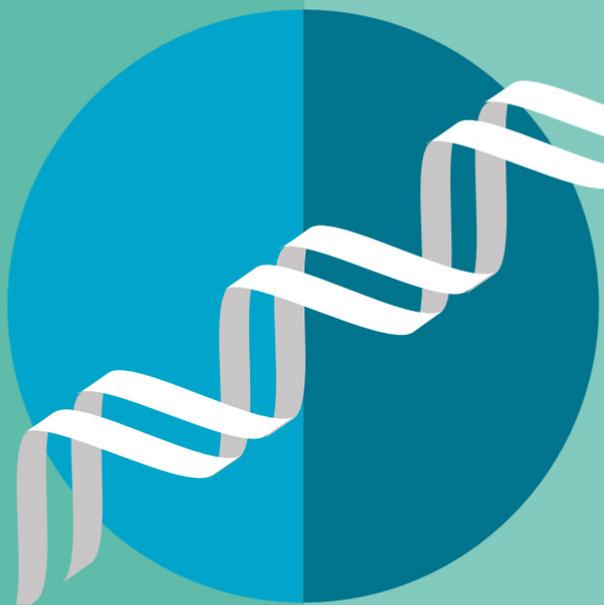


ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO  
NATHALIE COSTA DA CUNHA  
VIRGÍNIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA  
LEANDRO DOS SANTOS MACHADO  
DAYSE LIMA DA COSTA DE ABREU

# MANUAL DE TÉCNICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR



# Manual de técnicas em biologia molecular

Universidade Federal Fluminense  
REITOR  
Antonio Claudio Lucas da Nóbrega

VICE-REITOR  
Fabio Barboza Passos

Eduff - Editora da Universidade Federal Fluminense

CONSELHO EDITORIAL

Renato Franco [Diretor]

Ana Paula Mendes de Miranda

Celso José da Costa

Gladys Viviana Gelado

Johannes Kretschmer

Leonardo Marques

Luciano Dias Losekann

Luiz Mors Cabral

Marco Antônio Roxo da Silva

Marco Moriconi

Marco Otávio Bezerra

Ronaldo Gismondi

Silvia Patuzzi

Vágner Camilo Alves

© 2022. Elmiro Rosendo do Nascimento. É proibida a reprodução total ou parcial desta obra sem autorização expressa da editora.

Equipe de realização  
Editor responsável: Renato Franco  
Coordenação Editorial: Ricardo Borges  
Supervisão Gráfica: Márcio Oliveira  
Revisão: Rozely Campello Barroco  
Emendas: Armenio Zarro Jr.  
Normalização: Camilla Almeida  
Projeto gráfico Capa e diagramação: Álvaro Faria

---

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação - CIP**

---

N244 Nascimento, Elmiro Rosendo do.  
Manual de técnicas em biologia molecular [recurso eletrônico] / Elmiro Rosendo do Nascimento ... [et al.]. – Niterói : Eduff, 2022. – 643 kb. ; ePUB. – (Coleção Biblioteca Básica).

Inclui bibliografia.  
ISBN 978-65-5831-112-6  
BISAC SCI049000 SCIENCE / Life Sciences / Molecular Biology

1. Biologia molecular. 2. Biossegurança. 3. Técnicas laboratoriais. I. Cunha, Nathalie Costa da. II. Pereira, Virgina Léo de Almeida. III. Machado, Leandro dos Santos. IV. Abreu, Dayse Lima da Costa da. V. Título. VI. Série.

CDD 660.6

---

Ficha catalográfica elaborada por Camilla Castro de Almeida CRB7-0041/21

Direitos desta edição cedidos à  
Eduff - Editora da Universidade Federal Fluminense  
Rua Miguel de Frias, 9, anexo/sobreloja - Icaraí - Niterói - RJ  
CEP 24220-008 - Brasil  
Tel.: +55 21 2629-5287  
[www.eduff.uff.br](http://www.eduff.uff.br) - [faleconosco.eduff@id.uff.br](mailto:faleconosco.eduff@id.uff.br)

Impresso no Brasil, 2022.  
Foi feito o depósito legal.

# Manual de técnicas em biologia molecular

Laboratório de Epidemiologia Molecular  
Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública  
Faculdade de Veterinária  
Universidade Federal Fluminense

## Autores:

Elmiro Rosendo do Nascimento,  
Nathalie Costa da Cunha,  
Virgínia Léo de Almeida Pereira,  
Leandro dos Santos Machado e  
Dayse Lima da Costa de Abreu

## Colaboradores (em ordem alfabética):

Amanda Isabelly Leite Figueiredo Nascimento,  
Aysha Costa Rangel,  
Davi Guimarães de Almeida,  
Gabriela Paixão Spenchutt Vieira,  
Júlia Alves Vignoli,  
Larissa Silveira Vieira,  
Thomas Salles Dias e  
Willker Menezes da Rocha.

## Prefácio

O Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Veterinária da UFF pode ser definido como um espaço multiuso. Sua finalidade é dar suporte logístico e operacional para experimentos de professores, graduandos e pós-graduandos, envolvendo ensaios modernos e precisos para auxiliar o diagnóstico precoce e exato de diversas doenças e condições genéticas, assim como a detecção de mutações genéticas. Sua infraestrutura dispõe de setores destinados desde a extração de ácidos nucleicos e a preparação de soluções até a realização de ampliações e análises de DNA/RNA.

Diante disso, o referido manual surgiu a partir da necessidade de os alunos terem um material que associasse a prática à teoria em relação aos ensaios e funções de reagentes e soluções usadas. Este manual aborda temas essenciais para aqueles que atuam nesse tipo de laboratório, tais como as regras básicas de biossegurança, os tipos de materiais e equipamentos utilizados em laboratórios e preparo de soluções. Além disso, aborda técnicas básicas na área de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações.

A obra foi redigida de forma clara e simples, facilitando o entendimento dos temas por alunos de graduação e de pós-graduandos. Além disso, o uso de ilustrações foi essencial para complementar e auxiliar o entendimento do leitor em partes importantes no texto. Essas características tornam este manual

extremamente útil na formação e no apoio a estudantes que pretendem entender de forma direta e resumida as atividades rotineiras que ocorrem nesses laboratórios.

# Sumário

## **1 Princípios de biossegurança | 10**

- 1.1 Introdução | 10
- 1.2 Classificação de risco dos micro-organismos | 11
- 1.3 Equipamentos de segurança | 12
  - 1.3.1 Equipamentos de proteção individual no Laboratório | 13
  - 1.3.2 Equipamentos de Proteção Coletiva no Laboratório | 13
    - 1.3.2.1 Cabines de segurança biológica | 14
    - 1.3.2.3 Instalações | 14
  - 1.3.3 Normas de segurança geral no laboratório | 15
    - 1.3.3.1 Limpeza biológica do laboratório | 17
    - 1.3.3.2 Descarte de materiais e resíduos | 18
    - 1.3.3.3 Principais reagentes químicos utilizados em um laboratório de biologia molecular | 18

## **2. Extração de ácidos nucleicos | 26**

- 2.1 Princípios | 26
- 2.2 Etapas do processo de extração | 29
  - 2.2.1 Principais métodos de extração de DNA e RNA | 30
  - 2.2.3 Quantificação do DNA/RNA | 31

## **3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 32**

- 3.1 Introdução | 32
- 3.2 Princípios | 33
- 3.3 Variações da PCR | 39

3.3.1 PCR multiplex | 39

3.3.2 Nested-PCR | 40

3.3.3 PCR em Tempo Real | 41

3.3.4 Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (Restriction-Fragment Length Polymorphism) – RFLP | 43

3.3.5 PCR de transcriptase reversa (Reverse Transcription) - RT-PCR | 44

3.3.6 DNA polimórfico aleatoriamente amplificado (Random Amplified Polymorphic DNA) - RAPD | 45

## **4 Obtenção e visualização dos resultados da PCR | 48**

4.1 Eletroforese | 48

4.2 Preparo do gel | 51

4.3 Aplicação de amostras | 52

4.4 Visualização do resultado | 53

## **5 Guia de resolução de problemas | 55**

## **6 Referências bibliográficas | 58**

# 1 Princípios de biossegurança

## 1.1 Introdução

Biossegurança define-se como um conjunto de ações e procedimentos que objetivam minimizar ou evitar riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços que possam acarretar danos à saúde ou ao meio ambiente.

Ao aplicar a biossegurança em laboratórios, busca-se conter o risco de exposição a agentes potencialmente nocivos às pessoas envolvidas direta ou indiretamente nas atividades e ao meio ambiente. Os métodos utilizados para esta contenção são classificados em primários ou secundários e representam as bases da biossegurança.

A contenção primária consiste na proteção da equipe diretamente envolvida no trabalho e do ambiente no qual esse trabalho é realizado. Essa contenção é obtida por meio de práticas microbiológicas seguras e pelo uso adequado de equipamentos de segurança, sendo eles tanto os individuais quanto os coletivos. Já a contenção secundária está relacionada à proteção do ambiente externo ao local de trabalho, bem como daqueles que não estão diretamente envolvidos na manipulação dentro do laboratório. Diz respeito às suas instalações físicas, localização e construção.

É importante que os laboratórios tenham controle de acesso

de pessoas; mantenham as portas fechadas; possuam área para a lavagem de mãos e para guardar pertences pessoais; paredes, pisos e bancadas de fácil lavagem e desinfecção; bancadas e móveis que suportem o peso previsto dos equipamentos; um local para desinfecção de amostras e equipamentos contaminados e um local para guardar produtos em estoque. Para preservar a segurança de todos, é preciso lembrar que nunca se devem estocar produtos dentro do laboratório, sendo mantidos em seu interior apenas os que estão em utilização, e assim por diante.

Devemos sempre ter em mente que, juntamente com as boas práticas e procedimentos, a utilização de equipamentos de segurança ajuda a eliminar e/ou reduzir os riscos inerentes à atividade.

## 1.2 Classificação de risco dos micro-organismos

A avaliação de risco engloba um conjunto de ações cujo objetivo é reconhecer ou identificar os agentes biológicos e a probabilidade do dano proveniente destes. Tal análise é orientada segundo critérios que levam em consideração não somente o agente biológico manipulado, mas também o tipo de ensaio realizado, o trabalhador e a espécie animal utilizada no estudo, quando for pertinente. Deve contemplar as várias esferas que envolvem a questão, tanto as relativas a procedimentos e infraestrutura, quanto as informações relacionadas ao grau de treinamento das equipes. A organização do trabalho e as práticas gerenciais também são importantes focos de análise.

As informações contidas nesse tópico se referem aos perigos relativos a microrganismos infecciosos e só devem ser utilizadas em trabalho laboratorial (OMS, 2004). Em relação ao grupo de risco, os micro-organismos podem ser classificados em:

- *Grupo de Risco 1*: Representa micro-organismos com baixíssima probabilidade de causar doença no homem ou nos animais. Ex: *Lactobacillus sp.*

- *Grupo de Risco 2:* Compreende agentes patogênicos que podem causar doenças no homem ou nos animais. É pouco provável se constituir em perigo grave para pessoas, animais e para o meio ambiente. A exposição a esses agentes no local de trabalho pode causar uma infecção grave, mas para esta, existe tratamento já consolidado. O risco de propagação de infecções causadas por agentes desse grupo é limitado. Ex.: *Schistosoma mansoni*, *Ehrlichia spp*, *Leptospira interrogans* (todos os sorotipos).
- *Grupo de Risco 3:* Patógenos classificados nesse grupo geralmente causam doenças graves no homem ou nos animais. Para as infecções causadas por eles existe tratamento eficaz, bem como medidas de prevenção. Ex.: *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium bovis*, exceto a cepa BCG, *Brucella spp* (todas as espécies).
- *Grupo de Risco 4:* Os agentes desse grupo geralmente causam doenças graves no homem ou nos animais e são facilmente transmitidos entre pessoas. Nem sempre há tratamento disponível e eficaz para esse grupo, ou medidas de prevenção adequadas. Ex.: Herpesvírus do macaco (vírus B); Vírus da aftosa com seus diversos tipos e variantes; Vírus da cólera suína; Ebola e outros vírus relacionados.

### 1.3 Equipamentos de segurança

Podemos dividir os equipamentos de segurança em Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC).

Equipamentos de proteção individual (EPI) são dispositivos, de uso individual, destinados à proteção de riscos inerentes às atividades laborais capazes de ameaçar a saúde do indivíduo.

Em um laboratório de Biologia Molecular temos alguns exemplos de EPI's que sempre estão presentes e devem ser usados constantemente na nossa rotina de trabalho.

Os Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC) devem ser fornecidos pelo laboratório e tem o objetivo de proteger os colaboradores dos riscos que correm no ambiente de trabalho, de maneira coletiva. Em outras palavras, são equipamentos instalados para garantir a segurança no trabalho, enquanto determinadas tarefas são executadas.

### *1.3.1 Equipamentos de proteção individual no Laboratório*

**Jalecos:** são de utilização obrigatória e uso restrito ao laboratório. Devem possuir mangas longas, comprimento pelo menos até a altura dos joelhos e devem estar sempre abotoados. Quando for necessária sua retirada do laboratório para lavagem, o jaleco deve ser transportado em saco plástico fechado. A troca (ou lavagem) deve ser diária ou semanal, dependendo das atividades realizadas.

**Luvas:** são de utilização obrigatória em todos os procedimentos laboratoriais, principalmente quando há exposição a sangue, hemoderivados e fluidos orgânicos.

**Máscaras e óculos de proteção:** devem ser utilizados quando necessários e apropriados para o tipo de atividade desenvolvida. Esses EPI's serão utilizados de forma conjugada, quando necessário, em procedimentos que vão liberar vapores que venham a causar danos nesses locais. Exemplo: Extração de DNA utilizando Fenol Clorofórmio.

### *1.3.2 Equipamentos de Proteção Coletiva no Laboratório*

Os equipamentos de proteção coletiva são aqueles que protegem mais de um colaborador e o ambiente do trabalho. Lembrar-se disso é importante para que possamos ter cuidado ao manusear esses objetos, pois é preciso preservar o outro para que possa ter sua proteção assegurada quando for sua vez de utilizar o equipamento.

### 1.3.2.1 Cabines de segurança biológica

**Capela de exaustão:** É utilizada na manipulação de substâncias tóxicas e voláteis. Se o produto for muito tóxico ou concentrado, a máscara de proteção também deverá ser usada. A capela de exaustão funciona como uma espécie de aspirador, que aspira os vapores potencialmente tóxicos produzidos enquanto se manipula produtos químicos. Exemplo: uso de produtos químicos como fenol e clorofórmio em extração de DNA.

**Cabine de Segurança Classe I:** Protege o operador de forma que o ar circule no interior da cabine e depois seja enviado ao ambiente, passando pelo filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*). Os aerossóis formados são eliminados no ambiente.

**Cabine de Segurança Classe II:** Protege o operador, o ambiente e o produto. Ela se diferencia da classe I por proteger também a amostra do ambiente externo. O ar que entra na cabine passa antes pelo filtro HEPA. Setenta por cento desse ar é reciclado na cabine e 30% é expelido no ambiente.

Antes de eleger qual cabine de segurança usar, deve-se observar que tipo de atividade e que tipo de risco ela representa para o operador, o produto e o meio ambiente.

### 1.3.3 Instalações

O nível de biossegurança recomendado na manipulação de determinados agentes patogênicos determina as intervenções necessárias nas instalações dos laboratórios.

O laboratório deve ser planejado com separação das áreas de passagem livre dentro do edifício. Isso pode ser obtido quando o laboratório é construído no fim de um corredor sem saída, ou pela construção de uma parede de separação e porta de acesso através de uma antecâmara.

Paredes, tetos e pisos devem ser laváveis e qualquer perfuração nas superfícies deve ser selada, a fim de evitar contaminações. Os sistemas de ventilação devem ser construídos de modo

a viabilizar a descontaminação do laboratório por meio de gases. As janelas devem ser inquebráveis, seladas e devem permanecer fechadas. Os locais para a instalação das câmeras de segurança biológica devem ser localizados fora de zonas de passagem e de correntes de ar.

A presença da autoclave entre os equipamentos do laboratório é essencial na descontaminação de vidrarias, meios e resíduos contaminados em laboratórios. Se for necessária a remoção de resíduos infecciosos do laboratório para fins de descontaminação e descarte, é preciso seguir os protocolos nacionais e/ou internacionais acerca da forma apropriada de acondicionamento e transporte.

#### 1.4 Normas de segurança geral no laboratório

Algumas regras devem ser seguidas a fim de evitar contaminações e proporcionar um ambiente de trabalho mais seguro, a saber:

- O usuário deve trabalhar com seriedade, atenção e calma;
- Dentro do laboratório deve-se utilizar jaleco, calças compridas, calçado fechado e cabelos presos. Adereços, tais como brincos grandes, anéis, pulseiras e correntes, não devem ser usados;
- É obrigatória a utilização de luvas durante a manipulação das amostras e a realização de procedimentos. O tipo de luva a ser usada varia de acordo com a atividade desenvolvida, por isso, deve-se consultar o técnico responsável ou o padrão operacional acerca da luva apropriada;
- Objetos pessoais devem ser mantidos fora do laboratório, sendo acondicionados em armário específico em área destinada para esse fim;

- É terminantemente proibido o acesso ao laboratório com alimentos;
- É terminantemente proibido fumar nas dependências do laboratório;
- Caso o usuário vá operar um equipamento pela primeira vez, é imprescindível a leitura do manual de instruções e é obrigatória a presença do técnico do laboratório;
- Reagentes tóxicos e voláteis devem ser manipulados na capela de exaustão e com o exaustor ligado;
- Jamais pipetar ou abrir materiais com a boca;
- Os frascos devem conter rótulos com a identificação da substância e rotulagem e classificação de risco, segundo legislação vigente;
- Nunca abrir frascos ou manipular substâncias sem ler o rótulo. Nunca faça a abertura de tubos ou frascos em sua direção ou de outras pessoas;
- Observar a tensão elétrica do equipamento antes de colocá-los na tomada. Também é importante observar o estado físico dos fios, tomadas e plugues e só utilizá-los se estiverem em bom estado;
- Anotar nos livros de equipamentos a data, o horário de início e de fim de uso seguido de assinatura;
- Sobre superfícies úmidas ou próximas a produtos inflamáveis, não se deve utilizar equipamentos elétricos;
- Os protocolos e possíveis riscos devem ser estudados antes da realização das atividades;
- No fim do expediente, os equipamentos elétricos devem ser desligados, a não ser que haja autorização por escrito para que não o sejam, e, nesse caso, deve-se anotar no

quadro de avisos;

- Ao preparar reagentes ou soluções, estes devem ser acondicionados em frascos devidamente rotulados com o nome do reagente e a concentração, a data de preparo e o nome do responsável;
- O usuário deve verificar antecipadamente o estado de conservação do material a ser utilizado (pinças, espátulas, recipientes, vidraria etc.);
- Todos os materiais e equipamentos devem retornar para seus lugares de origem após o término dos procedimentos;
- A bancada deve ser limpa antes e depois de qualquer procedimento, com papel-toalha e álcool 70%;
- Qualquer derramamento acidental de reagente deve ser imediatamente contido e limpo. Em caso de dúvida sobre a toxidez e/ou procedimento de limpeza, deve-se consultar o técnico antes de efetuar a remoção.

#### 1.4.1 *Limpeza biológica do laboratório*

Para a segurança do laboratório em termos biológicos, é importante conhecer alguns termos, tais como descontaminação, desinfecção e esterilização.

Na desinfecção ocorre morte de microrganismos por meio físico ou químico, mas não há destruição de esporos. Já na esterilização, ocorre a morte de todas as classes de microrganismos, inclusive esporos. A descontaminação é o procedimento que se realiza com a intenção de proteger os profissionais que farão a limpeza de superfície ou objeto contaminado. Esse processo torna qualquer objeto ou região seguros para o contato de pessoas não protegidas.

#### 1.4.2 Descarte de materiais e resíduos

O descarte de resíduos deve ocorrer de acordo com o tipo de material biológico ou químico que foi utilizado, considerando os graus de risco envolvidos e as diretrizes da Instituição. Os recipientes com resíduos devem sempre estar identificados, e separados em local próprio. Ressalta-se que os resíduos perfuro-cortantes devem estar alocados em caixa destinada a esse fim.

#### 1.4.3. Principais reagentes químicos utilizados em um laboratório de biologia molecular

##### **Agarose**

Substância classificada como não perigosa

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco;
- Após contato com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar a roupa contaminada;
- Após contato com os olhos: Enxaguar abundantemente com água;
- Após ingestão: beber água (no máximo dois copos). Consultar médico caso haja algum mal estar.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: água, espuma, dióxido de carbono, pó seco.
- Agentes de extinção inadequados: Nenhuma limitação de agentes extintores é dada para essa substância/mistura.
- Material combustível: em caso de incêndio formam-se gases inflamáveis e vapores perigosos.

## **Brometo de etídio**

Perigos mais importantes: Tóxico e carcinogênico.

- Nocivo por ingestão.
- Muito tóxico por inalação.
- Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele.
- Possibilidade de efeitos irreversíveis.

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco. Eventualmente, respiração artificial ou ventilação com aparelhagem apropriada. Chamar imediatamente um médico.
- Após contato com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar a roupa contaminada. Consultar um médico.
- Após contato com os olhos: Enxaguar abundantemente com água, com a pálpebra aberta. Consultar imediatamente um oftalmologista.
- Após ingestão: Beber muita água, provocar o vômito. Chamar imediatamente um médico.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: Água, Espuma, Pó seco.

## **Cloreto de magnésio**

Substância classificada como não perigosa.

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco
- Após contato com a pele: Lavar abundantemente com

água. Tirar a roupa contaminada.

- Após contato com os olhos: Enxaguar abundantemente com água.
- Após ingestão: beber muita água.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: não combustível.

## **Clorofórmio**

Perigos mais importantes: Efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e ingestão.

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco. Consultar um médico.
- Após contato com a pele: Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.
- Após contato com os olhos: Lavar imediatamente com bastante água, por 15 min. Procurar um oftalmologista.
- Após ingestão: Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: Água, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

## **Etanol (álcool etílico)**

Perigos mais importantes: Produto inflamável.

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco.
- Após contato com a pele: Lavar imediatamente com água. Retirar as roupas contaminadas.
- Após contato com os olhos: Lavar imediatamente com bastante água, por 15 minutos. Procurar um oftalmologista.
- Após ingestão: Beber imediatamente bastante água. Procurar um médico.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: CO<sub>2</sub>, espuma e pó químico.

## **Fenol**

Perigos mais importantes: Tóxico

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco.
- Após contato com a pele: Retirar a roupa e os sapatos contaminados. Lavar com sabão e muita água. Transportar imediatamente o paciente para um hospital. Consultar um médico.
- Após contato com os olhos: Lavar imediatamente com bastante água, por 15 min. Procurar um oftalmologista.
- Após ingestão: Não provocar vômitos. Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: Água, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

### **Isopropanol (álcool isopropílico)**

Perigos mais importantes: Vapores inflamáveis podem ser liberados.

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco e permanecer em repouso em uma posição confortável para respirar.
- Após contato com a pele: Remover imediatamente a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água e tomar banho de chuveiro.
- Após contato com os olhos: Enxaguar abundantemente com água. Remover as lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Procurar médico se persistir irritação.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: Usar areia seca, produtos químicos secos ou espumas resistentes ao álcool para extinção.

### **Proteinase k**

Perigos mais importantes: sensibilizante respiratório

### *Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco. Chamar um médico.
- Após contato com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar a roupa contaminada.
- Após contato com os olhos: Enxaguar abundantemente com água, mantendo a pálpebra aberta. Consultar um oftalmologista, se necessário.
- Após ingestão: Fazer a vítima beber imediatamente água (dois copos no máximo). Consultar um médico. Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente.

### *Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: Nenhuma limitação de agentes extintores é dada para essa substância.

## **Tampão TAE**

Perigos mais importantes: Provoca irritação na pele e nos olhos.

### *Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco.
- Após contato com a pele: Retirar as roupas contaminadas. Enxaguar a pele com água e tomar banho de chuveiro. Consultar um médico.
- Após contato com os olhos: Lavar imediatamente com bastante água. Procurar um oftalmologista. Remova as lentes de contato.
- Após ingestão: Beber imediatamente bastante água (no máximo dois copos). Procurar um médico.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: nenhuma limitação de agentes extintores é dada para essa substância/mistura.

## **Tampão TE**

Substância não classificada como perigosa.

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Exposição ao ar fresco.
- Após contato com a pele: Lavar com sabão e muita água.
- Após contato com os olhos: Lavar imediatamente com bastante água.
- Após ingestão: Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: Água, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

## **Mercaptoetanol**

Perigos mais importantes: Tóxico

*Medidas de primeiros socorros:*

- Após inalação: Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não estiver respirando, aplicar a respiração artificial. Consultar um médico.

- Após contato com a pele: Lavar com sabão e muita água. Transportar imediatamente o paciente para um Hospital. Consultar um médico. Após contato com os olhos: Lavar cuidadosamente com muita água, durante pelo menos 15 minutos e consultar o médico.
- Após ingestão: Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

*Medidas de combate a incêndio:*

- Meios adequados de extinção: Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

## 2. Extração de ácidos nucleicos

### 2.1 Princípios

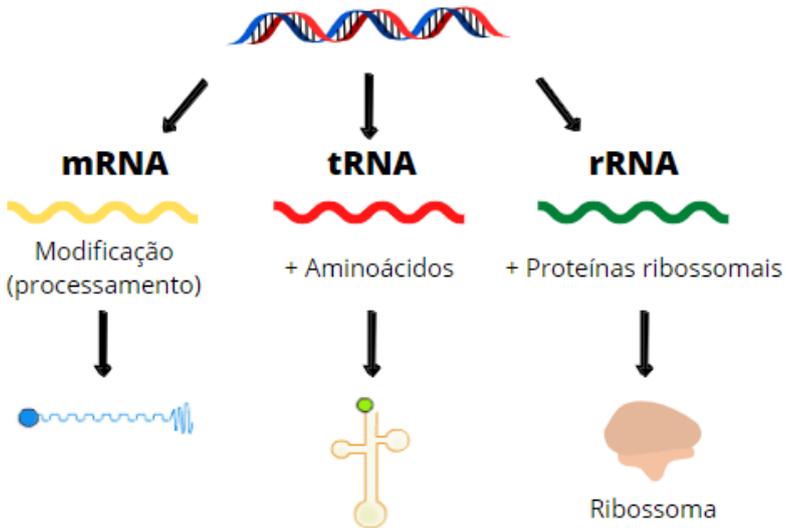
A classificação celular é feita em procariontes e eucariontes. Fósséis datam a existência de procariontes a três bilhões de anos, e de eucariontes desde um bilhão de anos atrás.

Os procariontes não apresentam envoltório celular do material genético, organelas e citoesqueleto. Não realizam endocitose e exocitose. Possuem filamentos circulares de DNA (plasmídeos). Membrana plasmática rica em lipopolissacarídeo, conferindo proteção. Enquanto os eucariontes possuem membrana nuclear, o que protege o DNA do movimento do citoesqueleto. Possuem compartimentos eficientes em metabolização, presença de organelas membranosas. Há separação da duplicação de DNA (replicação) e síntese de RNA a partir do DNA (transcrição).

Os ácidos nucleicos são macromoléculas constituídas de nucleotídeos, que por sua vez é formado por três partes: um açúcar do grupo das pentoses, um grupo fosfórico e uma base nitrogenada. Existem dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA).

O DNA é o principal constituinte dos cromossomos e é nele que estão todos os genes. Enquanto isso, os diferentes tipos de RNA (mensageiro, ribossômico e transportador) são formados no núcleo, mas passam para o citoplasma onde promovem a síntese de proteínas, ver Figura 1.

**Figura 1** - Diferentes tipos de RNA (mensageiro, transportador e ribossômico, respectivamente)



Autora: Júlia Alves Vignoli.

O DNA é uma macromolécula orgânica (Ácido Desoxirribonucleico), que possui material genético, conhecido também por código genético. Tal aglomerado molecular apresenta a capacidade de replicar-se permitindo sua transmissão célula a célula. Essas informações são encarregadas de fabricar proteínas, orientar atividades celulares, guiando e modificando o desenvolvimento de organismos vivos (exceto do RNA-vírus). Portanto, as características existentes no DNA são determinantes para que ocorra o bom funcionamento dos seres vivos e da formação de características físicas.

Uma das características do DNA é o fato de ele possuir dupla-hélice, unida por pontes de hidrogênio, composta de nucleotídeos, uma base nitrogenada e por uma pentose, formado por um grupo fosfato no qual se encontra compactado por proteí-

nas denominadas histonas. Já o DNA compactado permanece protegido, diminuindo, assim, sua superfície de contato. O DNA de células eucarióticas se localiza no núcleo envolvido por uma membrana nuclear, a carioteca, localizada no interior da célula, que, por sua vez, é delimitada por uma membrana plasmática. Tais membranas possuem fosfolipídios e proteínas na sua composição.

O Dogma Central da Biologia Molecular foi postulado por Francis Crick em 1958. Ele explica de que forma ocorre o fluxo de informações do código genético. Esse modelo, esquematizado na Figura 2, demonstra principalmente que uma determinada sequência do ácido nucleico pode gerar uma proteína, já o contrário não é possível ser realizado.

Figura 2 - Representação do dogma da biologia molecular



Autora: Júlia Alves Vignoli.

Segundo o dogma, a informação genética segue sentido DNA→RNA→Proteínas. A informação genética se encontra no DNA que, por sua vez, será transcrito em RNA num processo chamado transcrição, no qual uma molécula de DNA serve de molde para a criação de uma molécula de RNA. É na molécula de RNA que se encontra o código utilizado na organização da sequência de aminoácidos e é capaz de formar proteínas num processo denominado de tradução. Tal processo baseia-se na união dos aminoácidos, desempenhando a ordem de códons apresentados de um RNAm (RNA mensageiro). Também se observa a replicação do DNA, processo no qual uma molécula de DNA é responsável por gerar outra molécula idêntica à molécula origi-

nal. O RNA pode produzir DNA, porém, chamamos este feito de transcrição reversa a qual observamos principalmente nos vírus.

## 2.2 Etapas do processo de extração

A obtenção do material genético, a partir de diversos tipos de materiais (como sangue, tecidos, cultivos bacterianos, ectoparasitos, endoparasitos, leite e plantas), é a primeira etapa a ser realizada e também a mais importante, pois, dependendo da integridade e do grau de pureza das moléculas de DNA e RNA, podem ocorrer alterações no resultado final da análise a ser realizada.

A extração consiste basicamente em três etapas principais: o rompimento do envoltório celular, a desproteíntização e a recuperação do DNA/RNA.

- O rompimento do envoltório celular pode ser feito por meio de métodos físicos, como a abrasão física e o aquecimento, e, também, por métodos químicos, como a ação enzimática (proteínase K) e os detergentes (SDS, CTAB).
- A desproteíntização é realizada, geralmente, por meio de solventes orgânicos, como fenol tamponado ou fenol: clorofórmio. Consiste na remoção dos componentes celulares ou outras substâncias utilizadas para que não haja interferência na técnica a ser realizada. Nessa etapa serão formadas a fase aquosa e a fase orgânica no microtubo. Na fase aquosa teremos o DNA ou RNA e, na orgânica, os restos celulares e o resto de substâncias utilizadas na extração, como fenol, clorofórmio etc.
- Na recuperação do material genético teremos a precipitação do DNA. Nessa etapa, a precipitação ocorre, pois utilizamos o etanol absoluto ou o isopropanol gelado associado a uma solução com alta concentração de um sal catiônico. Diversos protocolos utilizam, além do etanol absoluto, o etanol 70% para realizar uma segunda “lavagem”

e, assim, retirar impurezas e sais que possam ter ficado na amostra. Sendo assim, os álcoois, além de concentrar o DNA, ajudam a remover resíduos de fenol e de clorofórmio que ficaram na amostra.

Após a precipitação e a remoção do álcool o DNA é ressuspenso em água ultrapura ou tampão com pH adequado, no qual o volume a ser adicionado e o tampão dependem do protocolo a ser utilizado.

Para cada tipo de amostra, vários protocolos podem ser testados, adaptados e otimizados, de maneira a se conseguir DNA de boa qualidade.

### *2.2.1 Principais métodos de extração de DNA e RNA*

A extração pode ser realizada por meio de kits comerciais ou soluções preparadas no laboratório, seguindo POPs (Procedimento Operacional Padrão). Existem diversas empresas que comercializam kits específicos para cada tipo de material a ser extraído, no qual o processo se baseia no uso de colunas com uma espécie de filtro no qual o material genético fica retido, até que seja eluído ao final do processo, e todos os restos celulares e materiais utilizados ficam em microtubos que são trocados a cada etapa.

Independentemente do método de extração, quando o objetivo é a obtenção do RNA, vários cuidados devem ser tomados para manter sua qualidade e integridade. A principal dificuldade encontrada é a presença de RNAses ativas e estáveis, que permitem a rápida degradação do material e, para que isso seja evitado, logo no início do processo deve-se adicionar um tampão de extração que auxilie na precipitação e mantenha o RNA intacto nas demais etapas.

Como escolher o tipo de extração? Isso dependerá, principalmente, do tipo de amostra a ser analisada, além do tempo, dos recursos financeiros e do laboratório.

## 2.3 Quantificação do DNA/RNA

Após a extração do material genético, é de suma importância a realização da quantificação do material extraído para a verificação da integridade do material e da sua concentração, utilizada no cálculo do volume de DNA/RNA que será adicionado ao mix de PCR para a realização da análise.

Essa etapa pode ser feita de três formas: por meio de um equipamento com espectrofotometria, que analisa a quantidade de luz que é absorvida pelo DNA/RNA nos espectros de 260 e 280nm, porém, não diferencia os ácidos nucleicos; por eletroforese em gel de agarose, um método que utiliza o padrão de peso molecular na avaliação; e com a utilização do fluorímetro, onde um material fluorescente se liga ao ácido nucleico. Além disso, este último é um método muito interessante, visto que a presença de proteínas não interfere na análise.

Quando métodos espectrofotométricos são utilizados podemos verificar o grau de pureza da solução, onde:

- DNA: Razão  $A_{260}/A_{280} \geq 1,75 - 1,80$ . Quando a razão for menor que 1,75, se concluímos que houve a contaminação com lipídeos ou proteínas.
- RNA: Razão  $A_{260}/A_{280} \sim 2,0$ . Quando a razão for menor que 2,0, se concluímos que houve contaminação com guanidina (da extração).
- Quando a razão for maior que 2,0, se concluímos que houve contaminação com fenol e/ou clorofórmio.

## 3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

### 3.1 Introdução

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada uma técnica de biologia molecular de importância revolucionária (LORENZ, 2012). Foi proposta e desenvolvida por Mullis, em 1983, que receberia o prêmio Nobel em química, dez anos mais tarde. A versatilidade e a relativa facilidade da metodologia possibilitaram avanços em diversas áreas, como genotipagem, detecção e identificação de microrganismos, identificação de polimorfismos, análise de diversidade genética em populações etc. (AGNE *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2013).

A PCR, essencialmente, possibilita a amplificação de sequências genômicas em amostras complexas e molecularmente heterogêneas, com alta sensibilidade e especificidade (TYRELL, 1997). Associada a métodos acessórios, como a extração e purificação de ácidos nucleicos, e a separação dos fragmentos genômicos obtidos em função do peso molecular, é possível desenvolver protocolos de alta eficiência e desempenho dentro dos objetivos propostos. Entretanto, para um aproveitamento ótimo da técnica, é necessário que cada fase do procedimento, desde a extração do material nucleico até a sua separação eletroquímica e a observação, seja devidamente adaptada, padronizada e protocolada de acordo com a amostra analisada e o objetivo final. Dada a variedade de reagentes, de equipamentos e de objetivos

envolvidos, a eficiência da técnica de PCR e a qualidade do material genético amplificado obtido estão em função do conhecimento prévio e da padronização adequada de cada etapa, além da correta interpretação do escopo geral do método.

### 3.2 Princípios

Como mencionado, a PCR consiste na multiplicação *in vitro* de determinada região do genoma de qualquer organismo, gerando milhões de cópias (TYRRELL, 1997). Tal amplificação facilita a análise genética desta porção, favorecendo métodos de detecção e diagnósticos baseados em ácidos nucleicos, com alta especificidade (dada a análise de uma sequência nucleotídica específica e previamente conhecida do genoma) e sensibilidade (já que um único fragmento da molécula original de DNA é multiplicado exponencialmente, gerando milhões de cópias).

Para tanto, o princípio da técnica se baseia na reprodução do processo de replicação do genoma que ocorre *in vivo*, se utilizando dos mesmos elementos essenciais que a célula utiliza para a replicação da molécula de ácido nucleico. Assim, os elementos básicos para a reação em cadeia da polimerase são:

- a. A amostra de DNA extraído e purificado, que contenha o segmento a ser amplificado, que está relacionada à fonte do material (qualquer tipo de material biológico que contenha material celular, que conterà o genoma a ser analisado). Geralmente armazenado em tampão Tris-EDTA após a extração. Concentração inicial ideal: 150 a 200ng/ $\mu$ L;
- b. Mistura de nucleotídeos (adenina, timina, guanina e citosina) em suas formas trifosfatadas livres – ou dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP, respectivamente) - em concentrações iguais, que serão inseridos nas novas cópias de DNA replicadas. A concentração definida pelo protocolo estará em função do tamanho do fragmento a ser amplificado e da

quantidade de ciclos da reação. Concentração ideal: 20 a 200 mM;

- c. Enzima *Taq* polimerase, enzima termoestável responsável pela síntese das novas fitas;

Concentração ideal: 1 (uma) UI

- d. Cloreto de magnésio, que serve como cofator para a enzima. Baixas concentrações de  $MgCl_2$  comprometem a atividade da enzima, enquanto concentrações excessivamente altas induzem a formação de dímeros de *primers*. Concentração ideal: 1 a 4 mM;

- e. (e) Par de iniciadores – ou *primers* – que são fragmentos de DNA sintetizados em laboratório, contendo sequências conhecidas que flanqueiem a região desejada, em ambos os sentidos da fita-alvo e, assim, delimitem a região de replicação. O tamanho ideal de um *primer* é de 18 a 30 bases, não devendo ser menor que 15, pelo risco de comprometer a especificidade do anelamento. Concentração ideal: Entre 0,1 e 0,5mM;

- f. (f) Solução tampão, que mantém o pH ótimo para a atividade enzimática e favorece a hibridização do *primer*.

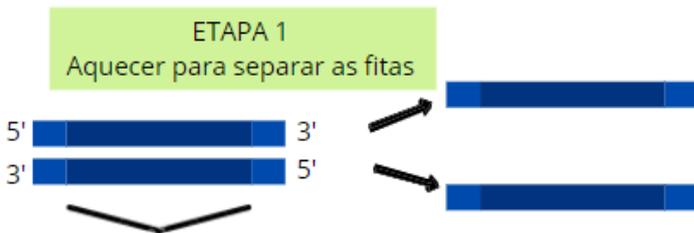
Após a devida extração, purificação e quantificação do DNA a partir da amostra original analisada, é preparada a mistura de reação – ou *mix* – contendo os elementos acima descritos. A mistura deve ser preparada com os tubos em estante resfriada, dentro de fluxo laminar, em uma sala especial, na qual não deve entrar qualquer tipo de amostra contendo DNA, extraído ou não (para evitar a contaminação do ambiente, dos reagentes, e dos equipamentos utilizados). A mistura deve ser preparada de acordo com protocolo previamente estabelecido, e os cálculos

de quantidades e concentrações dos reagentes de acordo com o número de amostras devem estar prontos de antemão. Após a preparação e devida alíquotagem do *mix* nos microtubos de reação (geralmente, microtubos de 0,2µL), eles devem ser levados para uma sala diferente, na qual serão inseridas as diferentes amostras de DNA extraído.

A reação em cadeia da polimerase se dá em um aparelho chamado termociclador. Este consiste em um bloco no qual são posicionados os microtubos, que é capaz de aquecer ou resfriar de acordo com o sentido da corrente elétrica aplicada. Assim, a reação é controlada e orientada pela variação da temperatura em dados períodos de tempo, já que cada platô de temperatura é ótimo para uma determinada etapa da reação. As fases da PCR podem ser divididas nas seguintes etapas fundamentais:

**Desnaturação** - Consiste no aumento da temperatura (a fim de romper as pontes de hidrogênio que unem as fitas de DNA contidas na solução), separando a dupla-fita em fitas únicas, conforme ilustrado na Figura 3.

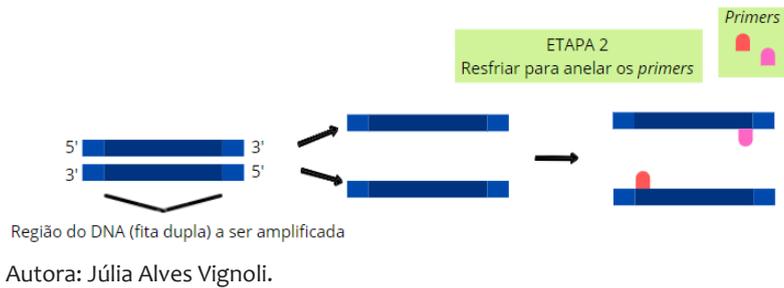
**Figura 3** - Separação das fitas de DNA por aquecimento



Autora: Júlia Alves Vignoli.

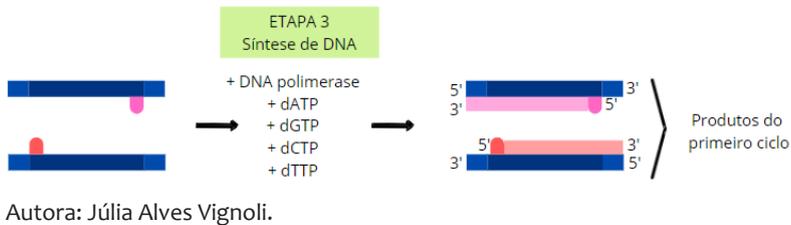
**Anelamento** – Nessa etapa, a temperatura é reduzida para a temperatura ótima de religação das pontes de hidrogênio. Assim, os *primers* podem se ligar às sequências-alvo na fita de DNA original, que servirá como molde para a nova fita, ilustrado na Figura 4.

**Figura 4** – Anelamento dos iniciadores



**Extensão** – Temperatura ótima de atividade da enzima *Taq* polimerase, promovendo, assim, a extensão do fragmento a partir do ponto em que o *primer* anelou na etapa anterior, conforme ilustrado na Figura 5.

**Figura 5** – Síntese de DNA



A desnaturação se dá entre 91 e 95°C, dependendo do protocolo utilizado e dura, geralmente, cerca de dois minutos. Algumas programações utilizam um período de tempo maior na etapa de desnaturação do primeiro ciclo, a fim de otimizar essa fase. Nessa etapa, tanto as moléculas de DNA da amostra analisada (inicialmente em concentração muito baixa) quanto dos *primers* (inicialmente em concentração muito mais alta que o DNA alvo), são separadas e têm seus sítios de ligação expostos.

Após um período de tempo em que uma quantidade ótima de moléculas foi separada, o termociclador reduz a temperatura, para iniciar a etapa de anelamento. A temperatura ótima de anelamento varia de acordo com o *primer* utilizado (geralmente entre 40 e 65°C, por cerca de um minuto e meio), e é informada pelo fabricante, bem como o tempo ideal para a duração dessa etapa. Nela, a temperatura favorece a religação das pontes de hidrogênio entre as moléculas. Dado que os *primers*, principalmente nos ciclos iniciais, estão em concentração muito maior do que as moléculas de DNA-alvo, estes se ligarão aos sítios específicos para os quais foram designados. Um componente do par de *primers* tem como alvo uma região específica, que antecede imediatamente a sequência-alvo na fita de DNA no sentido 5'-3' (*primer forward*), enquanto que o outro componente do par tem como alvo a região que antecede a mesma sequência, mas na fita complementar, ou seja, no sentido 3'-5' (*primer reverse*). Observe que são regiões diferentes do genoma e, portanto, o par não é complementar entre si.

A temperatura de anelamento pode ser calculada a partir de fórmulas, de acordo com o tamanho dos primers. Para iniciadores com até 20 nucleotídeos, utiliza-se primeiro a equação 1, fórmula de Wallace:

$$T_m = 2 \cdot (A+T) + [4 \cdot (C+G)] \quad (1)$$

Onde:

$T_m$ : melting temperature

A, T, C e G: quantidade de cada base correspondente.

Caso os iniciadores possuam mais de 20 nucleotídeos, a  $T_m$  deve ser calculada pelo método de Meinkoth e Wahl (equação 2)

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,66 (\log [\text{Na}^+]) + 0,41(\%GC) - (500/n) - [0,61 (\%FA)] \quad (2)$$

Onde:

[Na<sup>+</sup>]: concentração de íons de sódio

(%GC): porcentagem de bases G e C na cadeia do primer

n: número de nucleotídeos

(%FA): porcentagem de Formamida

Após estabelecer o valor de  $T_m$ , pode-se obter a  $T_a$  (temperatura de anelamento) a partir da equação 3.

$$T_a = T_m - (5^\circ\text{C}) \quad (3)$$

Em seguida, a temperatura é novamente elevada para, geralmente,  $72^\circ\text{C}$ , que é a temperatura ótima para acoplamento e ação da enzima *Taq* polimerase, que caracteriza a fase de extensão das fitas. Dado que o método de orientação e controle da reação é através da variação de temperatura, o ponto fundamental que permitiu a criação desta técnica foi a possibilidade de utilização de uma enzima termoestável, ou seja, que suportasse grandes variações de temperatura sem que perdesse sua função. Por isso se utiliza a enzima *Taq* polimerase (extraída de uma bactéria termofílica chamada de *Thermus aquaticus*), que suporta as altas temperaturas da reação sem desnaturar. A enzima necessita de uma extremidade -OH livre em uma porção de DNA dupla-fita para que se acople à molécula; para tanto, utiliza o fragmento *primer*/fita-molde, se ligando à extremidade -OH fornecida pelo *primer* e, após isso, inicia a extensão da molécula. Essa extensão se dá pela adição das moléculas de dNTP disponíveis no meio, de acordo com a base nitrogenada da fita molde. A extensão ocorre tanto nas fitas de sentido 5'-3', quanto nas de

sentido 3'-5', criando novas fitas na conformação de dupla-hélice, correspondente à região-alvo delimitada pelos *primers*. Os íons de magnésio fornecidos pelo cloreto de magnésio adicionado à mistura são utilizados pela enzima como cofator para a sua atividade de síntese da nova fita.

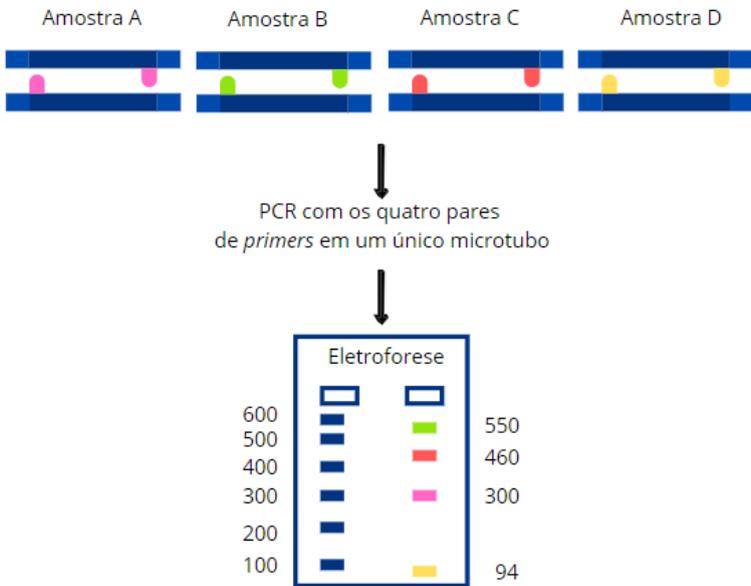
Ao término de um “ciclo” (desnaturação, anelamento e extensão), este é repetido várias vezes (de 35 a 40, de acordo com o protocolo), de modo que haja um aumento exponencial de moléculas, já que a cada ciclo o número de cópias da sequência-alvo é duplicado. Assim, ao final do processo, cada tubo conterá uma grande quantidade de DNA dupla-fita correspondente à região-alvo. O produto de uma reação de PCR é geralmente chamado de *amplicon*.

### 3.3 Variações da PCR

#### 3.3.1 PCR multiplex

A PCR *multiplex* é especialmente útil em estudos epidemiológicos, ou em ensaios que visem à diferenciação entre variantes de uma mesma espécie. Este modo utiliza dois ou mais pares de *primers*, em uma mesma reação. Os diferentes pares de *primers* terão como alvo regiões distintas do genoma, únicas e específicas para cada variante analisada, e devem gerar produtos de tamanhos moleculares distintos (de modo que não se confundam na visualização após a eletroforese), gerando padrões únicos e permitindo sua diferenciação. Exemplos de uso: *Escherichia coli*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Microsporium spp.*

**Figura 6** - Representação esquemática de uma corrida eletroforética após PCR multiplex com *primers* para quatro variantes de um dado organismo



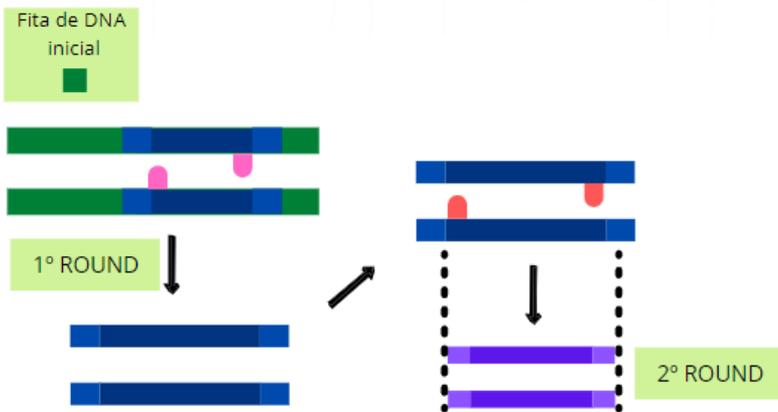
Autora: Júlia Alves Vignoli.

### 3.3.2 Nested-PCR

A PCR convencional, que utiliza apenas um par de *primers*, pode gerar centenas de milhões de cópias com especificidade considerável, como já mencionado. Entretanto, ainda assim, é possível que, em meio a tantas replicações e cópias, uma parte não desejada do genoma seja amplificada, comprometendo a qualidade do produto final. Isto se dá, principalmente, quando a sequência alvo é curta, e o *primer* se anela a sequências similares na fita inicial, dado que a especificidade da reação é definida pela especificidade do *primer*. A *nested-PCR* é uma variação da PCR convencional, com a finalidade de aumentar a sensibilidade e especificidade da reação e, assim, mitigar esta possibilidade de erro. Nessa modalidade são necessários dois pares de *primers*, um para cada etapa do processo. Na primeira etapa, o primeiro

par de *primers* (*primers* externos) amplificam uma sequência extensa, com um número conhecido de pares de bases. O segundo par (*primers* internos), que caracteriza a técnica, tem como alvo uma região dentro do produto do primeiro par, produzindo, por sua vez, um produto menor. Assim, se a primeira região a ser amplificada não for a desejada, a chance do segundo par gerar um produto é muito menor. Essas duas etapas podem ser realizadas concomitantemente (*nested-PCR*), ou separadamente (*semi-nested PCR*). Apesar de o benefício ser mais específico e sensível (a sensibilidade do *nested-PCR* pode ser até 100 vezes maior quando comparada à PCR convencional), a preparação e a execução da reação são mais demoradas. Exemplos de uso: Lentivírus de pequenos ruminantes, *Mycobacterium tuberculosis* e *Ureaplasma diversum*.

**Figura 7** – Representação dos dois rounds da *nested-PCR*, com a ação dos *primers* externos (1º round) e internos (2º round)



Autora: Júlia Alves Vignoli

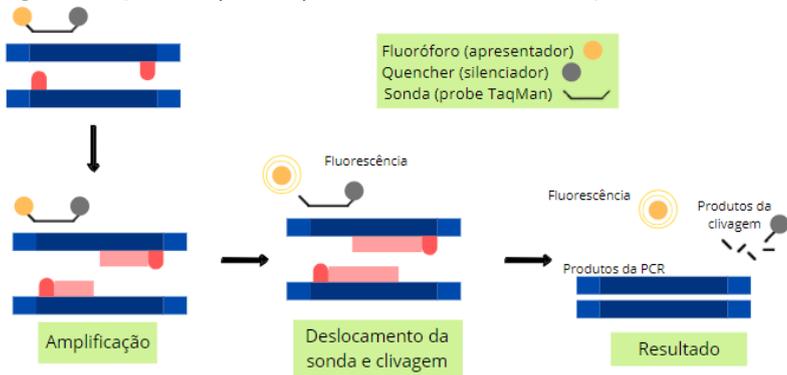
### 3.3.3 PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real (ou qPCR) permite que a reação seja monitorada em tempo real (sem necessidade da eletrofore-

se), bem como que a quantidade de ácido nucleico produzida seja quantificada, por meio da emissão e da captação de radiação fluorescente durante o processo. Para tanto, a qPCR utiliza um termociclador com um sistema óptico de captação da emissão de luz fluorescente, associado a um computador com um *software* que analisa e processa os dados durante e ao final da reação. Além disso, a qPCR utiliza um sistema de sondas de fluorescência, de modo que a quantidade de material gerado é diretamente proporcional à emissão de fluorescência, que pode ser quantificada com notável precisão.

Dois sistemas de fluorescência são majoritariamente utilizados: SYBR Green e TaqMan. O corante SYBR Green intercala em qualquer fragmento de DNA dupla-fita formado na solução, tanto do produto desejado, quanto do indesejado (como dímeros de *primers*), emitindo fluorescência a partir daí. A discriminação entre os sinais é feita por meio da análise da curva de dissociação (calculada a partir do ponto de *melting* da sonda). Já o sistema TaqMan, utiliza sondas que se anelam logo após o local de anelamento do *primer* na sequência alvo. As sondas são pequenas sequências de oligonucleotídeos sintética, contendo um corante apresentador (*reporter*), emissor de fluorescência, na extremidade 5', e um corante silenciador (*quencher*), que inibe a emissão de fluorescência por proximidade, na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* inibe a emissão de fluorescência do *reporter*. Quando a *Taq* polimerase se anela ao *primer* e cliva a sonda pela sua atividade endonucleásica, o *reporter* é separado do *quencher* e liberado no meio, emitindo, assim, sua fluorescência, que é captada e analisada pelo sistema óptico. Outros sistemas de detecção têm sido desenvolvidos e testados, a fim de obter um equilíbrio entre custo, praticidade e eficiência para otimizar a qPCR. Exemplos de uso: Detecção/quantificação de patógenos, detecção de mutações, expressão gênica (com RNA/cDNA).

Figura 8. Representação da ação do sistema de sondas TaqMan

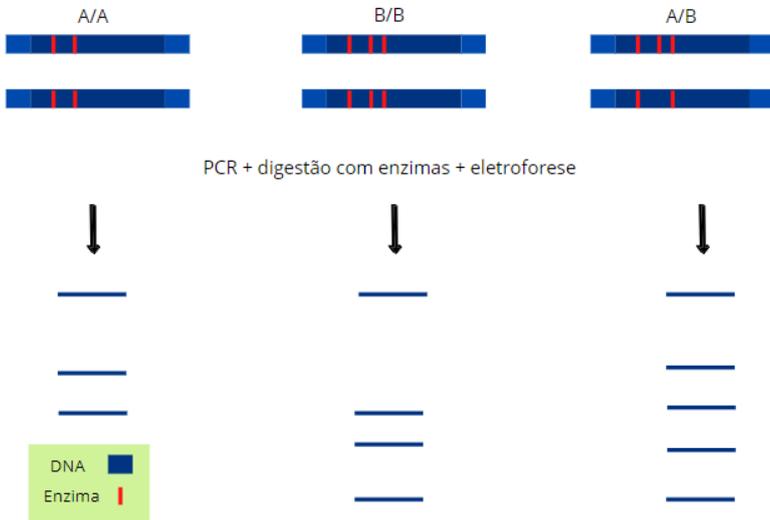


Autora: Júlia Alves Vignoli.

### 3.3.4 Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (Restriction-Fragment Length Polymorphism) – RFLP

A técnica do Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (*Restriction-Fragment Length Polymorphism* – RFLP) consiste na submissão prévia do DNA amostral a um conjunto de enzimas de restrição (que vão clivar a molécula de DNA em pontos específicos através do reconhecimento de sequências específicas de nucleotídeos), e posterior eletroforese. O RFLP permite diferenciar indivíduos pelo polimorfismo genético (diferenças genéticas herdadas entre indivíduos, com determinada incidência na população). A técnica explora essas diferenças, permitindo diferenciação *intra* e *interspecies*. A diferença entre os locais de clivagem de uma determinada endonuclease gerará fragmentos de tamanhos diferentes entre dois indivíduos; e o resultado final, com o genoma clivado em um número de fragmentos proporcional ao número de enzimas utilizadas, produzirá um padrão, que permitirá a comparação e diferenciação entre esses indivíduos. Exemplos de uso: mapeamento genômico, genotipagem, ciência forense.

**Figura 9** – Esquema de uma corrida eletroforética após RFLP, para identificação alélica com base no peso molecular dos fragmentos observados



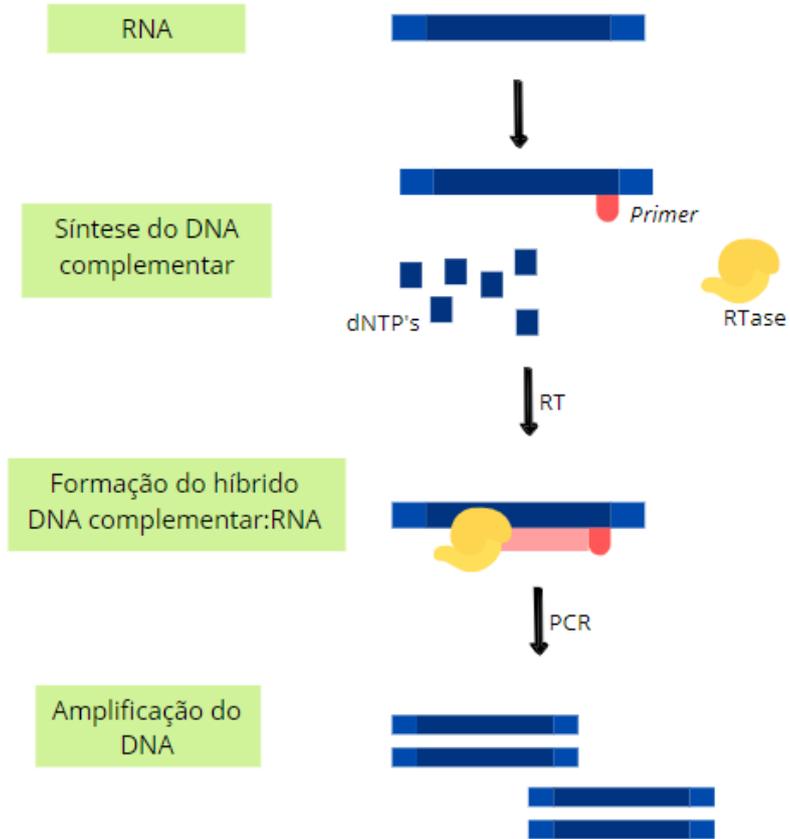
Autora: Júlia Alves Vignoli.

### 3.3.5 PCR de transcriptase reversa (Reverse Transcription) – RT-PCR

A PCR de transcriptase reversa (Reverse Transcription PCR), tal como a técnica convencional, tem como objetivo reproduzir *in vivo* a replicação do genoma original que, nesse caso, é RNA. A técnica utiliza a enzima transcriptase reversa para converter o RNA em cDNA. São utilizados *primers* que se anelam à fita de RNA, permitindo o acoplamento da transcriptase reversa. Após a síntese de cópias de cDNA a partir dos moldes de RNA, geralmente se utilizam enzimas que degradem seletivamente moléculas de RNA (geralmente RNase H) e, em seguida, se submete o produto à PCR convencional. O bom desempenho de um protocolo de RT-PCR está em função da seleção adequada dos diferentes tipos de *primers* disponíveis e da boa conservação da amostra (dado que o RNA é mais instável que o DNA e facilmente degradável), e geralmente é associado à técnica de qPCR.

Exemplos de uso: diversos vírus de RNA, e análise de expressão gênica (RNA mensageiro).

**Figura 10** - Representação esquemática da ação da enzima transcriptase reversa durante a RT-PCR, e subsequente submissão à PCR convencional



Autora: Júlia Alves Vignoli.

### 3.3.6 DNA polimórfico aleatoriamente amplificado (Random Amplified Polymorphic DNA) - RAPD

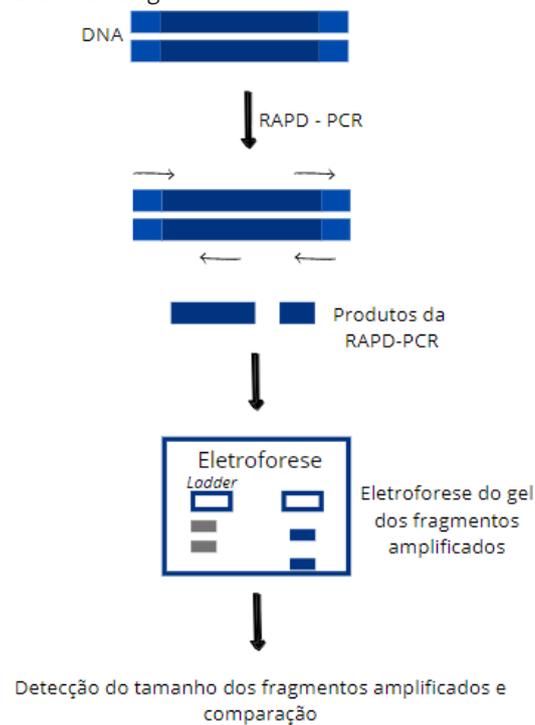
A PCR convencional apresenta um fator limitante que pode ser crítico em alguns casos: é necessário o conhecimento prévio

das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a região-alvo, para a confecção dos *primers*. No início da década de 1990 foi desenvolvida a RAPD (DNA polimórfico aleatoriamente amplificado – *Random Amplified Polymorphic DNA*), com o objetivo de contornar a necessidade do conhecimento prévio da sequência, possibilitando o uso da técnica em organismos sobre os quais se tinha pouco ou nenhum conhecimento sobre o seu genoma.

No RAPD, se utiliza apenas um *primer* (geralmente um decâmero) de sequência arbitrária, além de uma temperatura de anelamento mais baixa que a da PCR convencional. Isso faz com que a especificidade da reação diminua, de forma que um número maior de fragmentos reprodutíveis possa ser amplificado, de diferentes regiões do DNA alvo. Então, a amplificação ocorrerá em função da probabilidade de, após a desnaturação da dupla-fita, existir em algum lugar do genoma uma sequência exatamente complementar à do *primer* em uma das fitas, e a uma distância que possa ser percorrida pela polimerase, outra sequência também complementar a este *primer* na fita oposta. Quanto mais complexo o genoma analisado, maior a chance de a técnica funcionar. Por outro lado, pode não ocorrer o anelamento do *primer* com o DNA, com ausência de bandas na eletroforese.

Devido ao fato de vários oligonucleotídeos curtos poderem servir como “*primers*” dentro dessas condições, é possível montar um painel de candidatos a *primers* universais, de modo que possam detectar polimorfismos (principal objetivo do RAPD) diretamente, em praticamente qualquer organismo biológico. Exemplos de uso: estudos de mapeamento gênico, genética de populações e taxonomia molecular.

**Figura 11** – Representação teórica da RAPD, e a ação do primer sobre locais aleatórios do genoma



Autora: Júlia Alves Vignoli.

## 4 Obtenção e visualização dos resultados da PCR

### 4.1 Eletroforese

A eletroforese é descrita como o deslocamento de uma partícula eletricamente carregada sob um campo elétrico. Várias biomoléculas possuem grupos funcionais ionizáveis e, portanto, adquirem carga positiva ou negativa em um determinado valor de pH. Quando essas partículas são submetidas a um campo elétrico, elas migram para o cátodo (polo positivo) ou ânodo (polo negativo), dependendo de sua carga. Diante disso, um dos objetivos dessa técnica é separar as moléculas orgânicas de acordo com sua carga elétrica e seu volume molecular.

Entre as possibilidades de aplicação envolvem a quantificação de DNA em determinada amostra após extração, a detecção de proteínas defeituosas, e a análise da integridade dos ácidos nucleicos, possibilitando o diagnóstico de bioagentes, detecção de adulterações e fraudes de alimentos de origem animal, entre outros.

Uma das técnicas fundamentais utilizadas nos laboratórios de biologia molecular é a análise de DNA por eletroforese, a metodologia baseia-se no fato de a molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e consequentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao polo positivo (cátodo). A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Logo, por consequência, uma amostra aplicada à eletroforese terá cada uma de suas moléculas formantes localizadas em uma zona do gel, de forma que as moléculas com menor peso molecular vão migrar mais rápido do que as que possuem maior peso molecular. Usualmente, os modelos de eletroforese

mais usados são baseados em gel de agarose e gel de poliacrilamida.

A concentração de um dado gel está diretamente relacionada à densidade das tramas do polímero, de modo que um gel em uma concentração de 1% tem suas tramas distribuídas em densidade menor do que de um gel em concentração a 3%. Ou seja, quanto maior a concentração do gel, maior será a densidade da trama, e maior será a dificuldade de passagem de moléculas com alto peso molecular (Tabela 1).

**Tabela 1** – Relação entre concentração do gel de agarose em relação ao peso molecular das partículas do DNA

<b>Concentração do gel (w/v %)</b>	<b>Faixa de separação do DNA (Kb)</b>
<b>0,3</b>	5-60
<b>0,6</b>	1-20
<b>0,7</b>	0,8-10
<b>0,9</b>	0,5-7
<b>1,2</b>	0,5-6
<b>1.5</b>	0,2-3
<b>2.0</b>	0,1-2

Fonte: Dados de Sambrook e Russle (2001).

A escolha do polímero depende do tamanho e natureza dos fragmentos que se pretende analisar. O gel de agarose é o mais recomendado para separação de proteínas e ácidos nucleicos. Enquanto isso, o gel de poliacrilamida é recomendado para análises de alta resolução (sequenciamento de DNA ou RNA) ou para análises proteicas que exigem maior definição de bandas. É importante destacar que a poliacrilamida em solução é neurotóxica e seu preparo é mais demorado e trabalhoso, enquanto o gel de agarose é elaborado pela mistura de um tampão e agarose, não apresentando toxicidade.

Para que seja realizada uma eletroforese em gel de agarose,

são necessários dois componentes básicos: a própria molécula carregada e um campo elétrico (obtido por meio de uma fonte com corrente contínua). A cuba eletroforética, utilizada nessa técnica, possui dois polos contendo eletrodos que determinam os polos positivo e negativo em cada compartimento, e onde é adicionada uma solução tampão, que conduz eletricidade. As soluções mais comumente utilizadas são Tris-Acetato-EDTA (TAE) e Tris-Borato-EDTA (TBE), e alguns fatores importantes devem ser analisados nessa escolha. Enquanto o TAE apresenta melhores resultados para fragmentos grandes, o TBE atua melhor em fragmentos menores que 2kb. Além disso, a TAE é facilmente exaurida em corridas longas e de alta voltagem, o que torna o TBE mais indicado nesses casos. O borato possui importante ação na inibição enzimática, dessa forma, o TBE deve ser evitado quando se deseja purificar os ácidos nucleicos do gel. Os fragmentos de maior massa molecular se localizam na parte superior do gel, e os fragmentos de menor massa, que assim migram mais facilmente pelas tramas do gel em direção ao polo positivo, se encontram na parte inferior.

Para visualização das moléculas na forma de bandas eletroforéticas, são utilizados corantes específicos. No caso de moléculas de DNA e RNA, diversos sistemas de revelação de bandas são empregados. A coloração pode ser feita antes ou após a migração e é nessa etapa que se utiliza o corante (ou marcador), como o brometo de etídio ou outros corantes sintéticos, como o GelRed. O corante intercala-se entre as bases de DNA e fluoresce quando exposto à luz ultravioleta (UV), produzindo bandas brilhantes no gel. A adição do corante pode ser realizada diretamente no gel ou por meio da adição de um marcador ao DNA anteriormente à aplicação dele no gel, visualizados diretamente após a migração. Também pode ser realizada a coloração mergulhando-se o gel de agarose em uma solução com o intercalante de DNA. O método muito usual para visualização do DNA em géis de agarose é o brometo de etídio (EtBr). O EtBr se insere entre os pares de base do DNA, tornando possível vi-

sualizar através da emissão de fluorescência alaranjada sob a luz ultravioleta. Entretanto, é importante frisar que essa capacidade de ligação ao DNA torna-o um composto perigoso à saúde humana. O composto pode ocasionar alterações na estrutura do DNA, sendo considerado agente mutagênico, tóxico e provavelmente carcinogênico, sua manipulação deve ocorrer com muita cautela. Diante dos riscos, sua utilização precisa ser criteriosa, avaliando-se sua finalidade no processo e possíveis alternativas.

O GelRed é um corante extremamente estável e ambientalmente seguro projetado para substituir o EtBr. Consiste em um corante fluorescente de ácidos nucleicos ultrasensível, usado na coloração de ácidos nucleicos em géis de agarose ou gel de poliacrilamida. Pode ser usado em gel de agarose através do gel pré-moldado ou pós-coloração e em gel de poliacrilamida via gel pós-coloração. Outra vantagem desse corante, é que géis corados com GelRed não precisam ser descorados para posterior visualização. Também é compatível com manipulações de DNA, tais como a digestão com uma enzima de restrição, técnicas de *southern blotting* e clonagens.

A técnica de eletroforese pode ser dividida em três fases na rotina laboratorial que serão aqui explicadas, são elas: montagem, aplicação das amostras e visualização.

## 4.2 Preparo do gel

Agarose em pó é dissolvida e sua concentração é ajustada para separar os fragmentos de DNA presentes na amostra, em um dado volume de TAE ou TBE.

Para obtenção da porcentagem de gel de agarose em m/V, é utilizada a equação 4.

$$\% = m/V \quad (4)$$

Onde:

m: massa de agarose

V: volume final.

Por exemplo, para um gel de agarose 1% de 100mL, deve-se diluir 1 g de agarose em 100mL de TAE.

Em seguida, a solução de agarose e tampão é aquecida em micro-ondas até que fique homogênea e transparente. Aguarda-se, então, a diminuição da temperatura até aproximadamente 50°C e verte-se a solução em um molde específico para o preparo do gel. O uso da solução em temperaturas muito altas pode levar ao derretimento da cuba de eletroforese e causar extravasamento de líquidos.

Sobre a solução ainda morna coloca-se um pente que servirá como molde para produzir diversas cavidades (poços) no gel. Essas minúsculas cavidades não chegam a atravessar o gel e servirão como reservatórios nos quais as amostras de DNA serão aplicadas. Ao esfriar e polimerizar, a agarose fica com o aspecto turvo e com resistência diretamente proporcional à concentração de agarose utilizada.

Na cuba, o gel encontra-se entre fios de platina que atuam como cátodo e ânodo provocando a passagem de corrente elétrica gerada por uma fonte de eletricidade. Adiciona-se o mesmo tampão usado para fundir a agarose em quantidade suficiente para que o gel fique totalmente imerso tomando-se o cuidado para que o nível de tampão fique pelo menos 1mm acima do gel. A seguir retira-se cuidadosamente o pente.

### 4.3 Aplicação de amostras

Nesta etapa, as amostras de DNA devem ser combinadas a um tampão de amostra. O tampão contém corantes e reagentes de alta densidade (sacarose, glicerol ou ficol). O uso de corantes, tais como o azul de bromofenol e o xilenocianol além de facilitar

a aplicação da amostra no gel, auxilia no monitoramento da corrida eletroforética, uma vez que apresenta velocidade conhecida durante a migração na matriz em direção ao polo positivo. Já os reagentes de alta densidade, asseguram que a amostra de DNA entre no poço pela força da gravidade.

Para permitir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA de uma amostra é necessário aplicar em um dos poços o marcador de massa molecular (usualmente chamado de “*ladder*”). O *ladder* é uma mistura de diversos fragmentos de DNA de tamanhos e concentrações conhecidos, gerados a partir da digestão de plasmídeos (tipo de DNA circular presente em bactérias) com enzimas de restrição. Ele permite inferir, por comparação, o tamanho dos fragmentos presentes na amostra analisada.

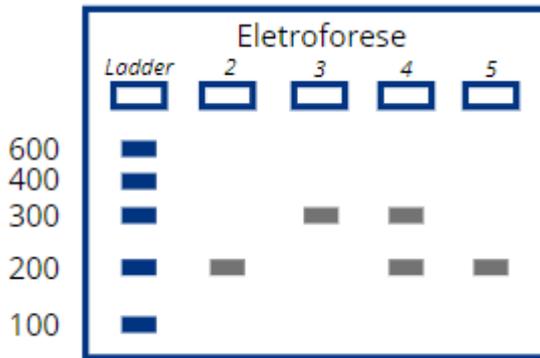
#### 4.4 Visualização do resultado

Ao fim da corrida eletroforética, o gel com corante é colocado no transiluminador UV. Os fragmentos corados emitem uma luz fluorescente e é possível visualizar as bandas (*amplicons*), que são registradas por meio de foto documentadores. Assim, as bandas observadas são comparadas ao padrão de peso molecular (*ladder*) previamente adicionado no gel e mensuradas. A unidade de medida utilizada na mensuração é a quantidade de pares de bases nitrogenadas (pb) dos fragmentos daquela posição. Quando utilizado, por exemplo, um padrão de 100pb, entende-se que o padrão inoculado naquele poço formará bandas em uma escala de 100pb (100pb, 200pb, 300pb etc.); assim, por comparação com a banda analisada, estima-se o tamanho aproximado dos fragmentos contidos naquela posição.

Uma vez que os fragmentos tenham sido separados, podemos examinar o gel e ver quais tamanhos de faixas são encontrados. Quando um gel é pigmentado com um corante que se liga ao DNA e depois colocado sob luz UV, os fragmentos de DNA brilham, o que nos permite visualizar o DNA presente em

diferentes locais ao longo da extensão do gel. Uma “linha” bem definida de DNA em um gel é chamada de banda. Cada banda contém um grande número de fragmentos de DNA do mesmo tamanho e todos os que viajaram, como um grupo, para a mesma posição. Ao comparar as bandas em uma amostra ao *ladder*, podemos determinar os tamanhos aproximados. A Figura 12 traz uma representação esquemática de interpretação de gel.

Figura 12. Interpretação de um gel de eletroforese



Autora: Júlia Alves Vignoli.

No primeiro poço (poço 1) encontra-se o *ladder*, marcador molecular, demonstrando suas bandas de acordo com os pares de base. Após este poço, temos o poço número “2”. Nele podemos observar apenas uma banda definida na altura da marcação de 200pb do *ladder*, semelhante à amostra 5. Já na amostra 3, observa-se uma banda na altura de 300pb e, na amostra 4, bandas presentes na altura de 200 e 300pb.

## 5 Guia de resolução de problemas

O guia de resoluções apresentado na Quadro 1 é básico, tem como objetivo apenas orientar a respeito de possíveis problemas que possam afetar a qualidade da PCR. As questões aqui apresentadas podem ter origens mais complexas do que as descritas.

Sempre discuta os resultados, incluindo os negativos, com o grupo de pesquisa e com pessoas mais experientes. Busque se informar e se atualizar pela literatura, tanto a respeito da técnica, quanto a respeito do seu objeto de estudo. E, principalmente, sempre cheque, analise e estude o protocolo.

**Quadro 1** – Resolução de problemas encontrados com frequência durante a execução de técnicas de biologia molecular

Problema	Possível Causa	Ação
Sem banda no gel.	Número insuficiente de ciclos.	- Aumente o número de ciclos de 5 em 5.
	Amostra degradada.	- Quantifique a amostra mãe, e/ou refaça a extração.
	Temperatura de anelamento alta demais	- A temperatura de anelamento ideal são 5°C abaixo da temperatura de anelamento do <i>primer</i> . Cheque a bula para conferir, e diminua de 5 em 5°C.
	Temperatura de desnaturação baixa demais	- Cheque se a temperatura de desnaturação não está abaixo dos 85°C. Faça testes com aumentos de 2 ou 3 °C.
	Tempo de extensão curto demais	- Revise o tempo de extensão caso o fragmento desejado seja longo demais.
	Problemas na extração	- Revise o protocolo e método de extração e, se necessário, refaça. - Procure publicações para saber se o método utilizado é o ideal para a natureza da sua amostra.
	Omissão de componentes	- Faça um checklist para ter certeza de que não se esqueceu de nenhum reagente no <i>mix</i> .
	Concentração de <i>primers</i> baixa demais	- Cheque se está dentro dos padrões, ou se foi diluído corretamente.
	Concentração de MgCl <sub>2</sub> baixa demais	- Cheque se a concentração está no intervalo adequado. Aumente em 0.5mM e refaça a reação.
	Reagentes comprometidos	- Cheque a validade dos reagentes. - Evite descongelamentos desnecessários dos componentes, e certifique-se de que descongelaram totalmente antes da pipetagem.
	Problemas no desenho dos <i>primers</i>	Cheque as regras gerais de desenhos de <i>primers</i> : - Tamanho entre 18 e 30 nucleotídeos, - Conteúdo GC entre 40 e 60% e; - A diferença entre as temperaturas de <i>melting</i> de cada <i>primer</i> não deve ser maior que 5°C.
	Amostra insuficiente	- Titule o DNA extraído e verifique se está na concentração ideal.
	Mau Funcionamento do termociclador	- Verifique se o aparelho de fato terminou as ciclagens, se escolheu o programa correto, e de que não houve picos de energia. - Se possível, solicite o teste de calibração do bloco. - Use um termociclador diferente.

Bandas extras indesejadas ou inespecíficas, de peso intermediário ou alto	Primers anelaram em um local secundário do DNA	- Identifique a região e desenhe primers que sejam menos específicos para este sítio secundário. - Aumente a temperatura de anelamento de 2 a 5°C.
	Contaminação dos primers ou do tampão	- Certifique-se de sempre utilizar um controle negativo. Caso haja contaminação, prepare novos reagentes.
	Concentração de primers alta demais	- Cheque se os primers foram preparados e/ou ressuspensos na concentração ideal. Quantifique, se necessário.
	Excesso de amostra	- Quantifique sua amostra extraída, e certifique-se de que está no intervalo de concentração adequado.
Bandas extras de baixo peso	Dímeros de primers	- Verifique se a concentração de primers utilizada não está alta demais. - Se forem suficientes para atrapalhar a visualização do produto, desenhe primers maiores, evitando extremidades com excessos de G/C. - Verifique se os primers desenhados não são coincidentemente complementares entre si.
Excesso de manchas ou rastro na corrida	Número exagerado de ciclos	Reduza o número de ciclos para 35.
	Concentração de primers alta demais	- Cheque se os primers foram preparados e/ou ressuspensos na concentração ideal. Quantifique, se necessário.
	Tempo de extensão alto demais	- Diminua o tempo de extensão pouco a pouco.
	Excesso de amostra no gel	- Refaça a eletroforese com menos volume.
	Má qualidade da amostra	- DNA impuro ou degradado pode não amplificar adequadamente; - Certifique-se de trabalhar com DNA recentemente extraído.
Falsos positivos	Problemas no desenho dos primers	- Evite primers com sequências complementares, ou autocomplementares. Isso favorece a formação de dímeros de primers, e a auto-oligomerização e subsequente amplificação do primer em si.
	Contaminação cruzada	- Tome as medidas de precaução ao pipetar as amostras, para evitar a contaminação entre amostras e controles.
	Contaminação carreada	- Use ponteiras com filtro durante as pipetagens de DNA, e tome as medidas adequadas de descontaminação do ambiente de trabalho.

Fonte: Elaboração própria.

## 6 Referências bibliográficas

AGNE, M. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 1-11, 2009.

ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BRAMMER, S.P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. *Documentos Online Embrapa*, n. 6, dez. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. *Classificação de riscos dos agentes biológicos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

CARNEIRO, A.C.A.V. et al. Genetic characterization of toxoplasma gondii revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 901-907, mar. 2013.

CARNIELLO, R.; SILVA, R.; FIORINI, A. Descontaminação de resíduos de brometo de etídio gerados em procedimentos de biologia molecular. In: MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO CESUMAR, 4., 20-24 out. 2008, Maringá. *Anais...* Maringá: CESUMAR, 2008.

CARR, J.; WILLIAMS, D.G.; HAYDEN, R.T. Molecular detection of multiple respiratory viruses. In: GRODY, W.W. et al. (eds.). *Molecular diagnostics: techniques and applications for the clinical laboratory*. Amsterdam: Elsevier; Academic Press, 2010, p. 289-300.

FLORES, N. *et al.* Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. *Biotechniques*, v. 13, n. 2, p. 203-205, 1992.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ. Biossegurança. *Portal da FIOCRUZ*, 2020. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/biosseguranca>. Acesso em: 30 jun. 2020.

\_\_\_\_\_. Glossário em Biossegurança. *Portal da FIOCRUZ*, S.d. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/glossario/Glossario.htm>. Acesso em: 6 ago. 2020.

KHAN ACADEMY. Eletroforese em gel. *Khan Academy*, S.d. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>. Acesso em: 30 jun. 2020.

LORENZ, T.C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, n. 63, e3998, 2012.

MADIGAN, M.T. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*, v. 3. Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.

OLIVEIRA, M.C.S. *et al.* *Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. *Manual de segurança biológica em laboratório*. Genebra: OMS, 2004.

PARANÁ. Secretaria de Saúde. Laboratório Central – LACEN. Biossegurança. LACEN, 2020. Disponível em: <http://www.lacen.saude.pr.gov.br/arquivos/File/macrorregionais/Biosseg.pdf>. Acesso em: 18 maio 2020.

PIERCE, B.A. *Genética: um enfoque conceitual*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016

REINIGER, L.R.S. *et al.* Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. *Ciência Rural*, v. 34, n. 5, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SCHAEFER, R. *Técnicas em biologia molecular*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006.

- TYRRELL, D.A.J. Polymerase chain Reaction. *BMJ*, v. 324, n. 4, p. 4-9, 1997.
- UNISCIENCE. Gelred: Biotium. *Uniscience*, 2020. Disponível em: <http://uniscience.com.br/produto/gelred-biotium-concentrado>. Acesso em: 25 maio 2020.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP. Museu de Zoologia. Normas gerais do Laboratório de Biologia Molecular (BioMol). *Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*, 2019. Disponível em: <http://mz.usp.br/wp-content/uploads/2019/11/Normas-BioMol-MZUSP.pdf>. Acesso em: 28 jun.2020.
- VIEIRA, D.P. *Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações*. S.d. Mimeografado. Disponível em: <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/protocologos/aula1.pdf>. Acesso em: 25 maio 2020.
- WALKER, M.R.; RAPPLEY, R. *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Atheneu Editora, 1999.
- WILSON, K.; WALKER, J. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7. ed. New York: Cambridge University Press, 2005.
- YUNG-SHARP, D; KUMAR, R. Protocols for the visualization of DNA in electrophoretic gels by a safe and inexpensive alternative to ethidium bromide. *Technique*, v. 1, n 3, p. 183-187, 1989.

