2009.
- OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia). Universidade de Aveiro. 2010.
- PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification, **Springer**, 332 pp, 2008.
- PEREIRA, J. C. C. Melhoramento genético aplicado a produção animal. **Belo Horizonte: FEP-MVZ**, 4ed., p. 609, 1998.
- PIERCE, A. B. Genética: Um Enfoque Conceitual. 5th ed.; **Editora Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2004.
- PILLAI, V. B., HELLERSTEIN, M., YU, T., AMARA, R. R. & ROBINSON, H. L. Comparative studies on in vitro expression and in vivo immunogenicity of supercoiled and open circular forms of plasmid DNA vaccines. **Vaccine**, v. 26, 1136-41 (2008).
- PROSDOCIMI, F., COUTINHO, G., NINNECW, E., SILVA, A. F., DOS REIS, A. N., MARTINS, A. C., ... & CAMARGO FILHO, F. (2002). Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 29, 12-25.
- REBOUÇAS, N. A.; GOMES, M. D. Hibridização subtrativa seguida de PCR. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, Brasília**, v. 11, p. 30-35, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1989.
- SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2700 p., 2002.
- WASSARMAN, K.M., A. ZHANG, G. STORZ. *Small RNAs in Escherichia coli*. **Trends Microbiol**, 1999. 7(1): p. 37-45.
- WEBER, R., SANTIN, A. P., ASSIS BRASIL, B. M. D. A., SILVA, I. S. B. D., FURLANETTO, T. W. Seleção de gene de referência para tecido normal de tireoide e bócio. **Revista HCPA. Porto Alegre**, 2013.
- WOLF, BARRY; LESNAW, JUDITH A.; REICHMANN, MANFRED E. A mechanism of the irreversible inactivation of bovine pancreatic ribonuclease by diethylpyrocarbonate. **European Journal of Biochemistry**, v. 13, n. 3, p. 519-525, 1970.
- YAZD, E.F., SADEGHIZADEH, M., HOSSEINKHANI, S., KHALAJ-KONDORI, M., EMAMZADEH, R. (2006). Molecular cloning, expression and sequence analysis of DNA polymerase I from an Iranian thermophilic bacterium, Bacillus sp. G. **Journal of the Iranian Chemical Society** 6, 831-837.