

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO MESQUITA FILHO”

SUELLEN CRISTINA DA SILVA SANTOS

Relatório de estágio realizado no IBTEC - laboratório de Virologia e Diagnóstico  
Molecular para conclusão de Curso de graduação em Ciências Biológicas.

BOTUCATU

2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu

SUELLEN CRISTINA DA SILVA SANTOS

**Relatório de estágio realizado no IBTEC - laboratório de Virologia e  
Diagnóstico Molecular para conclusão de Curso de graduação em Ciências  
Biológicas**

TCC- Trabalho de Conclusão de Curso -  
instrumentação, realizado no IBTEC, na  
área de tecnologia para finalizar o curso de  
Bacharel em Ciências Biológicas na  
Universidade Estadual Paulista "Júlio

Mesquita Filho" no Instituto de Biociências  
de Botucatu.

**Orientador:** Prof. João Pessoa Araújo Júnior

**Co-orientadora:** Dra. Camila Dantas Malossi

**Botucatu**

**2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Suellen Cristina da Silva.

Relatório de conclusão de curso do estágio realizado no IBTEC  
- laboratório de virologia e diagnóstico molecular : relatório  
de estágio / Suellen Cristina da Silva Santos. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências  
Biológicas - Bacharel ) - Universidade Estadual Paulista "Júlio  
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Coorientador: Camila Dantas Malossi

Capes: 20804008

1. Biologia molecular. 2. Técnicas de laboratório clínico.  
3. Virologia.

Palavras-chave: Biologia molecular; Técnicas laboratoriais;  
Virologia.

**Suellen Cristina da Silva Santos**

Relatório de Conclusão de Curso do estágio realizado no IBTEC –  
laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular

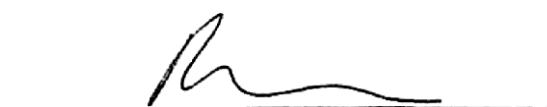
Trabalho de Conclusão de Curso - instrumentação, realizado  
no IBTEC, na área de tecnologia para finalizar o curso de  
Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no Instituto de Biociências de  
Botucatu.

Orientador: Prof(a): Dr(a). João Pessoa Araújo Júnior

Comissão examinadora



Prof(a). Dr(a). João Pessoa Araújo Júnior  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Prof(a). Dr(a). Paulo Eduardo Martins Ribolla  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, 28 de outubro de 2022

## **Resumo**

SANTOS, S. C. S. Relatório de Conclusão de Curso do estágio realizado no IBTEC - laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular. 2022. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

O estágio que foi realizado no IBTEC, faz parte do currículo do curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Unesp de Botucatu. É um relatório obrigatório, onde foi feito registros do que foi acompanhado no Laboratório de Virologia e Diagnostico Molecular.

Foi escolhido o estágio de instrumentação, para aprender e complementar a formação acadêmica.

## **Abstract**

SANTOS, S. C. S. Course Completion Report of the internship carried out at IBTEC – laboratory of Virology and Molecular Diagnosis. 2022. 30of. Course Completion Work – Botucatu Institute of Biosciences, Paulista State University, Botucatu, 2022.

The internship that was carried out at IBTEC is part of the curriculum of the Biological Sciences Baccalaureate course at Unesp in Botucatu. It is a mandatory report, where records were made of what was followed up in the Laboratory of Virology and Molecular Diagnostics.

The instrumentation internship was chosen to learn and complement academic training.

## Sumário

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introdução .....</b>                                                                                  | <b>8</b>  |
| <b>Protocolos e Técnicas de rotinas .....</b>                                                            | <b>10</b> |
| <b>Acompanhamento das pesquisas realizadas no laboratório de virologia e diagnóstico molecular .....</b> | <b>29</b> |
| <b>Considerações finais .....</b>                                                                        | <b>33</b> |
| <b>Referências .....</b>                                                                                 | <b>34</b> |

## Introdução

O estágio curricular obrigatório de instrumentação do curso de bacharelado em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências foi realizado no Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular no período de setembro de 2020 a outubro de 2022 localizado no Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu. Esse laboratório está sob responsabilidade do Professor Dr. João Pessoa Araújo Júnior, orientador do estágio e a Bióloga e Técnica no IBTEC, Dra. Camila Dantas Malossi, que atuou como Coorientadora.

Por conta da pandemia do novo coronavírus, foi criado o Laboratório de Apoio ao Diagnóstico (LAD), dentro do IBTEC, que realiza diagnóstico massivo de Covid de diversas cidades do estado de SP. Além de realizar testes de todos os funcionários e alunos do Instituto de Biociências da Unesp- Botucatu.

A área de formação escolhida no estágio curricular obrigatório é de Biotecnologia. Para aprender análises e diagnósticos moleculares.

Para atuar no laboratório, é imprescindível saber sobre conceitos de biossegurança e disposição de resíduos perigosos.

Para trabalhar no laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular também é muito importante ter conhecimentos de Biologia Molecular.

Entre as principais técnicas de Biologia Molecular utilizadas para diagnóstico de doenças infecciosas e genéticas, está a reação em cadeia da polimerase, suas variantes e aplicações. De acordo com Bianco e Lipai (2015),

“A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi desenvolvida na década de 1980 por Kary Mullis, que recebeu, em 1993, o prêmio Nobel. Essa técnica possibilita a síntese de fragmentos de DNA a partir de sequências-alvo de DNA definidas, capazes de gerar uma quantidade essencialmente ilimitada de uma sequência de interesse, e pode ser executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células”.

Além das linhas de pesquisa onde o laboratório investiga, ele também oferece serviços de diagnóstico molecular, como extração de DNA e sequenciamento de DNA.

Esses serviços contam com o apoio da FUNDIBIO (Fundação do Instituto de Biociências), fundação sem fins lucrativos e de direito privado instituída pela UNESP.

O objetivo do estágio foi ter experiência com rotina do laboratório, conhecer marcas e formas de compra dos materiais, reagentes e equipamentos e o funcionamento de equipamentos e ferramentas presentes em um laboratório de Diagnóstico Molecular.

## **Protocolos e Técnicas de rotinas acompanhadas no laboratório de diagnóstico molecular**

### **Extração de beads magnéticas para soro, saliva e sangue (PCV2)**

Reagentes utilizados:

- 1- Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ Carboxylate-Modified Dia.: 1 µm; 3 EDAC/PA5; 15 mL [50 mg/mL] - GE Healthcare (diluídas 1:25 em TE)
- 2- Tampão GITC (1 M TRIS – HCL pH 7,8 a 8,0; 0,5 M EDTA; 10 M NaOH; Isotiocianato de Guanidina (GITC) e N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl))
- 3- Isopropanol 100%
- 4- Proteinase K
- 5- Etanol 70% (preparado no dia)
- 6- Tampão de Eluição (5mM Tris-HCl pH 8,5 (diluídos em água nuclease-free));

Procedimentos:

#### **1- Solução de Lise:**

- a) Em um tubo de 1,5 ml adicione 350 µl do tampão GITC, 350 µl Isopropanol, 10 µl Proteinase K e 100 µl de amostra (soro, sangue e saliva)
- b) Homogeneizar com a pipeta de 1.000 µl “up and down” (6x)
- c) Adicionar 80 µl de beads magnéticas
- d) Homogeneizar com a pipeta de 1.000 µl “up and down” (6x)
- e) Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos
- f) Colocar o tubo na rack magnética por 1 minuto, posteriormente descartar o sobrenadante

#### **2-Solução de Lavagem:**

- a) Com o tubo ainda magnetizado, adicionar 250 µl de Isopropanol e 250 µl de GITC

b) Retirar o tubo da rack e homogeneizar com a pipeta de 1.000 µl “up and down” (6x) \*Importante: homogeneizar a solução até que a mesma fique homogênea.

c) Colocar o tubo na rack até a solução clarificar, em seguida descartar o sobrenadante

d) Com o tubo ainda magnetizado, adicionar 500 µl de Etanol 70%

e) Retirar o tudo na rack e homogeneizar com a pipeta de 1.000 µl “up and down” (6x)

f) Colocar o tubo na rack até a solução clarificar, em seguida descartar o sobrenadante

g) Com o tubo ainda magnetizado, retirar o álcool residual com o auxílio de uma pipeta de 10 ou 20 µl e incuba-lo aberto a temperatura ambiente por 1 minuto.

### **3- Solução de Eluição:**

a) Com o tubo ainda magnetizado, adicionar 100 µl do Tampão de Eluição

b) Retirar o tudo na rack e homogeneizar com a pipeta de 1.000 µl “up and down” (6x) e incuba-lo a temperatura ambiente por 5 minutos

c) Colocar o tubo na rack magnética, incubar por 1 minuto e retirar o sobrenadante contendo o material genético para um novo tubo.

### **Sequenciamento Sanger**

O sequenciamento Sanger é importante porque permite descobrir a sequência exata de um fragmento de DNA.

Ele pode ser usado para analisar mutações e polimorfismos, genotipagem de vírus, análise de DNA mitocondrial, entre outros.

Ele é feito em três etapas: reação de Sanger, eletroforese capilar para separação dos fragmentos gerados na reação de Sanger e análise da sequência obtida.

É feita a amplificação da região de interesse por PCR, antes do sequenciamento Sanger.

E depois é realizada a reação de Sanger, que é composto por DNA molde, produto de PCR ou plasmídeo purificado, apenas 1 primer, e Master Mix contendo dNTPs e cada um dos dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcadas com fluoróforos específicos.

a) Reação de Sanger no termociclador

Primeiro fazer o mix da reação que será utilizado em cada poço junto com as amostras.

Reação sequenciamento:

Mix:

1,5ul 5X sequencing buffer (se BigDye versão 3.0 ou anterior, usar save money)

1ul BigDye v3.1

4,5ul H<sub>2</sub>O Nuclease free

Em uma placa de 200ul adicionar 7ul do mix de sequenciamento em cada poço e 3ul de cada amostra, DNA (100-200 ng sem contar o vetor) ou produto de PCR, totalizando 10ul. Após isso colocar no termociclador para amplificar. Depois de amplificadas as amostras é feita a precipitação.

O número de diferentes cópias possíveis que aparece ao final da reação é a combinação do número de ciclos realizados no programa da PCR.

Precipitação da Reação de Sequenciamento usando glicogênio:

Mix de precipitação para uma placa 96 wells:

2750ul de etanol 100% gelado

110ul de 3M NaOAc pH5,2

110ul de glicogênio 1mg/ml

1. Aos 10 ul da reação de sequenciamento adicionar 20 ul do mix de precipitação.

2. Vortexar e manter em gelo por 15 minutos ou freezer -20°C.
3. Centrifugar 4.000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente.
4. Inverter e descartar o excesso, dando a seguir um pulso de 1000 rpm com a placa invertida.
5. Adicionar 50ul de etanol 70% gelado por reação e não vortexar.
6. Repetir a centrifugação (10 min) e a drenagem dos tubos (passos 3 e 4).
7. Secar por 1 hora em lugar protegido da luz (ou 1 minuto 96°C no termociclador aberto).
8. Adicionar 10ul de formamida e deixar por 2 minutos no termociclador.
9. Dar um choque térmico na placa e levar para o sequenciador.

*b) Eletroforese capilar para separação dos fragmentos de Sanger*

Depois da placa amplificada e precipitada é colocada dentro do sequenciador automático de DNA, o 3500. Neste equipamento há um laser. Como os nucleotídeos estão ligados a moléculas fluorescentes, que são capazes de receber energia, excitar seus elétrons e devolver a energia na forma de luz, o equipamento consegue fazer a leitura de cada nucleotídeo e realizar o sequenciamento.

É difícil sequenciar um fragmento de mais de 800pb, devido às limitações da eletroforese capilar.

*c) Análise da sequência obtida*

Para analisar os resultados do sequenciamento tem que ter um software para essa análise. Existem muitos, alguns pagos e outros grátis. Mais de uma curva presente no programa de leitura pode indicar mutações ou polimorfismos. Usamos o software Sequencing Analysis Software 6, onde conseguimos ler as sequências e analisar sinais de cada uma, bases e etc.

## **Sequenciamento de Nova Geração (NGS)**

O Sequenciamento NGS permite que seja feito o sequenciamento do DNA em larga escala, diferente do realizado pelo método de Sanger. No NGS, é possível analisar milhões de fragmentos simultaneamente em uma única corrida, enquanto na técnica de Sanger o sequenciamento é feito de forma individual, tornando o processo mais lento.

Esse método é dividido em quatro passos: construção de uma biblioteca de fragmentos com adaptadores e marcadores, amplificação por PCR modificada, sequenciamento e análise dos resultados.

A primeira parte, construção de bibliotecas é importante para gerar fragmentos de tamanho correto, adicionar adaptadores às extremidades de cada fragmento e também marcadores de amostra. Os fragmentos de tamanho correto são importantes para compatibilidade com a tecnologia e podem ser gerados por digestão enzimática, quebra mecânica ou PCR.

O sequenciamento começa com uma amostra que é processada de modo a extrair e amplificar o código genético das células que estão ali contidas. Após esse processo, o DNA amplificado é submetido ao sequenciamento, onde o equipamento gera milhões de pequenos fragmentos desse DNA. Esses fragmentos são lidos pelo aparelho que compara os genes da amostra com um banco de dados. Assim, é possível identificar alterações na amostra com base na comparação com esse banco de dados.

Logicamente, a quantidade de dados gerados em um exame como esse é imensa e levaria muito tempo para realizar uma análise manualmente. Por isso, ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para transformar o volume de dados gerados em um arquivo que contenha apenas as informações mais relevantes para a posterior interpretação e análise pelo médico especialista.

O sequenciamento de nova geração está ficando cada vez mais acessível devido aos avanços e pesquisas na área de Biologia Molecular, e porque é possível sequenciar várias amostras em um único exame com extrema precisão, o que reduz os custos e torna o teste acessível. Com ele é possível realizar genotipagem,

identificação humana, detecção de mutações, análise de expressão gênica, detecção de aneuploidias, entre muitos outros.

### **Purificação de DNA/RNA com beads**

A purificação serve para separar o material genético do gel de agarose ou quaisquer outros reagentes que possam estar misturados a ele. Há vários meios de fazer isso, um deles é usando um tampão para degradar o gel e assim poder lavá-lo. Usa-se 100 µL do tampão para 100 mg de gel, numa proporção de 1:1.

- 1) Em um Tubo de 1,5ml homogeneizar o volume do produto e o volume de beads e incubar por 5 minutos para se ligar.
- 2) Colocar na estante magnética por 5 minutos . As beads são deslocadas para a lateral do microtubo levando o DNA. Descartar o sobrenadante sem perturbar as beads.
- 3) Adicionar 200ul de 70%, pois ele não interfere no DNA e serve para tirar resquícios dos reagentes usados antes. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto na estante magnética. Descartar o sobrenadante sem perturbar as beads.
- 4) Repetir o passo 3.
- 5) Utilizar pipeta de 10ul para retirar todo o sobrenadante. Manter os tubos abertos na estante magnética e aguardar 5 minutos para que o etanol evapore.
- 6) É importante não deixar as beads secarem totalmente, observar o ponto onde ela começa a ficar com uma coloração opaca e antes que ela “craquelar”. Retirar o tubo da estante magnética e adicionar 50ul de H<sub>2</sub>O NF e homogeneizar bem.
- 7) Incubar por 5 minutos fora da estante magnética.
- 8) Voltar o tubo para a estante magnética e aguardar 2-5 minutos até clarear.
- 9) Retirar o sobrenadante (eluído e armazenar em um novo tubo (-20°C).

A água possui alta afinidade com o DNA e, portanto, ele se desliga da bead e passa a se ligar com o DNA. Por isso, é usada com tampão de eluição.

Após a purificação analisa-se a concentração de DNA, ácidos nucleicos obtida no espectrofotômetro com índice de absorbância a 260nm. Ele nos fornece apenas uma estimativa aproximada, não é preciso e, portanto, é útil em alguns tipos de análise apenas.

### **PCR convencional**

A PCR convencional é muito utilizada no laboratório de biologia molecular. É um método de amplificação do material genético.

Reagentes:

- Enzima DNA polimerase;
- sal que forneça íons  $Mg^{2+}$ ;
- Nucleotídeos trifosfatados;
- Tampões;
- Moldes de DNA;
- Água nucleasse free;
- Primers;
- Termociclador;

Depois de fazer a reação com os reagentes para amplificar é colocado no termociclador com o ciclo ideal de temperatura para as reações.

A primeira temperatura é para a desnaturação da fita de DNA. Já a segunda temperatura para o anelamento dos primers. E a última para a extensão dos alvos.

Essa técnica é muito utilizada para fazer testes genéticos, onde é possível observar mutações por gel, e realizar o sequenciamento.

## **Eletroforese**

A eletroforese é realizada com:

- gel de agarose de acordo com o tamanho dos produtos separados;
- cuba de eletroforese;
- fonte de energia com cargas opostas as extremidades da cuba;
- corante fluorescente;
- equipamento com luz UV para visualizar o gel;

Primeiro é feito o gel de agarose, onde é colocado no campo elétrico com cargas opostas na cuba. Sua concentração varia de acordo com o tamanho das moléculas que serão separadas. Depois é colocado o tampão da cuba, que é 1:1 de água TBE (Tampão Tris Borato EDTA). Nesse tampão tem íons que fazem as amostras migrarem.

Esse processo de migração pode demorar 15 minutos para ocorrer, onde o material genético que tem carga negativa, migra para o polo positivo.

Com a eletroforese é possível certificar que houve amplificação específica e detectar patógenos em amostras, identificar algumas mutações, analisar tipos de hemoglobina circulante, realizar teste de paternidade entre outras aplicações (KASVI, 2015).

Nos resultados para analisar podem aparecer bandas inespecíficas, que podem acontecer por conta de outras amplificações. Isso pode ser do gene ou também de outros organismos.

Usamos o SYBR safe que proporcionam resultados semelhantes ao Brometo de etídeo, que era utilizado antes com intercalante. Porém ele é muito tóxico e cancerígeno, por isso atualmente ele não é mais utilizado.

## **ELISA**

Elisa é uma técnica muito utilizada para detectar anticorpos ou antígenos em uma amostra. Os passos para fazer Elisa são reações anticorpos-antígenos, que é detectável por reação enzimática.

A placa tem carga positiva, por isso utilizamos a proteína em tampão carbonato para ficar negativa.

Experimento:

### **Dia 1- Anticorpo de captura - 8mg/ml**

Em um reservatório colocar 5ul do Ac e 7,995 ml de tampão TCB.

Adicionar 50ul em cada poço da placa, menos no branco e levar na geladeira 4 graus por 18 horas.

### **Dia 2 - bloqueio**

Usar 10% de leite em pó desnatado( LPD) + tampão TCB- 96x 300 ul - volume de cada poço.

Pesar no copinho descartável

Pegar a placa da geladeira, colocar primeiro PBS.

Tirar a placa de lavagem e colocar a de ELISA da geladeira.

Lavar 1x

Tirar do equipamento e bater no papel.

Adicionar 300ul da solução de bloqueio em cada poço.

Colocar na câmara úmida/ estufa a 37 graus por 1 hora.

### **Antígeno**

Preparar o diluente( solução para diluir o antígeno)

10% de LPD + tampão PBS tween

Pegar 200ul dos diluentes e adicionar nos empedorffs. Pegar 200ul da amostra puta e adicionar no primeiro eppendorffs. Desse pegar 200ul e passar para o outro é assim por diante.

Pegar a placa da estuda e fazer as lavagens no equipamento 1x

Bater a placa

Adicionar 50ul da amostra nos poços.

Colocar na câmara úmida- estufa 37 graus por 1 hora.

**- Antígeno:**

Preparar 70% do antígeno e 30% da mistura LPD+ PBST.

Adicionar a placa á lavagem e bater nela.

Adicionar 50ul da solução em cada poço.

Câmara úmida – estufa 37° por 1 hora.

**- Conjugado:**

Diluir o conjugado para 1:1000, utilizando 10% de LPD + PBST. ( EX: 2 ml de LDP + PBST e 2 ul conjugado).

Fazer a lavagem da placa e bater ela.

Adicionar 50ul em cada poço.

Câmara úmida –estufa 37° por 1 hora.

**- Substrato TMB:**

Colocar 10 ml de tampão TCA( extrato – acetato em temperatura ambiente) + 100 ul do conjugado ( TMB – 10mg/ml). Exemplo: 0,01 g para 1 ml de DM50 + 2,5 ul de H<sub>2</sub>O.

Pegar a placa e lavar 1x e bater nela.

Adicionar 50ul em cada poço.

Homogenizar por 15 minutos ( colocar tampa).

- Bloqueio de reação colorimétrico:

Adicionar 25ul de HCL 2M em cada poço, para parar a reação.

Depois as placas são lidas no leitor de ELISA. Esse leitor lê a absorbância de cada poço da placa. Por último a placa é descartada.

## **qPCR**

A qPCR é uma derivação das descobertas de Karry Mullis na década de 80 que tem como principais características a detecção e quantificação de fluorescência emitida durante cada ciclo de uma reação de PCR e a sensibilidade de detectar poucas cópias de DNA presentes em uma dada amostra. Se uma pessoa estiver trabalhando com amostra de RNA, inicialmente é necessário realizar a sua conversão para DNA complementar (cDNA) antes com reagentes específicos, etapa conhecida como transcrição reversa (RT). Portanto, a PCR que utiliza o RNA como molde é conhecida como RT-qPCR.

Essa técnica é útil para diagnóstico de doenças infecciosas, em microbiologia para segurança alimentar, fermentação e qualidade da água, estudos sobre expressão gênica, detecção de patógenos virais (RNA e DNA), etc. Esse é um método padrão ouro que é utilizado para diagnóstico de COVID-19.

Na qPCR precisamos desenhar com cuidado e submeter a processos de purificação os primers utilizados. Isso tem que ser maior que os primers da PCR convencional. O amplicon da qPCR deve ser menor nas reações de PCR convencionais que devem ser preferencialmente de 80 a 200 pb (pares de base).

A reação de qPCR pode dar falso positivo devido a amplificações inespecíficas. Dessa forma, é usado a Curva de Melting quando a reação é realizada com agentes fluorescentes intercalantes como o SYBR green. Nessa curva, metade do DNA da reação fica com a fita aberta, o que faz o perfil de amplificação do seu alvo.

O termociclador em tempo real, equipamento utilizado, possui uma série de luzes que emitem comprimentos de onda específicos para detectar a fluorescência das cópias geradas.

Para um ensaio focado na expressão de genes por exemplo, a partir do gráfico gerado ao término da reação, é traçada uma linha de maneira paralela ao eixo referente ao número de ciclos (abscissas), na altura em que se inicia a fase exponencial da amplificação gênica (início da elevação exponencial na emissão da fluorescência). Este parâmetro representa o limiar de detecção, ou seja, o número mínimo de ciclos para amplificação, e é denominado “threshold”.

O ponto em que o “threshold” cruza com a linha de amplificação da amostra, permite determinar o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo presente no DNA de cada amostra. Este valor é denominado Ct (“Cycle Threshold”) e permite a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras, após ser corrigido pelos Ct dos genes-controle endógenos e das amostras-controle.

“O baseline pode ser equiparado ao ruído de fundo e deve ser definido para cada reação empiricamente. A linha de base se refere aos níveis de fluorescência detectados durante os ciclos iniciais da PCR e é importante para a determinação precisa do Ct.”

O Ct é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene-alvo em uma determinada amostra, quanto menor for o número inicial do Ct obtido do gene-alvo na amostra, é porque houve maior amplificação do gene-alvo e, consequentemente, ele apresenta maior expressão.

“O threshold é o limiar da reação de PCR em tempo real, o nível do sinal que reflete um aumento estatisticamente significativo sobre o sinal de linha de base calculado.”

### **PCR digital**

A PCR digital é uma tecnologia inovadora que fornece quantificação ultrassensível e absoluta de ácidos nucleicos. É particularmente útil para alvos de baixa abundância, alvos em fundos complexos, variantes alélicas (SNPs) e para monitorar mudanças sutis nos níveis alvo que não podem ser detectados com PCR em tempo real.

A PCR digital melhora a sensibilidade da qPCR e permite a detecção de eventos raros, tais como: mutações de um único nucleótido numa população de sequências de tipo selvagem.

A amostra é preparada semelhante à PCR em Tempo Real, mas separada em milhares de partições, cada uma contendo idealmente zero ou uma molécula molde. Cada partição comporta-se como uma reação de PCR individual e, tal como a PCR em Tempo Real, são utilizadas sondas fluorescentes para identificar o DNA alvo amplificado.

A PCR Digital é bem adequada para aplicações que requerem detecção de pequenas quantidades de ácido nucleico ou uma resolução precisa da quantidade de DNA alvo entre amostras, por exemplo, detecção de sequências raras e análise de variação de número de cópias (CNV).

## **Clonagem**

A clonagem é o processo de obtenção de réplicas idênticas de um fragmento de interesse.

O primeiro passo é buscar as características básicas do gene e proteína de interesse. É necessário buscar e conhecer as características da proteína, e do gene, sua toxicidade, se ela sofre modificações, entre outros.

A expressão de proteínas recombinantes pode ser feita em sistemas heterólogos tanto em organismos de origem eucariota, como procariota, plantas transgênicas também podem ser utilizadas como biorreatores para produzir proteínas de interesse. Células procariotas são mais usadas devido a menor complexidade e maior facilidade de manipulação, além do rápido processo de reprodução e baixo custo.

A clonagem insere um gene de interesse a partir do uso de enzimas de restrição em um plasmídeo (DNA circular bacteriano) e inseri-lo em um organismo adequado. Também é importante colocar um gene marcador para proporcionar meios para selecionar as células transformadas. Esse gene marcador na maioria das vezes é um que confere resistência a antibióticos, no caso de uso de vetor bacteriano.

A introdução do vetor recombinante requer a desestabilização da membrana do organismo utilizado. Para isso pode ser utilizada a técnica de eletroporação, em que uma carga elétrica é aplicada às células bacterianas, causando instabilidade na membrana e possibilitando a entrada dos vetores recombinantes, ou também pode ser utilizada a técnica de choque térmico, que também desestabiliza as membranas.

Essa técnica para ser realizada precisa de meios controlados para evitar contaminações, alguns passos são realizados em salas específicas, outros em fluxo laminar próximo a chama do bico de Bunsen.

### **13) Diagnóstico Genético**

É realizado no laboratório o teste genético para diagnóstico de diversas doenças, consiste em amplificar uma pequena quantidade de DNA e RNA usando o processo de reação em cadeia da polimerase. Uma região de um gene conhecidamente envolvido na doença é amplificada, depois é sequenciado o produto amplificado da amostra e o resultado com as bases nitrogenadas são analisados.

Conforme descrito na literatura, podemos saber se um indivíduo é homozigoto ou heterozigoto, selvagem ou afetado. A sexagem é uma forma de descobrir o sexo de alguns organismos, como aves, a partir de exames moleculares de DNA. Foi realizado um teste de primers para diagnóstico de algumas doenças.

O diagnóstico genético também pode ser utilizado para detecção de alguns patógenos, como citado anteriormente para o caso do Sars-Cov-2. Citomegalovírus é um vírus altamente letal para as tilápias. Esse é um dos poucos laboratórios que fazem esse tipo de diagnóstico. O gene é detectado por PCR, se houver amplificação do gene, a presença do vírus é constatada.

### **Diagnóstico de COVID-19**

O diagnóstico realizado no laboratório (LAD) é o que utiliza padrão ouro para COVID-19. Esse exame é feito por PCR em tempo real. Para realizar esse diagnóstico é preciso preparar as amostras para poder amplificar uma região do gene E, essa região codifica a proteína do Sars-Cov-2. Pode acontecer de ter casos de resultados

inconclusivos. Nesses casos é necessário fazer uma tentativa de amplificação dos genes N1 e N2 do capsídeo do vírus. Se os dois genes derem positivo, o resultado do exame será positivo. O resultado que apenas um gene apresenta amplificação da amostra, pode ser que a mesma seja referente a outros tipos de coronavírus.

Para montar a placa da reação é preciso ter o controle da extração, o controle endógeno e os controles positivo e negativo. O controle de extração participa de todos os processos da extração de ácidos nucleicos, ele contém apenas água. Esse controle deve ser negativo para constatar que não ocorreu nenhuma contaminação na extração. O controle endógeno é o gene humano que codifica a RNAase P, é importante, pois se todas as amostras amplificarem para ele, garante que a extração foi realizada com sucesso. Já para mostrar que as amostras foram bem manipuladas, sem contaminações, é preciso do controle negativo. E o controle positivo que é importante para ter uma curva de base para comparação.

Com a pandemia houve uma alta demanda desses testes. Por isso alguns robôs foram comprados e são utilizados no processo. É preparada uma placa de extração onde cada coluna apresenta um reagente necessário para a extração com beads magnéticas. O robô faz a passagem das amostras por cada pocinho, deixando as amostras extraídas em colunas específicas para isso.

As amostras que são utilizadas nas placas de extração ficam armazenadas no  $-80^{\circ}\text{C}$  por até 2 horas, podendo ser utilizadas para repetições se algo der errado no diagnóstico. Depois de extraídas no robô, essas amostras são transferidas para a placa de armazenamento para poderem ser submetidas depois à reação de amplificação. Para a qPCR, coloca-se os reagentes necessários nessa placa.

A qPCR detecta a fluorescência que a amplificação emite, esses dados são fornecidos por gráficos. Para interpretar esses resultados do exame é importante analisar os gráficos e Ct. Quando o resultado é positivo, o gráfico fornecido apresenta uma curva de crescimento exponencial que deve começar a aumentar até o Ct 45. Já se os resultados forem negativos, apresentam curva não elevada. Curvas mal formadas são consideradas resultados inconclusivos.

Alguns resultados podem apresentar curvas obtidas com comportamento fora do padrão esperado ou observado. Apenas nesses casos específicos, algumas

amostras são analisadas novamente para um diagnóstico mais preciso. Após analisados, os resultados são lançados no sistema GAL, o sistema de saúde do SUS.

#### **14) Bioinformática no laboratório de Diagnóstico Molecular**

Programas de bioinformática para analisar o alinhamento e comparação de sequências é muito importante. Existem vários programas que realizam esse processo, como o BLASTn ( Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide), que é um algoritmo que faz a comparação de sequências fornecidas em banco de dados.

Também são importantes softwares de desenho de primers, que ajudam e facilitam fazer os desenhos dos mesmos. Eles fornecem dados dos primers desenhado.

Os softwares de leitura de PCR em tempo real também é importante para fornecer dados de cada reação realizada. Geralmente eles acompanham os equipamentos já.

O PRIMER BLAST é importante porque é um programa que consegue ler sequências e apresentar características de nucleotídeos de primers, como tamanho, temperatura e etc.

#### **Equipamentos do Laboratório de Diagnóstico Molecular**

##### **1) Termobloco**

O termobloco ou banho seco tem várias aplicações em microbiologia e análises clínicas em ações envolvendo a incubação, inativação e concentração de amostras, análises enzimáticas, entre outras opções. É um equipamento que pode atingir temperaturas extremas, é preciso e constante.

## **2) Termociclador**

Termociclador é um equipamento importante que automatiza o processo de amplificação de uma sequência específica de DNA a partir de uma pequena amostra. A multiplicação de materiais genéticos foi fundamental para o desenvolvimento de novas pesquisas no campo da biologia molecular. Esse equipamento pode ser programado e atingir diferentes temperaturas com tempos diferentes. Também é possível controlar a temperatura da tampa.

Antes da sua criação, as reações eram feitas em banho maria manualmente, por isso esse equipamento facilita muito as rotinas de diagnósticos moleculares.

## **3) Centrífugas**

Centrífugas nos laboratórios é um equipamento que permite a realização de testes que envolvem separação de partículas, remoção de umidade e microfiltração. A centrífuga para laboratório é um equipamento que realiza a separação rápida e eficaz de amostras contidas dentro de um material. Pode ser utilizada para dar um spin down, que nada mais é do que fazer toda a substância do tubo descer para o fundo. Essa técnica é muito importante para evitar contaminações.

Todos os materiais colocados na centrífuga devem estar balanceados, pois ela pode desequilibrar se não estiver tudo balanceado corretamente.

## **4) Fotodocumentador**

Esse equipamento é utilizado para fotografar o gel de eletroforese. Existe a maneira de gravar as fotos no equipamento, além de conseguir passar para um pendrive.

Para realizar fotos por fluorescência é preciso usar corante de DNA com fluoróforos no gel. Esse gel é colocado no equipamento com luz ultravioleta para realizar a documentação.

## **5) Fluxo laminar**

Fluxo Laminar é um fluxo em que o vector velocidade é aproximadamente constante em cada ponto do fluido. A função da cabine de fluxo laminar é oferecer um ambiente estéril, que dê segurança à manipulação de materiais biológicos ou estéreis. Esses processos precisam ser protegidos de qualquer contaminação do ambiente. Nesse caso, a proteção é apenas das amostras. As cabines de fluxo laminar podem ser horizontais ou verticais. Nas primeiras, ocorre 100% da renovação do ar; enquanto nas segundas, 100% da recirculação do ar. Ambas são equipadas com filtro HEPA, podendo ter lateral em inox ou vidro.

## **6) NanoDrop**

O NanoDrop ND-1000 é um espectrofotômetro de espectro completo (220-750nm) que quantifica amostras de DNA, RNA e proteínas com alta reprodutibilidade e precisão.

É um equipamento desenvolvido para a mensuração rápida e precisa de amostras de DNA, RNA e de proteínas, sem a necessidade de diluições.

O Nanodrop utiliza comprimentos de onda de luz ultracurtos com alta energia deixando sua luz mais forte que a maioria dos espectros comuns. Além das medições de ácidos nucleicos e de proteínas, ele também possui as funções normais de outros fotômetros, que são análises da absorbância, transmitância, entre outros.

O Nano-Espectrofotômetro tipo Nanodrop necessita apenas de 0,5ul ~ 2ul de amostra para as detecções, não necessita de cubetas, tornando as leituras ainda mais rápidas e fáceis. Este equipamento possui lâmpada de longa duração e fonte de luz UV (lâmpada de xenônio).

Para usar esse equipamento é preciso pipetar uma pequena quantidade da amostra, uma gota de 1uL, e colocá-la no equipamento. Para cada amostra é necessário limpar o equipamento com papel.

É necessário calibrar o equipamento com água nuclease free, que serve tanto para calibrar como para limpar o equipamento. Quando a luz do equipamento

atravessa uma solução, ela acaba absorvendo uma parte da luz. O aparelho mede a absorbância em cada comprimento de onda com índice de 260nm.

## **7) Fluorímetro**

Um fluorímetro nada mais é do que um dispositivo de laboratório utilizado para medir os parâmetros de intensidade e a distribuição de comprimento de onda da [fluorescência](#), e do [espectro de emissão](#) depois da excitação por um certo [espectro](#) de luz. O fluorímetro realiza quantificação por fluorescência, uma substância com fluorescência que se liga ao DNA pode ser utilizada para quantificar mais precisamente a concentração de DNA. O que nos fornece essa quantificação é a intensidade e distribuição de comprimentos de onda do espectro de emissão após excitação luminosa. Útil no processo de PCR em tempo real.

## **8) Autoclave**

Autoclave é um dispositivo muito importante utilizado para esterilizar equipamentos de laboratórios.

Ela descontamina os equipamentos por alta pressão e temperatura, através de vapor de água.

## **9) Tipos de água purificadas**

Os diferentes tipos de água purificadas dentro de uma escala de menor purificação para maior são: Destilada, deionizada, nuclease free. Todas essas águas devem passar por processos de filtragem, alguns processos são mais refinados e tem maior potencial de filtragem. Ao último tipo, acrescenta-se uma toxina (DEPC) que acaba com todas enzimas da água já deionizada, esse tipo de água pode ser obtida ou preparada em laboratório.

## **2. ACOMPANHAMENTO DAS PESQUISAS REALIZADAS NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

### **1) Diagnóstico molecular na detecção de *Salmonella* spp. e diferenciação dos sorovares de interesse na cadeia produtiva avícola – Mestrado Evelin Cristine**

**(Texto produzido pela autora do projeto)**

*Salmonella* está presente na cadeia produtiva avícola e é um grande desafio no que se refere à segurança alimentar e sanidade animal. Os métodos padrão-ouro para detecção de *Salmonella* estão relacionados às técnicas de microbiologia convencional e sorotipagem dos isolados. Entretanto estes métodos são considerados demorados, trabalhosos e muitas vezes com um custo elevado. Deste modo, técnicas de diagnóstico molecular vêm sendo utilizadas de forma mais evidente por proporcionarem resultados rápidos e seguros de diferentes patógenos, sendo de grande importância para a avicultura e para a saúde pública para limitar a exposição ao patógeno. As técnicas de amplificação isotérmica vêm sendo estudadas para amplificação de material genético como uma alternativa conveniente e econômica para triagem de patógenos na rotina. Também a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) multiplex por proporcionar a detecção de múltiplas sequências-alvos em uma mesma reação, por utilizar conjuntos de pares de primers e sondas fluorescentes específicas, vem sendo empregada na identificação de diversos patógenos. Essas duas técnicas associadas podem compor uma ferramenta promissora para diagnóstico de *Salmonella*, assim, este estudo tem como objetivo avaliar a utilização da técnica isotérmica mediada por loop (LAMP) para detecção de *Salmonella* spp. associada à qPCR multiplex para identificação e diferenciação simultânea de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. O estudo busca estabelecer ensaios padronizados no diagnóstico deste patógeno, com uma detecção rápida como triagem e a identificação simultânea dos sorovares por qPCR multiplex, buscando suprir a demanda em estabelecer novas metodologias de detecção e identificação mais rápidas e eficientes no diagnóstico, sendo de grande interesse para o desenvolvimento da produção avícola, da sanidade animal e da saúde pública.

## **2) Desenvolvimento do Sistema de Detecção e Quantificação de Salmonella spp. Por PSR ( Reação em Espiral de Polimerase) em carcaças de frango – mestrado Amanda Laurindo.**

Por ser uma doença muito frequente, a Salmonella spp. É um dos patógenos mais importantes no mundo. Para fazer seu monitoramento a PSR é uma técnica isotérmica de amplificação de DNA. O objetivo deste trabalho é padronizar um kit para quantificação de Salmonella em carcaças de frango usando essa técnica. Essa detecção é feita usando a amplificação de uma região específica do genoma da salmonela. E a quantificação é feita por estimativa.

## **3) Montagem e estabilidade do capsídeo de circovirus tipo 2B. – Mestrado Larissa Baldo**

O objetivo do trabalho é montar um genoma através d PCR convencional e inserir diferentes mutações na região do DNA que codifica a proteína CAP. Essas mutações serão escolhidas por simulação computacional.

Depois é feita a transfecção em cultivos celulares para montagem do vírus, e teste de estabilidade estrutural para análises dos capsídeos mutados. Então é colcado no vetor a região do DNA relevante para produção de proteínas recombinantes que possam vir a ter aplicação vacinal.

## **4) Metagenômica em suínos – Iniciação Científica Milena**

O trabalho de IC tem o objetivo de identificar a presença de suínos com viroses no Paraná. E de enriquecimento viral, que vai concentrar o vírus para ter um sequenciamento.

Foi realizado filtração de amostras batizadas e PCR do vírus para ver o que está acontecendo. Porém perderam muito vírus na etapa de clarificação. Dessa forma, será usado um protocolo com coliformes para perder menos vírus.

**5) Mestrado Ana Carolina – Nanopartículas de ouro para identificar parvovírus canino.**

Esse trabalho de mestrado tem o objetivo de lê as etapas para ver a alteração de comprimento de onda.

Ele será feito padronizando kits colorimétricos par a identificação de PCV-2 em amostras de fezes. Para isso será usado nanopartículas de ouro modificadas com a deposição de sondas específicas, onde se ligando ao alvo acontecerá uma mudança na coloração.

**6) Mestrado Larissa Baldo – IC Gabriel e Elian.**

Está sendo realizado um treinamento técnico abordando tudo do projeto por enquanto, depois será feito a montagem e estabilidade de capsídeo de circovírus tipo 2B.

Será realizada a produção experimental de VLPS, onde será montado o genoma através de PCR convencional e inserido diferentes mutações na proteína CAP.

Depois será feita a transfecção em cultivos celulares para montagem do vírus, e teste de estabilidade estrutural para análises dos capsídeos multados.

Por último será colocado no vetor a região do DNA relevante para produção de proteínas recombinantes que possam vir a ter aplicação vacinal.

**7) Projeto Cid- Sequenciamento de covid-19.**

Esse projeto tem o objetivo de fazer o sequenciamento de Sars-Cov-2, que faz parte do projeto Corona-ômica Br MCTI, que pode ser feito análises de genoma viral.

O projeto recebe apoio do governo federal, da Rede vírus MCTI, do Cnpq, FNDCT, Finep e do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações.

No LAD, Laboratório de Apoio ao Diagnóstico, é realizada a vigilância genômica do coronavírus que circulam em algumas cidades do estado de São Paulo. Para isso,

é utilizada a metodologia de sequenciamento NGS (Next Generation Sequencing ou sequenciamento de nova geração) e também pelo método tradicional Sanger.

Esse estudo é importante para acompanhar a evolução do vírus.

É realizado o sequenciamento das amostras com  $CT < 27$ . Onde é preparado biblioteca, sequenciamento e montagem do genoma.

É feito um relatório, importante para descobrir diferenças epimideológicas com variantes circulando no país.

Por último é realizado análises filogenéticas.

#### **8) Protocolo de extração de DNA de circovírus a partir do sangue e soro com Beads: Desenvolvimento e aplicação de Biossensor para detecção do Circovírus suíno 2 (PCV-2) – Mestrado Bruna Lindolfo**

As beads estudadas são de dois tipos, uma modificada com carboxila e outra com sílica. As modificações possuem a função de promover a ligação reversível entre as partículas magnéticas e ácidos nucleicos (DNA e RNA) em determinadas soluções. Este trabalho busca padronizar um protocolo utilizando reagentes produzidos no próprio laboratório (“in house”) visando um procedimento mais acessível, reduzindo significativamente o custo com a etapa de extração de material genético para o diagnóstico molecular do vírus em questão (PCV-2). Os parâmetros de quantidade e pureza de DNA estão sendo comparados a de dois kits comerciais (beads magnéticas comerciais e colunas de sílica) para validação do protocolo. A construção de um biossensor utilizando nanopartículas de ouro e sondas de DNA modificadas, específicas para regiões conservadas do genoma PCV-2 tem o intuito de desenvolver um kit colorimétrico para o rápido diagnóstico do PCV-2.

### **Considerações finais**

Fazer o estágio curricular obrigatório no laboratório de Diagnóstico molecular é muito importante para formação acadêmica de um biólogo.

Aprender e entender as técnicas utilizadas nos experimentos foi essencial para colocar em prática todo o conhecimento obtido na graduação. Já que a experiência prática é muito importante para mostrar que conseguimos tomar decisões rapidamente, além de tentar concertar possíveis erros.

“Nascida da junção entre a genética, a bioquímica e a biologia celular, a biologia molecular tem como principal objetivo compreender e estudar os processos de replicação, transcrição e tradução do material genético. Além disso, estuda as regulações desses processos e seus possíveis erros e características

No geral, podemos dizer que as técnicas da biologia molecular focam na obtenção, identificação e caracterização do material genético quer seja de um paciente ou de um agente infeccioso que esteja lhe causando uma infecção ou doença.” ( A BIOLOGIA MOLECULAR E O VALOR AGREGADO AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO. DB MOLECULAR, 2019).

Dessa forma, com esse estágio aprendi muito sobre assuntos que não tinha conhecimento. Além de me ajudar a ter controle sobre decisões em momentos onde algo não dava certo. Foi muito importante para minha formação como profissional.

## Referências

ANTONINI, S. R.; C. MENEGHIN S. P.; URASHIMA A. S. Técnicas básicas de Biologia Molecular. Araras/SP: Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular. UFSCar 2004. Disponível em: [http://www.lamam.ufscar.br/files/2010/07/apostilacurso\\_molecular.pdf](http://www.lamam.ufscar.br/files/2010/07/apostilacurso_molecular.pdf). Acesso em: 15 jul. 2022.

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; MORGAN.D.; RALF M.; ROBERTS K.; WALTER P.; WILSON J.; HUNT T. Biologia Molecular da Célula. USP 2017. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4618964/mod\\_resource/content/1/Bruce%20Alberts%20et%20al.-Biologia%20Molecular%20da%20C%3%A9lula-Artmed%20%282017%29.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4618964/mod_resource/content/1/Bruce%20Alberts%20et%20al.-Biologia%20Molecular%20da%20C%3%A9lula-Artmed%20%282017%29.pdf). Acesso em: 12 jul. 2022.

CONCUR Conselho de Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências. Regulamento do estágio curricular obrigatório do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP (nos termos da Resolução UNESP 35/2004), (s/d). Botucatu/SP: Unesp, Disponível em: [https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/graduacao/cienciasbiologicas/reg\\_estagio\\_obrig\\_bacharelado.pdf](https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/graduacao/cienciasbiologicas/reg_estagio_obrig_bacharelado.pdf). Acesso em: 20 ago. 2022.

DB MOLECULAR. A BIOLOGIA MOLECULAR E O VALOR AGREGADO AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO. 2019. Disponível em: <https://www.dbmolecular.com.br/artigo/biologia-molecular-e-diagnostico-clinico>. Acesso em: 20 out. 2022.

Fiocruz. Museu da vida. Termociclador. Disponível em: <https://www.museudavida.fiocruz.br/index.php/museologico/objeto-em-foco/termociclador>. Acesso em: 22 out. 2022.

Grupo Diagnose. Sequenciamento de Nova Geração: Conheça mais sobre esta tecnologia. 2019. Disponível em: [https://www.grupodiagnose.com.br/noticias/sequenciamento-de-nova-geracao-conheca-mais-sobre-esta-tecnologia-258#:~:text=Sequenciamento%20de%20Nova%20Gera%C3%A7%C3%A3o%20\(NGS\)&text=O%20NGS%20%C3%A9%20uma%20ferramenta,realizado%20pelo%20m%C3%A9todo%20de%20Sanger](https://www.grupodiagnose.com.br/noticias/sequenciamento-de-nova-geracao-conheca-mais-sobre-esta-tecnologia-258#:~:text=Sequenciamento%20de%20Nova%20Gera%C3%A7%C3%A3o%20(NGS)&text=O%20NGS%20%C3%A9%20uma%20ferramenta,realizado%20pelo%20m%C3%A9todo%20de%20Sanger). Acesso em: 20. Out. 2022.

Kasvi. Os princípios da clonagem molecular: DNA recombinante. 2017. Disponível em: <https://kasvi.com.br/clonagem-molecular-dna-recombinante/>. Acesso em: 21 out. 2022.

Biovera. Nano-espectrofotômetro tipo nanodrop Kasuaki.2019. Disponível em: <https://www.biovera.com.br/nano-espectrofotometro-tipo-nanodrop-kasuaki/>. Acesso em: 08. Set .2022

Labnetwork. Entenda como funciona a PCR Digital da Bio-Rad e suas principais aplicações. 2017. Disponível em: <https://www.labnetwork.com.br/noticias/entenda-como-funciona-a-pcr-digital-da-bio-rad/>. Acesso em: 14. Set. 2022.