

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CARLOS ELISANDRO CAVALHEIRO MOREIRA

**SISTEMA PARA ANÁLISE DA POLIMERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS NA
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

São Gabriel

2017

CARLOS ELISANDRO CAVALHEIRO MOREIRA

**SISTEMA PARA ANÁLISE DA POLIMERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS NA
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Campus São Gabriel da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial à obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Doutor Andrés Delgado Cañedo

São Gabriel

2017

CARLOS ELISANDRO CAVALHEIRO MOREIRA

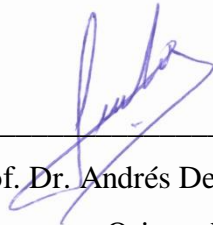
**SISTEMA PARA ANÁLISE DA POLIMERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS NA
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Campus São Gabriel da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial à obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Doutor Andrés Delgado Cañedo

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 14 de novembro de 2017

Banca examinadora



Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

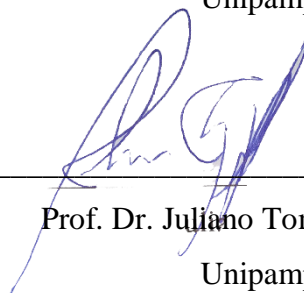
Orientador

Unipampa



Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres

Unipampa



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Unipampa

RESUMO

A biologia molecular tem tido um grande avanço nos últimos anos, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR), um destes avanços. Nesta técnica, obtêm-se várias cópias do fragmento desejado a partir de uma pequena quantidade de ácido desoxirribonucleico (DNA) inicial. A PCR em tempo real, uma variante da PCR convencional, é uma técnica usada como um método de diagnóstico molecular quantitativo nas áreas de investigação médica, forense e biotecnológica, por sua rapidez, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Este trabalho tem como objetivo desenhar um sistema para avaliar em tempo real a polimerização de uma determinada molécula de DNA utilizando um termociclador de PCR em tempo real. No modelo aqui utilizado, foi gerado um fragmento de 2.040 pares de bases (conteúdo citosina/guanina de 52%) por PCR, usando como molde o plasmídeo pCR-bicolor. O fragmento amplificado possui uma sequência universal T7 numa das extremidades e uma sequência universal M13 na outra. Desta forma, após reamplificação do fragmento de PCR foi adicionado 6-carboxi-fluoresceína (FAM) na extremidade T7 e uma molécula de biotina na extremidade M13. Posteriormente, o DNA contendo biotina foi ligado a partículas magnéticas recobertas por estreptavidina, e a dupla fita foi desnaturada em solução alcalina, mantendo uma fita ligada a partícula e outra na solução alcalina. Ambas as fitas foram separadas e submetidas a análise do alongamento da fita complementar por PCR. Inicialmente, os resultados obtidos das partículas e da fita neutralizada, foram insuficientes para o sistema planejado. As partículas magnéticas precipitam na reação, diminuindo a disponibilidade dos reagentes para a amplificação da fita complementar. Outro fator importante, é que a ligação da fita de DNA às partículas se desfaz com a temperatura do processo de alongamento, impossibilitando o uso da mesma partícula para um novo processo. Na fita neutralizada foi possível analisar a polimerização, mas o acetato de sódio produzido na neutralização, é um inibidor da enzima catalisadora da reação. Além disso, existe uma baixa quantidade de material simples fita obtido, pela eficiência das partículas serem inversamente proporcionais ao tamanho do fragmento purificado. Concluiu-se que o sistema testado até o presente momento é inviável com o uso das partículas, e com a fita neutralizada exige a necessidade de mais estudos. Uma alternativa para viabilizar o processo poderia ser a obtenção de material simples fita a partir de DNA extraído do bacteriófago M13 ou a purificação do DNA biotinilado das partículas magnéticas.

Palavras-chave: Concentração nucleotídica. Biologia molecular. DNA polimerase. Partículas magnéticas. PCR em tempo real.

ABSTRACT

In recent years, molecular biology has undergone major advances, being the polymerase chain reaction (PCR) one of them. In this technique, several copies of the desired fragment are obtained from a small amount of deoxyribonucleic acid (DNA). Real-time PCR, a variant of conventional PCR, is a technique used as a quantitative molecular diagnosis method in medical, forensic and biotechnological research, because of its speed, sensitivity, specificity and reproducibility. This work aims to design a system to evaluate, in real time, the polymerization of a specific DNA molecule using a real time PCR thermocycler. In our model, we used a 2.040 base pair fragment (cytosine-guanine content of 52%) that was generated by PCR using the plasmid pCR-bicolor as template. The amplified fragment has a T7 universal sequence at one end and a universal sequence M13 at the other. Thus, after reamplification of the PCR fragment, a 6-carboxy-fluorescein (FAM) at the T7 end and a biotin molecule at the M13 end were added. Subsequently, the biotinylated DNA was ligated on streptavidin-coated magnetic beads and the double strand was denatured in alkaline solution, keeping one strand attached to particle and another in the alkaline solution. Both strands were separated and subjected to elongation analysis of the complementary strand. Initially, the results obtained from the beads and the neutralized strand, were unsatisfactory for the planned system. The magnetic beads precipitate in the reaction, decreasing the availability of the reagents for the amplification of the complementary strand. Another important factor is that the binding of the DNA strand to the beads dissolves with the temperature of the elongation process, which makes it impossible to use the same bead for a new process. In the neutralized strand was possible to analyze the polymerization, but the sodium acetate produced in the neutralization is an inhibitor of the reaction catalytic enzyme. In addition, there is a low amount of single strand material obtained because the efficiency of the beads is inversely proportional to the size of the purified fragment. It was concluded that the system tested to date is not feasible with the use of the beads, and with the neutralized strand requires the need for further studies. An alternative to render the process feasible could be to obtain simple strand material from DNA extracted from bacteriophage M13 or a purification of the biotinylated DNA of the magnetic beads.

Keywords: Nucleotide Concentration. Molecular biology. DNA polymerase. Magnetic beads. Real-time PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	06
1.1 Ácido desoxirribonucleico	06
1.2 Purificação de DNA biotilado	07
1.3 Métodos de detecção do DNA	09
1.3.1 Reação em cadeia da polimerase	09
1.3.2 PCR em tempo real	10
1.4 Componentes da PCR	14
1.5 Padronização da PCR	17
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Amplificação do fragmento	19
3.2 Biotinilização da amostra pela PCR	20
3.3 Purificação da simples fita da amostra	20
3.4 PCR em partículas contendo a simples fita biotilada	21
3.5 Geração da segunda fita em DNA simples fita purificado	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	37

1 INTRODUÇÃO

O nosso planeta é habitado por muitos organismos, uma extensa variedade de formas, cores e habitats, mas são muito semelhantes em seu interior. Todos os organismos são fábricas químicas organizadas de forma complexa que utilizam a matéria-prima a sua volta para gerar cópias de si mesmos. Antigamente, os pesquisadores acreditavam que todos as “coisas vivas” tinham algo em comum, mesmo não tendo conhecimento a respeito de células ou de ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* – DNA). Atualmente, estima-se que exista mais de dez milhões de espécies que habitam nosso planeta, mas todas armazenam suas informações hereditárias em moléculas de ácidos nucleicos (ALBERTS et al., 2010).

Nesses últimos 50 anos, o conhecimento da estrutura e função da molécula de DNA trouxe uma grande necessidade por métodos que permitissem o estudo dessa molécula. Os pesquisadores produziram diversas técnicas para purificar, amplificar e quantificar o DNA de forma rápida, fiável e específica. Dentre as técnicas que surgiram, podemos destacar as purificações por coluna de sílica e partículas magnéticas, e a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) e suas variações, como a PCR em tempo real. A PCR em tempo real faz uma quantificação através do uso de corantes, que permite avaliar a amplificação da amostra ciclo após ciclo (MACKAY, 2007).

Na PCR, cada amostra possui uma composição diferente, fazendo com que amostras diferentes necessitem de um protocolo otimizado para ela. Um protocolo errado pode acarretar em falsos positivos ou negativos, perdendo a especificidade da técnica (VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

1.1 Ácido desoxirribonucleico

No final do século XIX, foi descoberto que as informações hereditárias estavam contidas nos cromossomos, uma estrutura presente no núcleo de células eucarióticas e nas células procariontes dispersas no citoplasma. Na década de 1940, foi descoberto que os cromossomos são compostos por DNA e proteínas, e através de estudos de hereditariedade em bactérias foi mostrado que o DNA era o provável portador das informações hereditárias. Ele foi considerado o portador das informações hereditárias quando a sua estrutura foi determinada por James Watson e Francis Crick, em 1953 (ALBERTS et al., 2010).

O DNA, tanto de um tigre ou de uma goiabeira, é formado por monômeros, chamados desoxirribonucleotídeos, ordenados em uma sequência linear. A sequência dos quatro

nucleotídeos que formam o DNA codificam a informação genética e são constituídos de três partes, sendo um açúcar (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base, que pode ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) ou timina (T). Cada monômero está ligado ao próximo através do grupo fosfato por ligações fosfodiéster, criando um polímero que apresenta um esqueleto formado por açúcar e fosfato (ALBERTS et al., 2010).

A síntese do DNA ocorre através de um molde de uma fita de DNA preexistente, por complementariedade de bases nitrogenadas, onde a adenina liga-se apenas com a timina, e a citosina com a guanina. Assim, controlando a seleção de qual monômero será adicionado na fita crescente (ALBERTS et al., 2010). A ligação de um nucleotídeo a outro na cadeia em extensão ocorre pela ação nucleofílica da hidroxila da pentose (3'-OH) com o fosfato α , liberando um íon difosfato (OLIVEIRA, M. et al., 2007).

1.2 Purificação de DNA biotilado

A purificação de ácidos nucleicos é muito importante, pois proporciona uma alta eficiência de amplificação na PCR (OLIVEIRA, M. et al., 2007). O processo de purificação remove as moléculas contaminantes do DNA que reduzem ou inibem a PCR, além de produzir uma solução estável que não degrade ao longo do tempo de armazenamento da amostra (STRAY et al., 2013).

A purificação com partículas magnéticas é um método que se baseia na ligação do DNA com as partículas magnéticas em solução, incubando por um tempo para formar um complexo. O complexo DNA-partículas magnéticas são separadas da solução por um ímã, e após esse complexo é desfeito, sendo as partículas descartadas e o DNA eluído (BARBARO; CORMACI; AGOSTINO, 2009).

Os métodos de fase sólida, como as partículas magnéticas, obtêm um DNA mais puro e livre de inibidores da PCR, quando comparado com métodos com compostos orgânicos (BARBARO; CORMACI; AGOSTINO, 2009; DAVOREN et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2009), e não utilizam reagentes tóxicos (fenol-clorofórmio) (BARBARO; CORMACI; AGOSTINO, 2009; BREVNOV et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2009).

As partículas magnéticas são formadas normalmente por óxido de ferro, material que possui alta propriedade magnética, não é tóxico e tem maior estabilidade oxidativa, em sistemas aquoso e não aquosos, quando comparado com outros materiais (CHOMOUCKA et al., 2010; WEISSLEDER et al., 1989). Existem dezesseis fases puras conhecidas de óxido de ferro, os óxidos hematita, magnemita, magnetita; os hidróxidos como hidróxido de ferro (III) e hidróxido

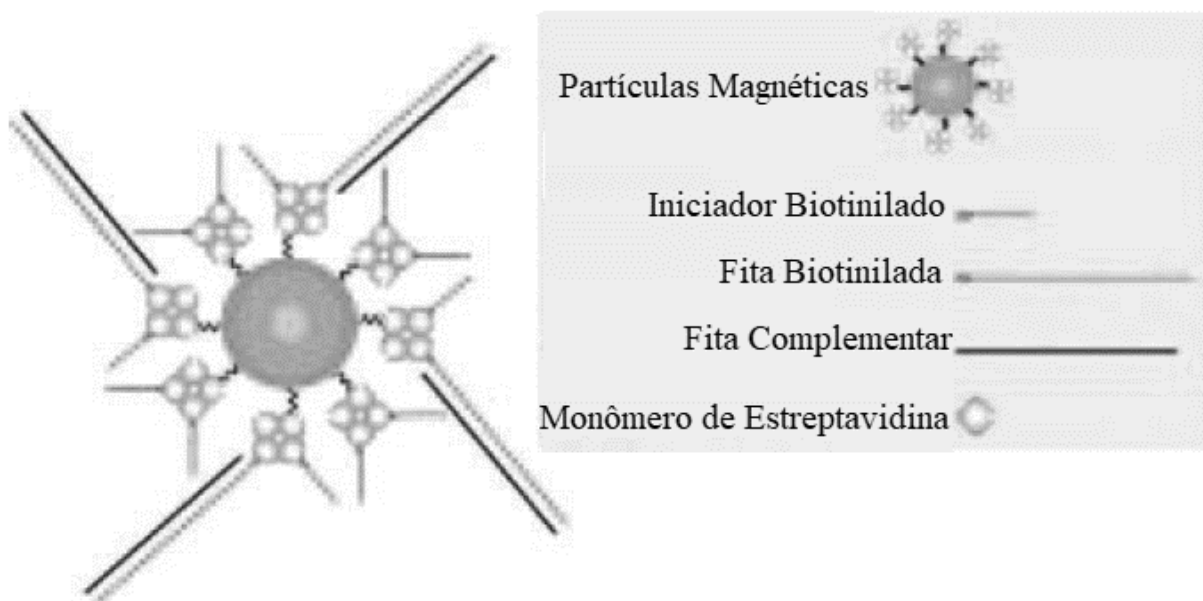
de ferro (II) e os oxihidróxidos como geotita, ferrihidrita e lepidrococita (RAMIMOGHADAM; BAGHERI; HAMID, 2014).

Dentre eles, a magnetita (ϵ -Fe₂O₃, Fe₃O₄) é o mais usado em aplicações biológicas (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003; TUCEK; ZBORIL; PETRIDIS, 2006; ZBORIL; MASHLAN; PETRIDIS, 2002), por possuir uma estrutura cristalina espinélio inversa, com uma célula unitária cúbica de face centrada com comprimento de 0.839 nm e 32 átomos de oxigênio. A sua estrutura cristalina cúbica, possui cor preta e tem a particularidade de conter tanto os íons Fe²⁺ e Fe³⁺, responsáveis pelo seu magnetismo (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003).

O sistema mais utilizado é a ligação entre estreptavidina e a biotina, por ser considerada como a mais forte interação não covalente biológica conhecida, com uma constante de dissociação na ordem de 4×10^{-14} M (GREEN, 1990). A biotina é uma vitamina encontrada em todas as células, enquanto a estreptavidina é um homólogo bacteriano da proteína avidina, encontrada na clara do ovo, isolada da bactéria *Streptomyces avidinii* (WEBER et al., 1989).

As partículas magnéticas são recobertas por tetrâmeros de estreptavidina, que se ligam as moléculas biotiniladas em solução (Figura 1). As moléculas biotiniladas ficam retidas nas partículas, que são separadas por campo magnético, e ocorre a eliminação de contaminantes e inibidores da PCR através de lavagens (MARTINS, 2007).

Figura 1 – Ligação das moléculas biotiniladas as partículas magnéticas



Fonte: Wilson (2011) adaptado

As partículas têm altos valores de magnetização, não são tóxicas e permitem o acoplamento de muitas moléculas alvo, e mesmo após as modificações de sua superfície são menores se comparado a uma célula (10-100 μm) (LYON et al.,2004; PANKHURST et al.,2003). Elas vêm sendo usadas para muitas amostras biológicas, proteínas e ácidos nucleicos, porque todo o processo é feito dentro de apenas um tubo, diminuindo o tempo de execução e material necessário, e não necessitando de equipamentos como centrífuga ou filtros (GAO; RUSSELL; LI, 2012).

1.3 Métodos de detecção do DNA

As primeiras técnicas para detecção de DNA eram baseadas em ensaios de hibridização, que apresentavam sensibilidade, fiabilidade e rapidez, mas possuíam um problema: necessitavam de sondas radioativas. Essas sondas causavam problemas para a saúde do pesquisador e requeriam autorizações legais. A segunda geração de métodos de detecção por hibridização era baseada em materiais não radiativos, mas não apresentavam boa sensibilidade quando comparada ao primeiro sistema. Com a PCR, a limitação de sensibilidade e toxicidade foram solucionadas, pois essa técnica possui uma sensibilidade alta e não necessita do uso de reagentes tóxicos (VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

1.3.1 Reação em cadeia da polimerase

A PCR foi inventada em 1983, pelo químico americano Kary Mullis (SAIKI et al., 1985). Nessa técnica, o DNA é multiplicado artificialmente através de vários ciclos iguais, numa reação catalisada por uma DNA polimerase. A molécula alvo de DNA sofre uma amplificação exponencial de síntese, que mimetiza uma replicação de um microrganismo vivo. Ela é um método rápido e eficiente para obter-se uma amplificação de sequências específicas, pois pequenas quantidades da molécula alvo são amplificadas milhões de vezes em poucas horas. Essas qualidades fazem com que a técnica seja usada para detecção de marcadores genéticos em doenças infecciosas e genéticas, câncer, mapeamento gênico, clonagem de genes, teste de paternidade e na construção de árvores filogenéticas (MACKAY, 2007; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

O protocolo da reação é dividido em três partes, a fase de desnaturação, a fase de hibridização e a fase de extensão. Na fase de desnaturação, a dupla hélice de DNA é desnaturada por calor, com temperatura em torno de 92 °C a 96 °C durante 1 a 9 minutos (dependendo do

conteúdo C+G da sequência alvo), formando duas fitas separadas. Na fase de hibridização, ocorre a hibridização das sequências iniciadoras, e a temperatura muda conforme as sequências, normalmente entre 35 °C e 70 °C durante 20 a 60 segundos. A sequência iniciadora possui alta especificidade ao alvo, delimitando os pontos inicial e final da amplificação das cópias de DNA sintetizadas. Uma baixa temperatura nessa fase aumenta a ocorrência de hibridizações inespecíficas, e uma alta diminui o rendimento da reação. Na última fase, a temperatura é elevada a 72 °C por um tempo de aproximadamente 1 minuto por 1.000 pares de bases (kb), pois a máxima eficiência da *Taq* DNA polimerase se encontra nessa temperatura. A velocidade da enzima é cerca de 24 nucleotídeos por segundo, variando com a eficiência da enzima selecionada. Assim, o tempo nessa fase depende da enzima e do tamanho do fragmento, quanto mais pares de base o fragmento alvo possui, maior é o tempo necessário. A enzima reconhece as sequências iniciadoras e liga-se a elas na extremidade 3', sintetizando a cadeia complementar da fita com os nucleotídeos trifosfatos (dNTP's). No final de cada ciclo completo, duas novas cadeias são sintetizadas a partir de cada fita da dupla fita, o que leva ao crescimento exponencial a cada ciclo. Esses três passos são repetidos em torno de 30 a 40 vezes (ciclos). E por último, após os ciclos existe uma extensão final que dependendo do fragmento tem tempo de 5 a 15 minutos, para que todas os produtos tenham terminado sua extensão, mas este passo é opcional. (VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

O produto da PCR é analisado frequentemente por eletroforese em gel, que consiste na separação das moléculas por carga elétrica. A diferença de potencial faz com que o DNA migre no gel, originando bandas com relação ao tamanho do fragmento. Essas bandas são visualizadas através da emissão de fluorescência a partir de compostos fluorescentes que interagem com o DNA. O GelRed é um corante usado, excitado por radiação ultravioleta, sensível, estável e não tóxico, que substituiu o brometo de etídio que possui características mutagênicas (OLIVEIRA, A., 2009).

Os géis podem ser de agarose ou poliacrilamida, normalmente usa-se a poliacrilamida para DNA com no máximo 500 pares de bases (pb) e agarose para DNA maiores, pois a agarose forma poros maiores quando comparado a poliacrilamida (VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

1.3.2 PCR em tempo real

A partir da técnica de PCR convencional foi desenvolvida muitas variantes, conforme pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 - Variantes da reação em cadeia da polimerase convencional

Sigla	Designação inglesa	Designação portuguesa	Caracterização Sumária	Exemplos
MPCR	PCR <i>multiplex</i>	PCR múltiplo	Utiliza mais do que um par de iniciadores na mesma reação	Polimorfismos bialélicos autossomais (TURGHI et al., 2004)
N-PCR	PCR <i>nested</i>	-	Destinada a reduzir a contaminação dos produtos da reação	Análise genética de impressões digitais (LAGOA et al., 2008)
qPCR/R TQ-PCR	PCR <i>in real time</i>	PCR em tempo real	Visualização da amplificação à medida que a reação ocorre	Quantificação de DNA em amostra forenses (SCHULZ et al., 2006)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase</i> PCR	PCR por Transcriptase Reversa	Amplificar o DNA obtido por meio da transcrição reversa do RNA	Detecção de diferentes espécies de RNA do vírus respiratório (VALASSINA et al., 1997)
PCRSQ	<i>Semi-quantitative</i> PCR	PCR semi-quantitativo	Baseia-se na intensidade do produto final amplificado, tentando verificar até que ponto determinado produto aumenta ou diminui em relação a um gene de referência	Identificação do PRKAAI no cromossomo 5, que é potencial responsável do gene do cancro do colo do útero (HUANG et al., 2006)
RAPD-PCR	<i>Random Amplified Polymorphic</i> DNA	-	Baseia-se na análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA amplificado aleatoriamente	Identificação do genoma do actinomiceto em regiões conservadas (MEHLING et al., 1995)
REP-PCR	<i>Repetitive Extragenic Palindromic</i>	Sequências Palindrômicas Extragênicas Repetitivas	Recorre a sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas	Caracterização molecular de isolados de <i>Salmonella</i> (ALBUFERA et al., 2009)
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>	Consenso de sequências enterobacteriana nas intergênicas e repetitivas	Usada para estudar a diversidade da comunidade microbiana e dinâmica	Identificação do destino da <i>E. coli</i> quando ocorre o abate de porcos (NAMVAR; WARRINER, 2006)
BOX-PCR	BOX-PCR	-	Utiliza somente um oligonucleotídeo iniciador, devido à orientação invertida das repetições no genoma	Investigar o parentesco genético do <i>Bacillus anthracis</i> entre 25 espécies de bacilos (KIM et al., 2002)
RACE-PCR	<i>Rapid amplification of cDNA end</i>	-	Facilita o isolamento das sequências das extremidades 5' e 3' dos cDNA's, permitindo obter cDNA's completos	Amplificação de cDNA e de DNA de <i>Isochrasis galbana</i> pela sequenciação de enzimas lipolíticas (GODET et al., 2007)

AS-PCR	<i>Allele specific PCR</i>	PCR alelo-específica	Distinção entre alelos que diferem num único nucleotídeo	Determinação quantitativa da relação entre mutações de genes normais <i>ras</i> no sangue de pacientes com leucemia (HORIKOSHI et al., 1994)
iPCR	<i>Inverse PCR</i>	PCR inverso	Clonagem de sequências de DNA adjacentes a uma sequência conhecida a partir de um molde circular	Genotipagem do grupo sanguíneo ABO (KOBAYASHI; AKANE, 2000)
PCR Screen	<i>PCR screening</i>	PCR de rastreio	Indica a presença ou não de uma modificação genética	Identificação do tipo I do vírus da herpes humana (YU et al., 2009)
LM-PCR	<i>Ligation mediated PCR</i>	PCR mediada por ligação	Utiliza um único iniciador para garantir que a amplificação é linear	Detecção de adultos de DNA ao nível da sequência do DNA (PFEIFER et al., 1993)
AFLP-PCR	<i>Amplified fragment-length polymorphism-PCR</i>	Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados	O DNA genômico é tratado com duas enzimas de restrição e os fragmentos ligados a adaptadores	Identificação e tipagem de espécies de <i>Candida</i> (LOPES et al., 2007)
RFLP-PCR	<i>Restriction fragment length polymorphism-PCR</i>	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição	Se existirem dois <i>amplicons</i> com uma variação da sequência de nucleotídeos nos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição geram diferentes padrões de fragmentos	Diferenciação de larvas califorídeos (<i>Diptera, Calliphoridae</i>) em cadáveres humanos (SCHROEDER et al., 2003)
DOP-PCR	<i>Degenerate oligonucleotide primed-PCR</i>	-	Utiliza parcialmente uma sequência degenerada de um protocolo de PCR, com duas diferentes temperaturas de hibridização	Estudo do cancro familiar de próstata recolhe algumas alterações genéticas únicas, quando comparamos com os tumores esporádicos da próstata (VERHAGEN et al., 2000)
Anchored PCR	<i>Anchored PCR</i>	-	Utiliza apenas um iniciador em vez de dois iniciadores	Estudo de células T humanas receptoras de transcrições (FERRADINI et al., 1993)

Fonte: Oliveira, T. (2010) adaptado

A necessidade de monitorar a reação da PCR com relação a qualidade e quantidade de DNA levou a uma variante da PCR convencional, chamada de PCR em tempo real. A PCR

quantitativa (qPCR) ou PCR em tempo real quantitativa (RTQ-PCR), foi inventada por Higuchi e seus colaboradores em 1993 e consistia num sistema acoplado numa câmara de vídeo para monitorar a PCR durante os ciclos. O monitoramento era feito através da fluorescência emitida pela ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla fita sintetizadas (HIGUCHI et al., 1993).

A plataforma atual consiste em um termociclador que possui um sistema óptico para recolher a emissão de fluorescência causada por uma fonte de iluminação a vários comprimentos de onda e enviando essa informação para um computador com um *software* próprio para a aquisição e análise dos dados da reação. Assim, amplificando, detectando e quantificando em simultâneo e com total automatização a reação (MACKAY, 2007).

O termociclador controla as temperaturas necessárias para a amplificação da amostra através do efeito Peltier. O efeito Peltier é um fenômeno termoelétrico onde uma tensão é aplicada em um circuito fechado, criando-se um gradiente de temperatura. A temperatura do sistema aumenta ou diminui com relação ao sentido da passagem da corrente elétrica no circuito (ARANTES, 2013).

A amplificação da PCR pode ser dividida em fase exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. Na primeira fase, existe maior especificidade e precisão nos resultados obtidos pois o DNA é dobrado a cada ciclo, sendo esta fase a usada para análise da reação. Na fase de crescimento linear existe um decréscimo na eficiência pois o consumo de reagentes faz com que a disponibilidade destes vá diminuindo com o passar dos ciclos. E na última fase, ocorre uma estagnação na reação devido a inexistência da enzima ou esgotamento de reagentes, pois novos produtos da PCR não são possíveis (COBLE et al., 2004; TAUPIN, 2013).

Os resultados da PCR em tempo real são interpretados seguindo alguns conceitos. O primeiro, a *baseline* é o limiar de detecção da fluorescência do aparelho, e serve para eliminar o ruído do fundo. O *threshold*, definido pelo *software* do equipamento, é o ponto onde a fluorescência detectada passa o limiar de detecção e inicia sua fase exponencial. O *cycle threshold* (C_T) é o valor relativo aos ciclos que a curva de amplificação passa o limite de detecção. Então, o C_T depende do número de moléculas de DNA inicial na reação, quando maior for esse número inicial, menor será o número de ciclos (C_T) necessários para gerar um sinal exponencial de fluorescência (R_n) acima da *baseline* (BUTLER, 2005; COBLE et al., 2004; DORAK, 2007; HIGUCHI et al., 1993).

Para análise dos resultados da PCR em tempo real também é usado uma curva de dissociação (*melting*). Esta curva é obtida através da comparação entre temperatura e

fluorescência, e depende do tamanho do fragmento amplificado (pb). O método se dá pelo aumento de temperatura nos poços da reação até se perder a fluorescência, pela desnaturação da dupla fita do DNA. Quando a desnaturação acontecesse existe uma queda abrupta na fluorescência, caso existir mais de uma queda significa contaminação ou insuficiente especificidade das sequências iniciadoras. A temperatura de dissociação varia de cada amostra com relação ao conteúdo guanina e citosina (CG), comprimento e características da sequência. Essa análise confirma o produto de PCR, sem usar os géis de eletroforese, pois cada produto tem sua própria temperatura e gerará um pico diferente (ESPY et al., 2006; MACKAY, 2007).

A quantificação da técnica pode ser de duas formas, a relativa que compara o limiar da fase exponencial e a absoluta que compara a curva padrão. A relativa é feita pela comparação do *threshold* com os valores de C_T das amostras alvo com uma amostra controle. A amostra e o controle são normalizados a um gene endógeno apropriado. A absoluta é determinada através da concentração inicial de uma amostra com concentração conhecida, gerando mais precisão e consistência nos resultados (COBLE et al., 2004; GUNN, 2011; HIGUCHI et al., 1993; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008). Quando há apenas uma molécula inicial são necessários aproximadamente 37 ciclos para alcançar o C_T na maioria dos protocolos, e quando há 10 milhões de moléculas iniciais necessitam-se aproximadamente 17 ciclos. (VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

1.4 Componentes da PCR

A técnica da PCR (convencional ou em tempo real) necessitam de reagentes para gerar seu produto, denominado *amplicon*. Para que a amplificação do produto ocorra é necessário DNA molde e uma mistura de reagentes. Essa mistura tem como componentes essenciais: tampão, cátion bivalente (Mg^{2+}), sequências iniciadoras, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's) e uma enzima DNA polimerase. Na PCR em tempo real necessita-se de mais um corante ou sondas de sequência específica para detecção do fragmento (OLIVEIRA, T., 2010; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008). As sondas específicas são oligonucleotídeos com um fluorocromo adicionado, possuem alta especificidade para uma determinada sequência da PCR. O corante, composto fluorescente adicionado a PCR em tempo real, gera um sinal de fluorescência diretamente proporcional a quantidade de produto amplificado ao longo dos ciclos. Os corantes intercalantes são fluorocromos que intercalam na dupla fita de qualquer sequência, permitindo a detecção de qualquer amplificação que ocorra

na reação. O primeiro corante usado foi o *SYBR® Green*, em 1990, e recentemente o mais utilizado é o *EvaGreen®* (OLIVEIRA, T., 2010).

O *SYBR® Green* é uma molécula que tem capacidade de ligar-se de forma covalente a dupla cadeia de DNA, e quando excitada emite fluorescência verde. Esse corante não interfere na atividade da maioria das nucleases e DNA polimerase, e possui elevada afinidade com o DNA dupla fita, sendo possível detectar um baixo número de cópias na reação (MACKAY, 2007). A fluorescência emitida quando as moléculas não estão ligadas ao DNA dupla fita é mínima. O corante liga-se preferencialmente em produtos da PCR, pois há preferência de ligação em regiões ricas em guanina e citosina (CORREIA, 2007; MACKAY, 2007). O *SYBR® Green* tem como vantagem sua alta sensibilidade, baixo custo e facilidade de manuseio, mas sua desvantagem está na possibilidade de ligação com todo o DNA dupla fita da PCR, incluindo dímeros de iniciadores e outros produtos não específicos (MACKAY, 2007; OLIVEIRA, A., 2009). O corante tem como desvantagem também, ser um inibidor da PCR quando em altas concentrações, devendo ser usado no máximo 0,5 µM, e ser instável em condição alcalina do tampão Tris durante o armazenamento (KARSAI, 2002).

O corante *EvaGreen®* vem sendo utilizado substituindo o *SYBR® Green*, pois sua intensidade de fluorescência resultante da ligação com o DNA é maior quando comparados, apresenta menor inibição para o processo da PCR e possui estabilidade hidrolítica, tanto em condições alcalinas ou ácidas. A absorção e emissão deste corante são semelhante ao *SYBR® Green*, podendo usar a mesma configuração ótica para ambos os corantes (IHRIG; LILL; MÜHLENHOFF, 2006).

O tampão usado na reação tem como função manter o pH estável durante todo o processo, normalmente é um tampão Tris-HCl 10 mM, com pH entre 8 a 9 a temperatura ambiente.

O cátion bivalente (Mg^{2+}) é necessário como cofator enzimático da DNA polimerase, sendo o cloreto de magnésio ($MgCl_2$) usado para suprir essa necessidade. A concentração do íon varia entre 1,5 a 4 mM, mas baixas concentrações de íon diminuem a quantidade de produto final e elevadas concentrações diminuem a especificidade da reação com o DNA alvo (CHEN; JANES, 2002; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

Os iniciadores são oligonucleotídeos que flanqueiam a região a ser amplificada, apresentam cerca de 15 a 30 pares de base, com conteúdo CG entre 40 a 60%, e determinam a especificidade da reação. Estas sequências devem ter determinado tamanho para conseguirem hibridizar apenas na região desejada, e não formar estruturas secundárias. Para precave-se da formação de dímeros, o terminal 3' das duas sequências de iniciadores não deve ser

complementar e não teve ter a presença de três ou mais bases de G ou C nas 5 últimas bases do terminal 3' de cada iniciador. A alta concentração de iniciadores acarreta em aparecimento de produtos inespecíficos e formação de dímeros de iniciadores, e seu inverso induz uma má polimerização da enzima. A concentração deve ficar entre 0,1 a 1,0 pmol/μl de reação (CHEN; JANES, 2002; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

A temperatura onde apenas metade dos iniciadores estão ligados ao alvo é conhecida como temperatura de fusão (*melting temperature*- T_m). Se os iniciadores tiverem menos de 25 nucleotídeos, a T_m pode ser estimada recorrendo à Regra de Wallace, pela fórmula $T_m = 4(G+C) + 2(A+T) \text{ } ^\circ\text{C}$, em que G, C, A, T correspondem ao número de cada um dos nucleotídeos do iniciador, com essa temperatura pôde-se estimar a temperatura de hibridização, normalmente diminuindo 2 a 4 $^\circ\text{C}$. A ligação de ambos os iniciadores deve ocorrer na mesma temperatura ou no máximo 5 $^\circ\text{C}$ de diferença, mas a temperatura de hibridização é dada pelo que possuir menor temperatura de fusão. Para desenhar um iniciador é necessário o conhecimento prévio da sequência nucleotídica na qual se deseja amplificar, de modo que se possa sintetizar quimicamente os iniciadores para serem complementares as sequências flangeadoras do fragmento alvo da amplificação (CHEN; JANES, 2002; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

Os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), dATP - desoxiadenosina trifosfato; dTTP - desoxitimidina trifosfato; dGTP - desoxiguanosina trifosfato e dCTP - desoxicitosina trifosfato devem possuir a mesma concentração, para não haver erros de incorporação na fita em extensão. As altas concentrações de dNTP's aumentam os erros, mas a diminuição causa a perda de rendimento da reação (CHEN; JANES, 2002; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008). Assim, as concentrações desiguais de dNTP's provocam maior frequência de erros na DNA polimerase e devem ficar entre 50 e 200 μmol/μL (INNIS et al., 1988; MIGUEL, 2007).

A primeira enzima usada na PCR foi o fragmento de Klenow, obtida através da clivagem da DNA polimerase I da bactéria *Escherichia coli*. A enzima apresentava limitações, exigindo que cada ciclo de desnaturação fosse adicionado novamente, apresentando um trabalho árduo e grande risco de contaminação (ERLICH, 2015; MULLIS; FALOONA, 1987). Em 1988, foi substituída pela *Taq* polimerase extraída da bactéria termófila *Thermus aquaticus*, organismo que vive em águas a 75 $^\circ\text{C}$. Essa enzima é uma proteína de 94 kDa que é termoestável, tendo meia vida de 30 a 40 minutos a 95 $^\circ\text{C}$, ficando ativa do início ao final da PCR. Mais de 40 ciclos não é aconselhável porque a enzima perderia eficiência pelo excesso de tempo a altas temperaturas (CHEN; JANES, 2002; YAZD et al., 2009). A cada 4.000 a 5.000 pb

incorporados, essa enzima incorpora um nucleotídeo incorretamente, reduzindo a eficiência de fragmentos com mais de 5 kb (YAP; MCGEE, 1991). O aumento na concentração de enzima minimiza os efeitos da presença de inibidores da PCR (BARBARO; CORMACI; AGOSTINO, 2009; DAVOREN et al., 2007).

1.5 Padronização da PCR

A PCR em tempo real é uma técnica muito usada nas áreas de investigação médica, forense e biotecnológica por sua rapidez, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Tendo um amplo espectro de aplicações desde genotipagem e quantificação gênica até a toxicologia forense e à biossegurança (MACKAY, 2007; OLIVEIRA, A., 2009; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

A PCR é um instrumento de diagnóstico que pode detectar agentes infecciosos com maior sensibilidade e especificidade, sem a necessidade de parasitas viáveis na amostra analisada. Apesar dessas qualidades, a técnica necessita de padronização de protocolos para diferentes amostras amplificadas, cuidado com presença de inibidores ou promotores da PCR, comprimento do *amplicon* e existência de estruturas secundárias na amostra, para obtenção de melhor rendimento, especificidade e sensibilidade nos resultados. Os protocolos para melhor eficiência diferem por variação de cada componente físico ou químico da reação, como as sequências iniciadoras, concentração de magnésio, o pH do tampão da reação e a temperatura e tempo dos diferentes passos do ciclo (GUNN, 2011; HEID et al., 1996; KUBISTA et al., 2006; VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008). Dois exemplos disso, são que a micobactéria do complexo *tuberculosis* pode ser identificada quanto a presença ou ausência em poucas horas, com a utilização de sequências iniciadoras específicas (OTAL et al., 1997), e a diferença da concentração dos sais do tampão da reação, alteraram o tempo e temperatura da reação que apresentavam resultados satisfatórios para o vírus da diarreia bovina (PILZ; ALFIERI; ALFIERI, 2005).

A concentração nucleotídica deve ser igual para todos os dNTP`s segundo a literatura, mas levando em conta a amplificação de um fragmento rico em apenas um nucleotídeo. A concentração mudaria ao passar dos ciclos, causando a escassez de apenas um par de bases complementares. Desta forma, pode-se imaginar que na amplificação de fragmentos com conteúdo diferente de CGs e ATs, os últimos ciclos estarão em concentrações de dNTP`s diferentes das iniciais que comprometem a reação. Contudo, ainda não foi desenhado um modelo para estudo deste comportamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenhar um sistema para avaliar a polimerização do DNA com diferentes concentrações de nucleotídeos utilizando um termociclador de PCR em tempo real.

2.2 Objetivos específicos

Obter um fragmento de DNA biotilado formado por mais de 2.000 pares de base e concentração CG média de 50%.

Ligar o fragmento biotilado à partículas magnéticas recobertas com estreptavidina e quantificar o volume de DNA necessário para saturar a estreptavidina das partículas.

Separar as duplas fitas ligadas nas partículas, mantendo apenas uma destas ainda ligada a elas e a outra em solução.

Amplificar as partículas ligado ao DNA biotilado simples fita para verificar a eficiência da extensão da fita complementar.

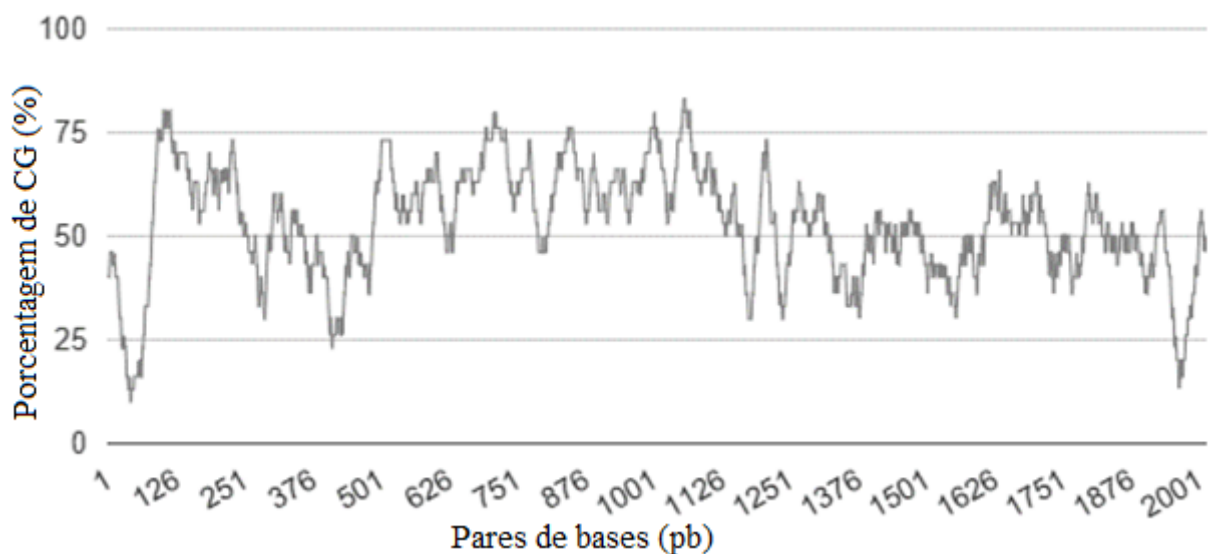
Desenhar um sistema baseado na amplificação da fita complementar de ambas as simples fitas que seja detectável por PCR em tempo real.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amplificação do fragmento

O fragmento de DNA utilizado para este trabalho foi obtido através de PCR do plasmídeo pCR-bicolor, adicionando um iniciador que contém uma sequência universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') numa extremidade, e um iniciador que contém a sequência universal M13 (5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3') na outra. Utilizou-se um volume final da reação de 25 μ L, otimizado para maior rendimento dos *amplicons*, com 1 ng de DNA molde, 2,5 μ L tampão para *Taq* DNA Polimerase Platinum, 1 μ L de dNTP's 5 mM, 1 μ L de iniciador direto (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAAGGATCTTCACCTAGATCC-3') 10 pg/ μ L, 1 μ L de iniciador reverso (5'-TGAAAACGACGGCCAGTGCATTGGTAACTGTC AGACC-3') 10 pg/ μ L, 0,4 μ L de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Sigma), completando o volume final com água ultrapura. A amplificação foi feita num termociclador (SureCycler 8800, Agilent Technologies), com uma fase inicial de ativação enzimática à 95 °C por 5 minutos e 30 ciclos com uma sequência de passos, 1 min a 95 °C para desnaturação, 1 min a 58 °C para ligação dos iniciadores ao DNA molde e 3 min a 72 °C para extensão da fita complementar, finalmente foram aplicados 5 minutos a 72 °C após os ciclos, para a polimerização dos fragmentos incompletos. O *amplicon* possui 2.040 pares de bases com conteúdo CG de 52%, na Figura 2 mostra a distribuição do conteúdo CG ao longo das 2.040 bases da fita amplificada com iniciador T7 universal.

Figura 2 – Conteúdo CG do *amplicon* utilizado neste trabalho



Fonte: O autor (2017)

3.2 Biotinização da amostra pela PCR

A *amplicon* foi biotilado por PCR convencional, com um iniciador T7 universal contendo 6-carboxi-fluoresceína (FAM) numa extremidade, e um iniciador M13 universal ligado a biotina na outra. Utilizou-se como molde o produto da PCR do plasmídeo diluído mil vezes, nas mesmas condições e volume final da reação feita na primeira PCR, com diferença apenas nos iniciadores. O iniciador M13 universal (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') continha biotina na extremidade 5' e o iniciador T7 universal (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') tinha FAM na extremidade 5'. O Anexo A mostra a sequência completa da fita amplificada com iniciador T7 universal, destacando em negrito os sítios de hibridização dos iniciadores.

3.3 Purificação da simples fita da amostra

O *amplicon* biotilado de 2.040 pares de bases foi separado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *SYBR® Green*, com corrida em TBE 0,5% a 100 volts. A banda foi recortada e purificada por coluna, seguindo o manual do *Gel Purification Kit* (Mebeq Bioscience), para obtenção da amostra pura. Resumidamente, o gel é solubilizado com *Buffer DD*, e transferido para a coluna de sílica. A solução é incubada na coluna para o DNA se ligar aos fragmentos de sílica, depois o DNA ligado passa por lavagem com *DNA Wash Buffer* para remoção dos contaminantes. Finalmente, o DNA é eluído em *Elution Buffer*, desprendendo-se da coluna.

Para produção das simples fitas de DNA, 5 µL da amostra purificada (aproximadamente 150 ng) foram misturados com 1 µL de partículas magnéticas cobertas com estreptavidina, conforme instruções do *Dynabeads® Streptavidin Trial Kit* (Dynabeads™ M-270 Streptavidin, Invitrogen). As partículas são lavadas com *B&W Buffer*, para remover os conservantes, o DNA biotilado e as partículas são incubados com agitação suave, para que a ligação entre eles ocorra. Após esse período, as partículas são lavadas novamente, para remoção do DNA não ligado às partículas magnéticas. As fitas do DNA ligado às partículas foram separadas por solução alcalina de hidróxido de sódio 0,15 M (protocolo do fabricante) ou 0,02 M (WILSON, 2011). Assim, a fita que contém biotina se mantém ligada a estreptavidina das partículas, enquanto a outra fita fica eluída na solução alcalina. As partículas magnéticas são retiradas da solução através de campo magnético, lavadas e eluídas em água. A fita eluída em hidróxido de

sódio (NaOH) 0,02 M é neutralizado com 0,1 volumes de ácido acético (CH₃COOH) 0,2 M, este procedimento não foi realizado com as amostras tratadas com NaOH 0,15 M.

3.4 PCR em partículas contendo a simples fita biotinizada

Para a extensão da fita complementar diretamente nas partículas magnéticas utilizou-se 0,25 µL de partículas com DNA biotinizado, na mesma composição e volume final da reação feita com o plasmídeo, com diferença do uso de apenas um iniciador, T7 universal. A extensão da fita complementar foi feita com 1 ciclo de 12 minutos a 58 °C, para ligação dos iniciadores a fita molde e extensão do amplificado. Duas alternativas foram testadas, uma com agitação antes de iniciar o termociclador e outra com agitação por vortex a cada 2 minutos em banho-maria a 58 °C durante 12 minutos.

Os produtos das reações foram purificados por campo magnético, diluído em água e corados com 1 µL de *EvaGreen*® 20x (Biotium), avaliando a eficiência por microscopia de fluorescência, no filtro de excitação azul e emissão em verde. As fotos foram tiradas com luz branca com tempo de exposição de 25 ms e com luz azul em 1.000 ms na objetiva de 40x.

Para a análise da fluorescência foi usado o *software* ImageJ, calculado a fluorescência a partir da densidade de cada partícula magnética, subtraindo a fluorescência média do plano de fundo. Da fluorescência obtida para cada amostra foi subtraído a obtida pelo seu respectivo controle, gerando a fluorescência final.

3.5 Geração da segunda fita em DNA simples fita purificado

A extensão da fita neutralizada foi feita no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), com volume final de 20 µL e DNA molde variável (1 µL, 2 µL, 4 µL, 8 µL, 12 µL e 14 µL da solução alcalina neutralizada), com acréscimo de 5,4 µL da mistura de reagentes da PCR, contendo 0,4 µL de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Sigma), 1 µL de dNTP's 5 mM, 2 µL tampão da *Taq* DNA Polimerase, 1 µL de corante *EvaGreen*® 20x e 1 µL de iniciador M13 universal, completando o volume com água ultrapura. A amplificação teve um pré ciclo de 95 °C por 5 minutos, e 72 ciclos de 10 segundos a 58 °C. A leitura da fluorescência ocorria ao término de cada ciclo, através da fluorescência gerada pelo corante.

Para calcular o volume de moléculas biotinizadas que são necessárias para saturar a capacidade de ligação das partículas magnéticas às moléculas, foram testadas diferentes concentrações de DNA biotinizado (7 ng, 15 ng, 30 ng, 60 ng, 120 ng e 240 ng) para 1 µL de

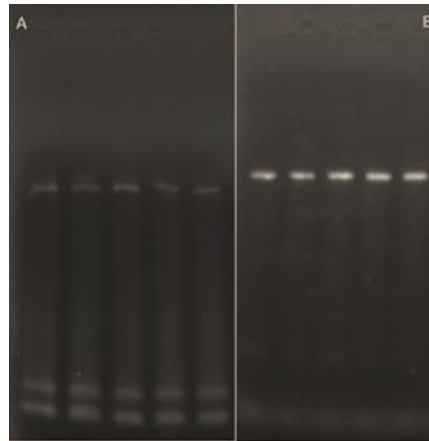
partículas magnéticas, e diferentes volumes de partículas (1 µL, 2 µL, 4 µL e 8 µL) para 20 ng de DNA biotilado. A quantificação da simples fita neutralizada de cada purificação foi analisada pela amplificação de um fragmento da sequência que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) contida no *amplicon* de 2.040 pb, com 10 µL de amostra, 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Sigma), 1 µL de dNTP's 5 mM, 2 µL tampão da *Taq* DNA Polimerase Platinum, 1 µL de corante *EvaGreen*® 20x, 1 µL de iniciador direto (CAACAGCCACAACGTCTATATCATG) e 1 µL de iniciador reverso (ATGTTGTGGCGGATCTTGAAG), completando o volume com água ultrapura. O protocolo do tipo *two step*, consistiu de um ciclo inicial a 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos a 94 °C por 20 segundos e 30 segundos a 60 °C, com leitura da fluorescência ao término de cada um dos ciclos (VARGAS et al., 2012).

Ao final dos protocolos uma curva de dissociação foi feita, seguindo protocolo de tempo e temperatura indicado pelo equipamento, que vai de 60 °C a 95 °C. Garantindo que o amplificado analisado era realmente a amostra, e não dímeros de iniciadores ou outras formações secundárias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra obtida da PCR do plasmídeo apresentou baixo rendimento e dímeros de iniciadores, pois foi usado o protocolo otimizado da reação de biotinizacão (Figura 3A). Em contrapartida, a biotinizacão teve uma banda forte de *amplicon*, mas ainda havia alguns dímeros (Figura 3B).

Figura 3 - Géis de agarose do processo de obtenção da amostra



Produto da PCR com o plasmídeo (Painel A) e da biotinizacão do fragmento (Painel B).
Fonte: O autor (2017)

O protocolo de biotinizacão foi padronizado, diferindo do protocolo padrão pela mudançã da enzima por uma DNA polimerase Platinum (Sigma), e concentraçã de 0,2 µL para 0,4 µL. Os tempos dos ciclos de hibridizaçã e extensã, foram acrescentados 30 segundos ao tempo teórico inicial. A T_m dos iniciadores pode ocasionar essa especificidade, pois a temperatura teórica da PCR seria 50 a 52 °C, mas a reaçã tem melhor resultado a 58 °C (Tabela 2).

Tabela 2 – Características dos iniciadores

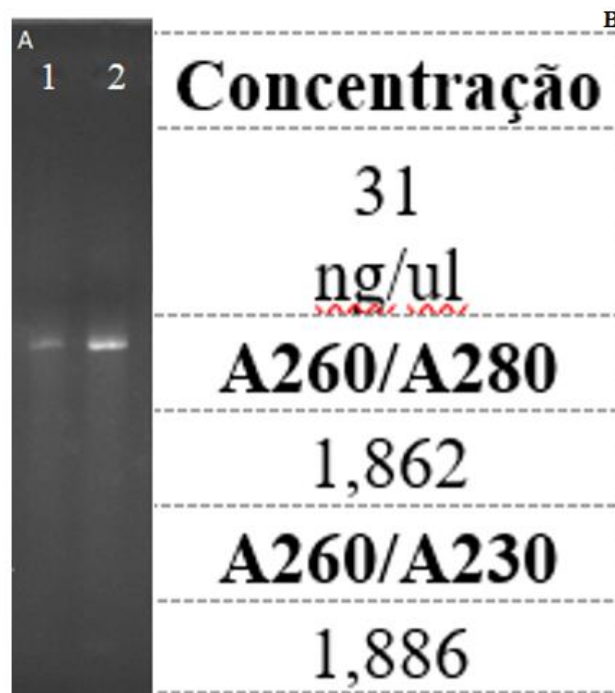
	Sequência (5`->3`)	pb	Tm	GC%
Direto	AAGGATCTTCACCTAGATCC	20	58	45
Reverso	GCATTGGTAACTGTCAGACC	20	60	50
M13 universal	TGTAAAACGACGGCCAGT	18	54	50
T7 universal	TAATACGACTCACTATAGGG	20	56	40
eGFP (Direto)	CAACAGCCACAACGTCTATATCATG	25	72	44
eGFP (Reverso)	ATGTTGTGGCGGATCTTGAAG	21	62	47,619

Fonte: O autor (2017)

A eliminação dos dímeros foi feita pela purificação por coluna da banda do gel, pois eles influenciariam negativamente na purificação das moléculas biotiniladas, porque também estão biotinilados. Os dímeros biotinilados competiriam com a amostra pelos sítios de ligação da estreptavidina, diminuindo a quantidade da amostra ligada às partículas magnéticas.

A Figura 4A compara o material biotinilado antes da purificação por coluna (poço 1) e depois da purificação e concentração (poço 2). Quando comparadas, a banda purificada apresenta maior intensidade e ausência de dímeros de iniciadores. A quantificação desse purificado no espectrofotômetro NanoVue, apresentou 31 ng/μL de material, com relação A₂₆₀/A₂₈₀ de 1,8 mostrando que não existe contaminação com proteína e a relação A₂₆₀/A₂₃₀ que não há contaminantes orgânicos também (Figura 4B).

Figura 4 – Quantificação do purificado de coluna

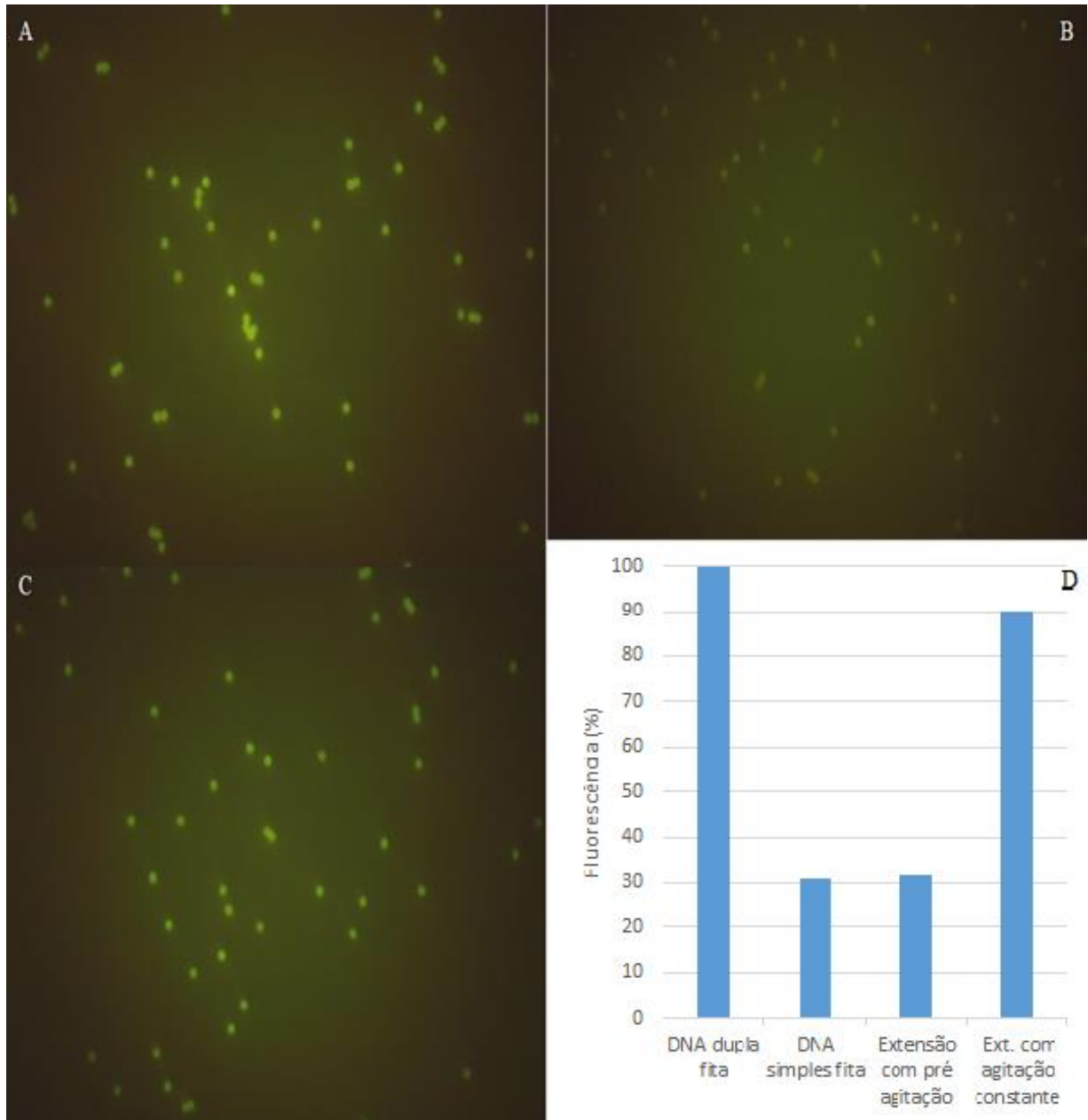


Produto da reação de biotinilização (poço 1) e reação purificada por coluna (poço 2) no Pannel 1. Pannel 2 apresenta a concentração e relação de contaminantes do purificado obtido através de espectrofotometria.

Fonte: O autor (2017)

As diferentes fases das partículas magnéticas podem ser vistas na Figura 5, sendo A a ligação do DNA dupla fita biotinilado às partículas magnéticas, B as partículas após a separação das fitas com fluorescência diminuída pela ausência de dupla fita, C as partículas após a extensão em banho-maria com agitação constante, onde é possível observar a geração da segunda fita pelo retorno da marcação fluorescente e D as análises da fluorescência das partículas magnéticas nos diferentes procedimentos.

Figura 5 – Análise das partículas magnéticas coradas com *EvaGreen*®`



Partículas com o DNA dupla fita ligado (Painel 1), partículas com DNA simples fita biotilado ligado (Painel 2), partículas com a fita complementar sintetizada com agitação constante (Painel 3) e relação de fluorescência dos diferentes procedimentos quando comparados as partículas com DNA dupla fita.

Fonte: O autor (2017)

As partículas ligadas ao DNA purificado foram consideradas como a fluorescência máxima, pois apresentaram forte coloração na exposição a luz azul. O DNA que recobria a partícula era marcado pelo corante, deixando a visível ao microscópio. As partículas com DNA simples fita ligado, apresentaram fluorescência de 30% quando comparado à dupla fita. Segundo Mao, Leung e Xin (2007), o *EvaGreen*® apresenta ligação a DNA simples fita, quando estes formam duplas fitas intramoleculares, sendo um motivo para apresentar 30% a mais de

fluorescência do que o controle sem DNA. Assim, as fitas simples deste trabalho que contêm 2.040 pb teria a formação de dupla fita em algumas partes da fita. A não separação de 100% das duplas fitas também poderia ser um fator que levaria a essa fluorescência, podendo ser resolvida com o aumento da molaridade da solução. A separação com 1,5 M de NaOH, não apresentou diferença significativa na fluorescência, e acarretou em outro problema como tratado adiante.

As partículas amplificadas no termociclador, sem agitação e com agitação antes de iniciar o aparelho, não tiveram diferença significativa na amplificação da segunda fita. As partículas magnéticas são compostas de ferro, precipitando muito rapidamente em solução. Assim, o DNA que está ligado a elas fica depositado no fundo do tubo, diminuindo a disponibilidade dos reagentes da PCR que se encontram em suspensão. O fragmento possui 2.040 pares de base, sendo que as partículas possuem eficiência máxima com 200 pb segundo o manual do *Dynabeads kilobaseBINDER kit*, fragmentos maior causam um impedimento estérico. As enzimas estenderiam da extremidade mais externa até a extremidade ligada a partícula, por esse movimento provavelmente elas acabariam se chocando umas com as outras, levando mais tempo para completar a extensão da fita complementar. A enzima DNA polimerase pode pausar ao encontrar contato físico e barreiras químicas, fazendo com que cada fita ligada as partículas estivesse em uma parte diferente da extensão, impossibilitando a quantificação da velocidade de escrita da enzima no sistema (SCHWARTZ; QUAKE, 2009).

A extensão no banho-maria com agitação constante apresentou fluorescência 10% menor em relação à dupla fita da marcação inicial (antes da desnaturação). Mostrando que mesmo com pouco espaço a enzima não se solta do DNA, mas pode haver pouco espaço quando muito próxima da partícula, não conseguindo finalizar a extensão de todas as fitas. Também pode-se inferir que algumas ligações do sistema biotina/estreptavina foram interrompidas, perdendo moléculas, durante o tratamento de desnaturação.

A temperatura de reação elevadas, a ligação da fita biotinilada com a estreptavidina das partículas pode ser interrompida (MARICIC; PAABO, 2009; WILSON, 2011), e isso poderia ter acontecido nas condições testadas. Quando purificado por campo magnéticos, essas fitas ficam na solução, acarretando perda na fluorescência final da partícula. Contudo, neste experimento a extensão foi realizada com a enzima *Taq* polimerase, por isso não necessitou ficar a 95 °C por 5 minutos para inativação do anticorpo inibidor.

Para trabalhar no objetivo proposto, todas as fitas deveriam iniciar sua extensão ao mesmo tempo, e para isto, a *Taq* polimerase Platinum deve ser usada. A estreptavidina desnatura em temperaturas acima de 80 °C, liberando a biotina associada a ela. A interação do

sistema estreptavidina/biotina pode ser quebrado por temperatura, pois a 20 °C uma pequena fração é liberada das partículas; em 60 °C quase metade do DNA é liberado; e com 70 °C a maior parte do DNA biotilado não estava ligado ao suporte sólido, aproximadamente 95%. (HOLMBERG et al., 2005).

Assim, a extensão nas partículas não é viável, por não haver boa reprodutibilidade no método. As partículas precipitadas não são quantificadas com sucesso pelo termociclador de tempo real, e também não são amplificadas pela diminuição da disponibilidade de reagentes. O uso de partículas menores ou PCR em emulsão não é viável também, pois as partículas menores apresentam menor superfície, aumentando o impedimento estérico. Além de necessitar de maior quantidade de partículas na reação para ter a mesma fluorescência, podendo causar algum erro na leitura da fluorescência do equipamento.

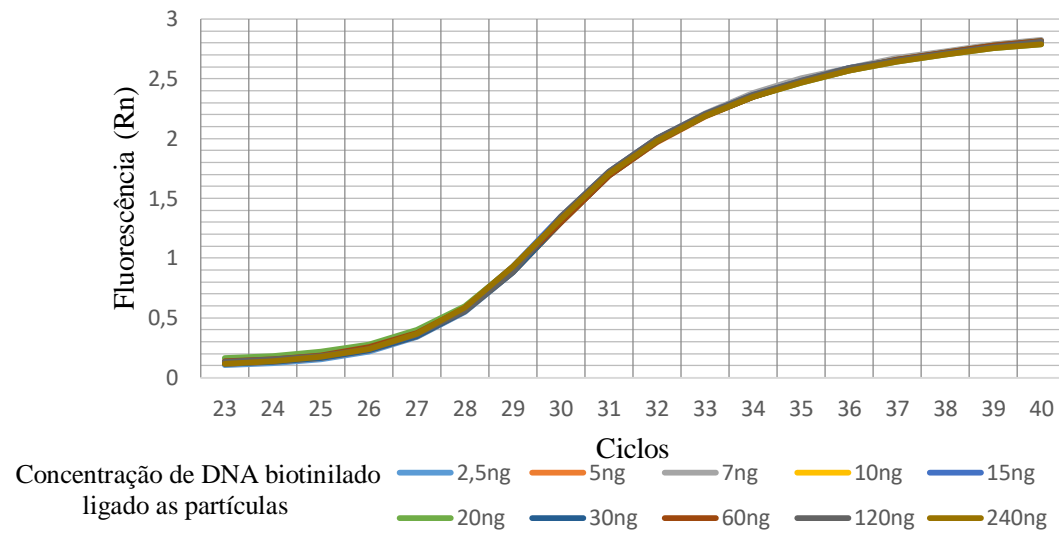
Os resultados com a fita neutralizada da solução alcalina (NaOH 0,02 M+CH₃COOH) não apresentaram bons resultados até o presente momento. O manual do kit aconselha a usar 150 mM de NaOH para a separação das fitas, mas estudos mostram que essa concentração de solução não deve ser usada. As altas concentrações de NaOH são insatisfatórias, desfazendo a ligação do sistema estreptavidina/biotina, e liberando as fitas biotiladas e a proteína na solução alcalina. (AVCI-ADALI et al., 2009; PAUL et al., 2009). A estreptavidina é um tetrâmero, onde os monômeros individuais são mantidos juntos por interações não covalentes. Alguns estudos têm sugerido um pré-condicionamento em NaOH das partículas de estreptavidina podem prevenir a contaminação de estreptavidina e fita biotilada na solução alcalina (WILSON, 2011. LIANG et al., 2015). Em NaOH 20 mM, é gerado uma simples fita livre de DNA dupla fita e contaminação por estreptavidina (WILSON, 2011), mas a exposição ao NaOH afeta a estrutura 3-D da proteína, diminuindo a eficiência de ligação à biotina (MARIMUTHU et al., 2012; YUAN; HUBER, 1985).

A diferença de amplificação do gene GFP (79 pb) não foi significativa em todos os valores testados (Figura 6), mas a curva de dissociação mostra que o *amplicon* se dissocia acima de 80 °C, enquanto o negativo não apresenta fluorescência significativa (Figura 7A). A curva de dissociação mostra que os valores de fluorescência obtido são do *amplicon*, e não de possível dímeros ou estruturas secundárias.

Os extremos do teste, 2,5 ng e 240 ng para 1µL de partículas, se mostraram muito parecidos. A eficiência do método de captura com estreptavidina de um produto de PCR biotilado, não se altera com o tamanho ou conteúdo CG do fragmento, e pela formação de estruturas secundárias na reação (BOWMAN; PALUMBI, 1993). Segundo, o manual do *Dynabeads kilobaseBINDER kit*, existe uma perda de captura de DNA biotilado com 2.000pb

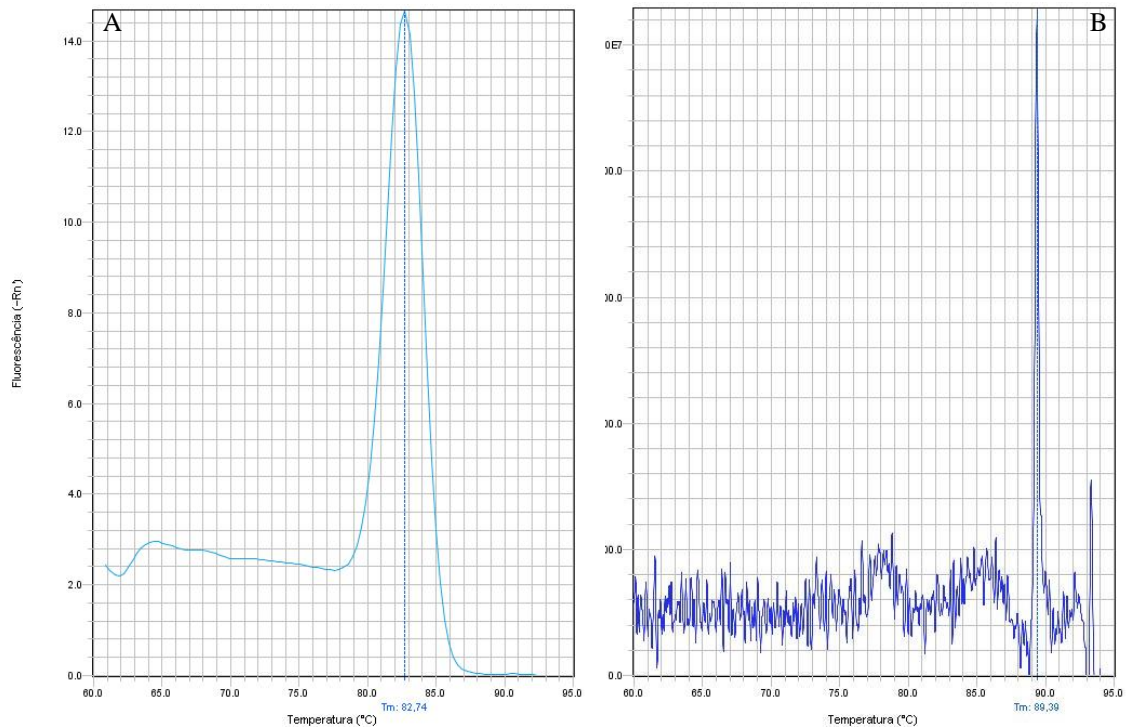
de 80%. Teoricamente seguindo esse manual, as partículas que deveria carregar 100 ng/μL teria uma eficiência de 20 ng de amostra para a 1 μL de partículas, mas existe 5 concentrações abaixo desse valor, o que torna o resultado inconclusivo.

Figura 6 – PCR em tempo real das amostras amplificadas com os iniciadores para GFP



Fonte: O autor (2017)

Figura 7 – Curva de dissociação das amostras



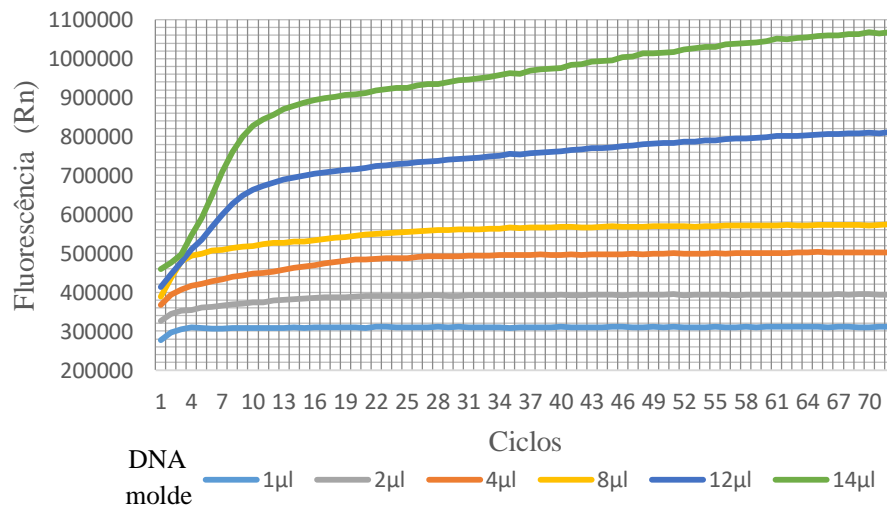
Curva de dissociação do produto da PCR do gene GFP (Painel 1) e da simples fita neutralizada (Painel 2).

Fonte: O autor (2017)

Quando o processo de extensão da simples fita foi avaliado em tempo real, nos primeiros 10 segundos foi necessária uma quantidade elevada de fita simples para poder detectar o aumento da fluorescência. Possivelmente, pela presença de inibidores advindos da neutralização da amostra, o acetato de sódio. Resíduos de sais inibem a ação enzimática, e poderia ter sido utilizado um método para remoção dos sais, como a precipitação e lavagem com etanol 70% (TERRY; HARRIS; PARKES, 2002). A concentração muito baixa de DNA simples fita diminuiria a eficiência desse método, e poderia acabar diminuindo ainda mais a amostra.

Nos resultados, a fluorescência é estatisticamente proporcional à quantidade de amostra. As amostras com menos de 4 μL (1 μL , 2 μL e 4 μL) foram imprecisas, pela baixa emissão de fluorescência. As maiores que 8 μL (8 μL , 12 μL e 14 μL) podem ser usadas para análise da extensão, pois a emissão de sinal inicial é detectada. Quanto maior foi a quantidade inicial de moléculas ficou mais fácil para fazer uma análise estatística dos dados a cada ciclo (10 segundos de amplificação), pois a diferença de intensidade a cada 10 segundos foi mais acentuada (Figura 8). A curva de dissociação mostra que o fragmento se encontra a mais de 89 $^{\circ}\text{C}$, e que não houve formação de estruturas secundárias (Figura 7B).

Figura 8 – Gráfico do comportamento da extensão da fita complementar da amostra



Fonte: O autor (2017)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos, podemos concluir que a extensão da fita complementar ao DNA ligado às partículas não foi possível. O peso das partículas impossibilita a homogeneidade da amostra, que leva à quantificação errada da extensão. O tamanho do DNA ligado à partícula é muito grande (~2.000pb) e a enzima ao encontrar obstáculos físicos pode parar a síntese da fita complementar (SCHWARTZ; QUAKE, 2009), levando a diferenças na extensão de uma fita em relação às fitas vizinhas. Por outro lado, as temperaturas durante o processo de extensão podem interferir negativamente no sistema biotina/estreptavidina, levando as fitas biotiniladas a ficarem na solução. O uso da fita neutralizada necessita de mais estudos, pois o processo de desnaturação, como a PCR, deve ser padronizado para diferentes amostras. A concentração do NaOH deve ser estipulada para obtenção de simples fita livre de contaminantes, dupla fita e proteína. Para a detecção da extensão é necessário um grande volume de amostra, mas esse volume acarreta em inibidores da reação, produto da neutralização da fita. Um método de dessaltação da amostra deverá ser testado, como por exemplo, a purificação com coluna de sílica, usada para remoção de sais das amostras de DNA contaminadas (TERRY; HARRIS; PARKES, 2002). A purificação da fita neutralizada por coluna possibilitaria a retirada do acetato de sódio, e também o aumento da concentração das amostras. Outro método possível seria o uso da fita biotinilada, pois as partículas após a dupla fita ser desnaturada com NaOH contém ainda a fita biotinilada ligada. A ligação do DNA biotinilado às partículas pode ser desfeita com temperaturas elevadas, obtendo a retirada da fita biotinilada das partículas e a concentrando-a em água.

Uma alternativa que não utilizaria o sistema magnético, seria a extração do genoma do bacteriófago M13, que é simples fita, criando uma cultura infectada e posterior purificação do DNA viral do sobrenadante da cultura bacteriana (MILLER, 1987).

A análise da cinética da extensão da fita complementar pode esclarecer como ocorre a adição de nucleotídeo nas diferentes concentrações, e através desse método determinar a velocidade de polimerização da DNA polimerase quando existe escassez de cada nucleotídeo e se a concentração nucleotídica deve ser padronizada com base no conteúdo CG do *amplicon*. Assim, como o sequenciamento dessas reações pode-se mostrar se a taxa de erro da DNA polimerase é afetada por essa concentração. Espera-se que com essa padronização a enzima tenha maior velocidade de escrita e menor taxa de erro, melhorando a especificidade da técnica e retardando o platô da reação, otimizando o processo de amplificação durante a PCR.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da Célula**. Artmed Editora. 2010.
- ALBUFERA, U. et al. Molecular characterization of Salmonella isolates by REP-PCR and RAPD analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 322-327, 2009.
- ARANTES, Rodrigo Cordeiro. Controle da temperatura da água utilizando microcontrolador. 2013.
- AVCI-ADALI, Meltem et al. Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. **Molecules**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2009.
- BARBARO, A.; CORMACI, P.; AGOSTINO, A. Validation of PrepFiler™ forensic DNA extraction kit (Applied Biosystems). **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 2009.
- BOWMAN, Barbara H.; PALUMBI, Stephen R. [29] Rapid production of single-stranded sequencing template from amplified DNA using magnetic beads. **Methods in enzymology**, v. 224, p. 399-406, 1993.
- BREVENOV, Maxim G. et al. Developmental validation of the PrepFiler™ forensic DNA extraction kit for extraction of genomic DNA from biological samples. **Journal of forensic sciences**, v. 54, n. 3, p. 599-607, 2009.
- BUTLER, John M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. Academic Press, 2005.
- CHOMOUCKA, Jana et al. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 144-149, 2010.
- CHEN, Bing-Yuan; JANES, Harry W. (Ed.). **PCR cloning protocols**. Springer Science & Business Media, 2002.
- COBLE, Michael D. et al. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. **International journal of legal medicine**, v. 118, n. 3, p. 137-146, 2004.
- CORNELL, Rochelle M.; SCHWERTMANN, Udo. **The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. John Wiley & Sons, 2003.
- CORREIA, Filipa Liliana Antunes. **Desenho e montagem de método rápido para diagnóstico da Borreliose de Lyme por PCR em tempo real**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. [sn].
- DORAK, M. Tevfik (Ed.). **Real-time PCR**. Taylor & Francis, 2007.

DAVOREN, Jon et al. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. **Croatian medical journal**, v. 48, n. 4, p. 478, 2007.

ERLICH, Henry. **PCR technology: principles and applications for DNA amplification**. Springer, 2015.

ESPY, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 165-256, 2006.

FERRADINI, Laurent et al. The use of anchored polymerase chain reaction for the study of large numbers of human T-cell receptor transcripts. **Molecular immunology**, v. 30, n. 13, p. 1143-1150, 1993.

GAO J, Li Z, RUSSELL T, LI Z. Antibody affinity purification using metallic nickel particles. **Journal of Chromatography B**, v. 895, p. 89-93, 2012.

GODET, Stéphanie et al. RACE PCR and PCR amplifications of *Isochrysis galbana* cDNA and DNA for lipolytic enzymes sequencing. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 2, p. S4, 2007.

GREEN, N. Michael. [5] Avidin and streptavidin. **Methods in enzymology**, v. 184, p. 51-67, 1990.

GUNN, Alan. **Essential forensic biology**. John Wiley & Sons, 2011.

HEID, Christian A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HIGUCHI, Russell et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

HOLMBERG, Anders et al. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. **Electrophoresis**, v. 26, n. 3, p. 501-510, 2005

HORIKOSHI, Tetsuro et al. Quantitative determination of the ratio of mutated to normal ras genes in the blood of leukemia patients by allele-specific PCR. **Leukemia research**, v. 18, n. 9, p. 693-702, 1994.

HUANG, Fung Yu et al. Semi-quantitative fluorescent PCR analysis identifies PRKAA1 on chromosome 5 as a potential candidate cancer gene of cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 103, n. 1, p. 219-225, 2006.

IHRIG, Jessica; LILL, Roland; MÜHLENHOFF, Ulrich. Application of the DNA-specific dye EvaGreen for the routine quantification of DNA in microplates. **Analytical biochemistry**, v. 359, n. 2, p. 265-267, 2006.

INNIS, Michael A. et al. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 24, p. 9436-9440, 1988.

- KARSAI, Albert et al. Evaluation of a homemade SYBR® Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. **Biotechniques**, v. 32, n. 4, p. 790, 2002.
- KIM, Wonyong et al. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. **FEMS microbiology letters**, v. 207, n. 1, p. 21-27, 2002.
- KOBAYASHI, Tetsuya; AKANE, Atsushi. ABO genotyping by inverse PCR technique. **Legal Medicine**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2000.
- KUBISTA, Mikael et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.
- LAGOA, A. M.; MAGALHÃES, T.; PINHEIRO, M. F. Genetic analysis of fingerprints— Could WGA or nested-PCR be alternatives to the increase of PCR cycles number?. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 1, n. 1, p. 48-49, 2008.
- LIANG, Chao et al. Comparison of the methods for generating single-stranded DNA in SELEX. **Analyst**, v. 140, n. 10, p. 3439-3444, 2015.
- LOPES, M. M. et al. Simultaneous identification and typing of *Candida* species by MSP-PCR and AFLP: Study of clinical isolates from a Portuguese pediatric hospital. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 17, n. 3, p. 157-167, 2007.
- LYON, Jennifer L. et al. Synthesis of Fe oxide core/Au shell nanoparticles by iterative hydroxylamine seeding. **Nano Letters**, v. 4, n. 4, p. 719-723, 2004.
- MACKAY, Ian Maxwell (Ed.). **Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization**. Horizon Scientific Press, 2007.
- MAO, Fei; LEUNG, Wai-Yee; XIN, Xing. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. **BMC biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 76, 2007.
- MARICIC, Tomislav; PAABO, Svante. Optimization of 454 sequencing library preparation from small amounts of DNA permits sequence determination of both DNA strands. **Biotechniques**, v. 46, n. 1, p. 51, 2009.
- MARIMUTHU, Citartan et al. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. **Analyst**, v. 137, n. 6, p. 1307-1315, 2012.
- MARTINS, Julia Mara et al. Prospecção de locos microssatélite e análise da variabilidade genética em uma população do Mato Grosso do Sul, visando a conservação da Arara Vermelha, *Ara chloroptera* (Psittacidae, Aves). 2007.
- MEHLING, Annette; WEHMEIER, Udo F.; PIEPERSBERG, Wolfgang. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. **FEMS microbiology letters**, v. 128, n. 2, p. 119-125, 1995.

- MIGUEL, ALCSF. Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL. **Instituto superior Técnico-Universidade Técnica de Lisboa**, 2007.
- MILLER, Harvey. [13] Practical aspects of preparing phage and plasmid DNA: Growth, maintenance, and storage of bacteria and bacteriophage. **Methods in enzymology**, v. 152, p. 145-170, 1987.
- MULLIS, Kary B.; FALOONA, Fred A. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.
- NAMVAR, A.; WARRINER, K. Application of enterobacterial repetitive intergenic consensus–polymerase chain reaction to trace the fate of generic *Escherichia coli* within a high capacity pork slaughter line. **International journal of food microbiology**, v. 108, n. 2, p. 155-163, 2006.
- OLIVEIRA, Ana Rita Ramalho de. **Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real**. 2009. Tese de Doutoramento.
- OLIVEIRA, MC de S. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2007.
- OLIVEIRA, Tânia Maria dos Santos. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro.
- OTAL, Isabel et al. Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 1, p. 273-277, 1997.
- PANKHURST, Quentin A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 36, n. 13, p. R167, 2003.
- PAUL, Angela et al. Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. **Oligonucleotides**, v. 19, n. 3, p. 243-254, 2009.
- PFEIFER, Gerd P.; DROUIN, Régen; HOLMQUIST, Gerald P. Detection of DNA adducts at the DNA sequence level by ligation-mediated PCR. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 288, n. 1, p. 39-46, 1993.
- PILZ, Daniela; ALFIERI, Alice F.; ALFIERI, Amauri A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarreia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sanguíneo, artificialmente contaminados. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, 2005.
- RAMIMOGHADAM, Donya; BAGHERI, Samira; HAMID, Sharifah Bee Abd. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 368, p. 207-229, 2014.

- SAIKI, Randall K. et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.
- SCHROEDER, Hilke et al. Use of PCR–RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. **Forensic Science International**, v. 132, n. 1, p. 76-81, 2003.
- SCHULZ, I.; SCHNEIDER, P. M.; ROTHSCHILD, M. A. Absolute quantification of forensic casework samples using quantitative real-time PCR (qPCR) methods. In: **International Congress Series**. Elsevier, 2006. p. 765-767.
- SCHWARTZ, Jerrod J.; QUAKE, Stephen R. Single molecule measurement of the “speed limit” of DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20294-20299, 2009.
- STRAY, J. et al. Extraction of DNA from forensic biological samples for genotyping. **Forensic DNA Analysis: Current Practices and Emerging Technologies**, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, p. 39-64, 2013.
- TAUPIN, Jane Moira. **Introduction to Forensic DNA Evidence for Criminal Justice Professionals**. CRC Press, 2013.
- TERRY, Catherine F.; HARRIS, Neil; PARKES, Helen C. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 3, p. 768-774, 2002.
- TUČEK, Jiří; ZBORIL, Radek; PETRIDIS, Dimitris. Maghemite nanoparticles by view of Mössbauer spectroscopy. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 6, n. 4, p. 926-947, 2006.
- TURCHI, C. et al. Development and forensic applications of multiplex PCR of autosomal biallele polymorphisms. In: **International Congress Series**. Elsevier, 2004. p. 213-215.
- VALASSINA, Marcello et al. Rapid detection of different RNA respiratory virus species by multiplex RT-PCR: application to clinical specimens. **Clinical and diagnostic virology**, v. 8, n. 3, p. 227-232, 1997.
- VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification, 2008.
- VARGAS, José Eduardo et al. pLR: A lentiviral backbone series to stable transduction of bicistronic genes and exchange of promoters. **Plasmid**, v. 68, n. 3, p. 179-185, 2012.
- VERHAGEN, Paul CMS et al. Microdissection, DOP-PCR, and comparative genomic hybridization of paraffin-embedded familial prostate cancers. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 122, n. 1, p. 43-48, 2000.
- WEBER, Patricia C. et al. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. **Science**, v. 243, n. 4887, p. 85-88, 1989.

WEISSLEDER, Ret al et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. **American Journal of Roentgenology**, v. 152, n. 1, p. 167-173, 1989.

WILSON, Robert. Preparation of single-stranded DNA from PCR products with streptavidin magnetic beads. **Nucleic acid therapeutics**, v. 21, n. 6, p. 437-440, 2011.

YAP, E. P.; MCGEE, J. O. Slide PCR: DNA amplification from cell samples on microscopic glass slides. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 15, p. 4294, 1991.

YAZD, E. Farashahi et al. Molecular cloning, expression and sequence analysis of DNA polymerase I from an Iranian thermophilic bacterium, *Bacillus sp. G* (2006). **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 6, n. 4, p. 831-837, 2009.

YU, Xuelian et al. A random PCR screening system for the identification of type 1 human herpes simplex virus. **Journal of virological methods**, v. 161, n. 1, p. 91-97, 2009.

YUAN, Calvin J.; HUBER, C. O. Determination of proteins and denaturation studies by flow injection with a nickel oxide electrode. **Analytical chemistry**, v. 57, n. 1, p. 180-185, 1985.

ZBORIL, Radek; MASHLAN, Miroslav; PETRIDIS, Dimitris. Iron (III) oxides from thermal processes synthesis, structural and magnetic properties, Mössbauer spectroscopy characterization, and applications. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 3, p. 969-982, 2002.

ZIMMERMANN, Peter et al. Adaptation and evaluation of the PrepFiler™ DNA extraction technology in an automated forensic DNA analysis process with emphasis on DNA yield, inhibitor removal and contamination security. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 2, n. 1, p. 62-63, 2009.

ANEXOS

Anexo A – Sequência completa da fita sense da amostra

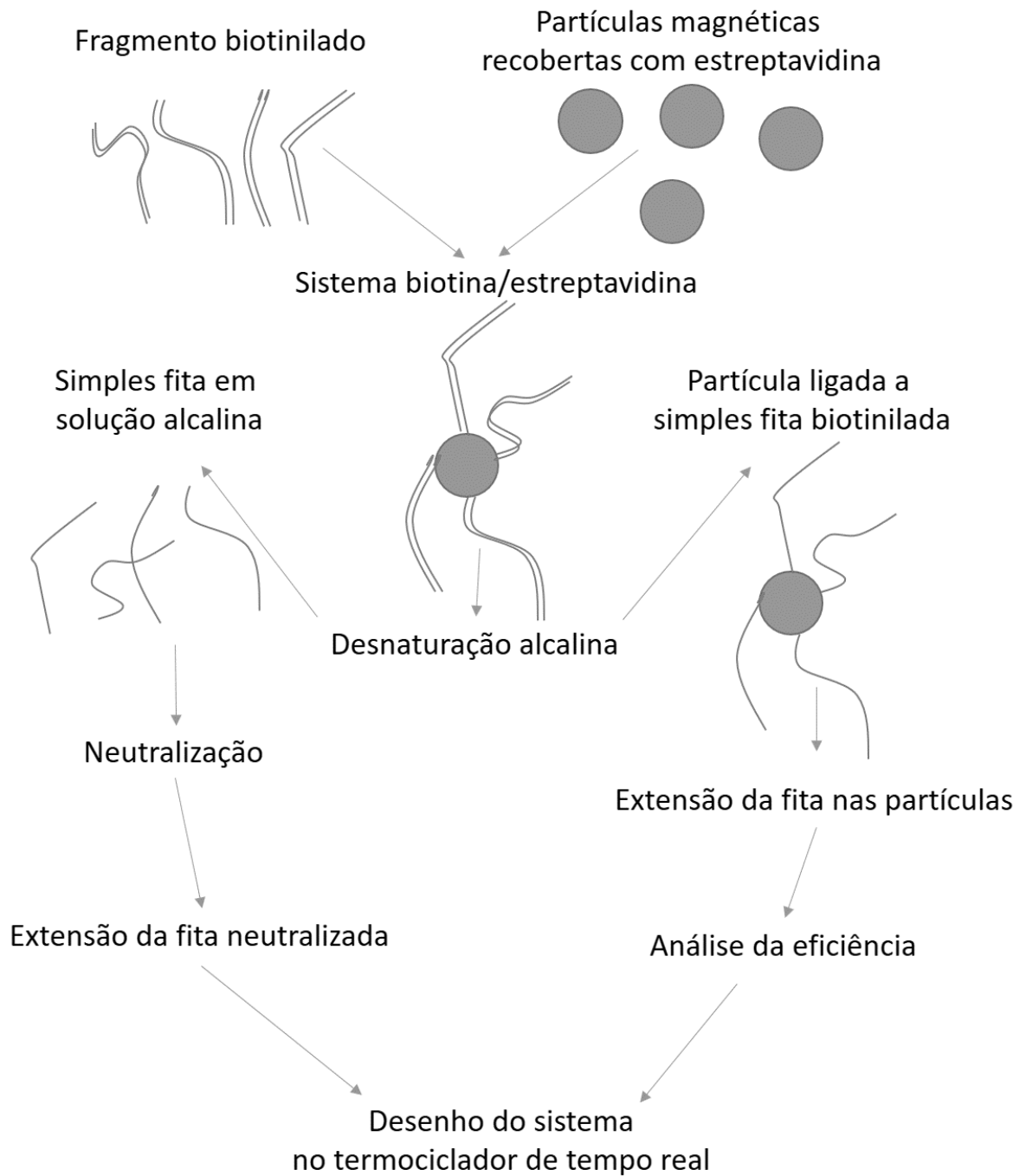
5'-TAATACGACTCACTATAGGG.

.....AAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTT
 TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTGG
 CTGCGAGCCCTGGGCCTCACCCGAACCTGGGGGGTGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCG
 TATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGT
 TTATGAACAAACGACCCAACACCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGGTTC
 CTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCTAGCAAGCTTGATATCGAATTGTACC
 TAGTGGAACCGGAACCCTTAAACATGTATAAATTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGT
 CCCTCGACGAATTCGCCCTTAATTTACATGTGCCACTGTTACAGGAACAGGTGGTGGCGGCCCTCG
 GTGCGCTCGTACTGCTCCACGATGGTGTAGTCCCTCGTTGTGGGAGGTGATGTCCAGCTTGGCGTCCA
 CGTAGTAGTAGCCGGGACGCTGCACGGGCTTCTTGGCCATGTAGATGGACTTGAACCTCACCAGGT
 AGTGGCCCGCGTCCTCAGCTTCAGGGCCTTGTGGGTCTCGCCCTCAGCACGCCGTCGCGGGGGT
 ACAGGCGCTCGGTGGAGGCCTCCAGCCCATGGTCTTCTTCTGCATCACGGGGCCGTCGGAGGGGA
 AGTTCACGCCGATGAACCTCACCTTGTAGATGAAGCAGCCGTCCTGCAGGGAGGAGTCTGGGTCA
 CGGTGCGCACGCCGCGCTCCTCGAAGTTCATCACGCGCTCCCACTTGAAGCCCTCGGGGAAGGACA
 GCTTCTTGTAGTCGGGGATGTCGGCGGGGTGCTTACGTACACCTGGAGCCGTAAGTGGAACTGGG
 GGGACAGGATGTCCCAGGCGAAGGGCAGGGGGCCGCCCTTGGTACCTTACGCTTACGGTGTGT
 GGCCCTCGTAGGGGCGGCCCTCGCCCTCGCCCTCGATCTCGAACTCGTGGCCGTTACGGTGCCCTC
 CATGCGCACCTTGAAGCGCATGAACCTCGGTGATGACGTTCTCGGAGGAGGCCATGGTATTATCATC
 GTGTTTTTCAAAGGAAAACCACGTCCCCGTGGTTCGGGGGGCCTAGACGTTTTTTAACCTCGACTA
 AACACATGTAAGCATGTGCACCGAGGCCCCAGATCAGATCCCATAACAATGGGGTACCCAGCTTG
 GAGGTGCACACCAATGTGGTGAATGGTCAAATGGCGTTTATTGTATCGAGCTAGGCACTTAAATAC
 AATATCTCTGCAATGCGGAATTCAGTGGTTCGTCCAATCCATGTCAGACCCGTCTGTTGCCTTCTTA
 ATAAGGCACGATCGTACCACCTTACTTCCACCAATCGGCATGCACGGTGCTTTTTCTCTCCTTGTA
 GGCATGTTGCTAACTCATCGTTACCATGTTGCAAGACTACAAGAGTATTGCATAAGACTACATTTCC
 CCCTCCCTATGCAAAAGCGAAACTACTATATCCTGAGGGGACTCCTAACC GCGTACAACCGAAGCC
 CCGTTTTTCGCTAAACACACCCTAGTCCCCTCAGATACGCGTATATCTGGCCCGTACATCGCGAAG
 CAGCGCAAAACGCCTAACCCCTAAGCAGATTCTTCATGCAATTGTCGGTCAAGCCTTGCCTTGTTGTA
 GCTTAAATTTTGCTCGCGCACTACTCAGCGACCTCCAACACACAAGCAGGGAGCAGATACTGGCTT
 AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCACCATACGGATCTGCGATGATAAGCTGTC
 AAACATGAGAATTGGTCTGGTTCTTTCCGCCTCAGGACTCTTCTTTTTTCAATAAATCAATCTAAA
 GTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGC.....

.ACTGGCCGTCGTTTTACA-3`

Fonte: O autor (2017)

Anexo B – Fluxograma do processo de obtenção da simples fita para desenho do sistema



Fonte: O autor (2017)