

# Sequenciamento do DNA



<http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/Sequ%C3%A2ncia%20genomas.pdf>

<https://kasvi.com.br/sequenciamento-de-dna-desvendando-o-codigo-da-vida/>

Bianca Zingales  
zingales@iq.usp.br

# Histórico

1977. Duas técnicas de sequenciamento

ALAN MAXAM - WALTER GILBERT – Método Químico

FREDERICK SANGER – Método Enzimático



Walter Gilbert



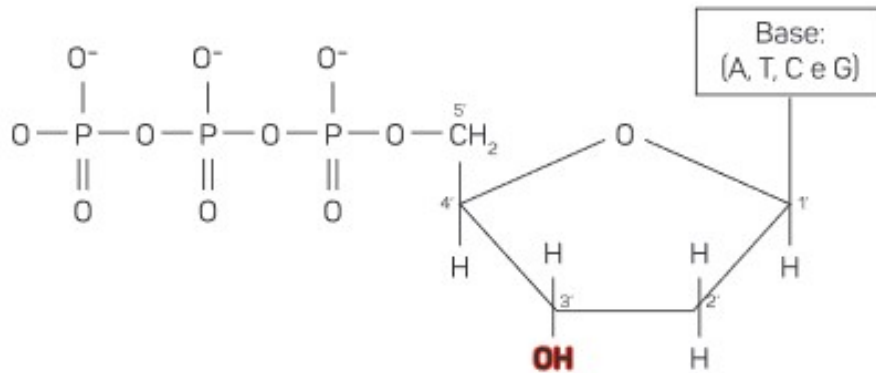
Frederick Sanger

**Prêmio Nobel de Química de 1980**

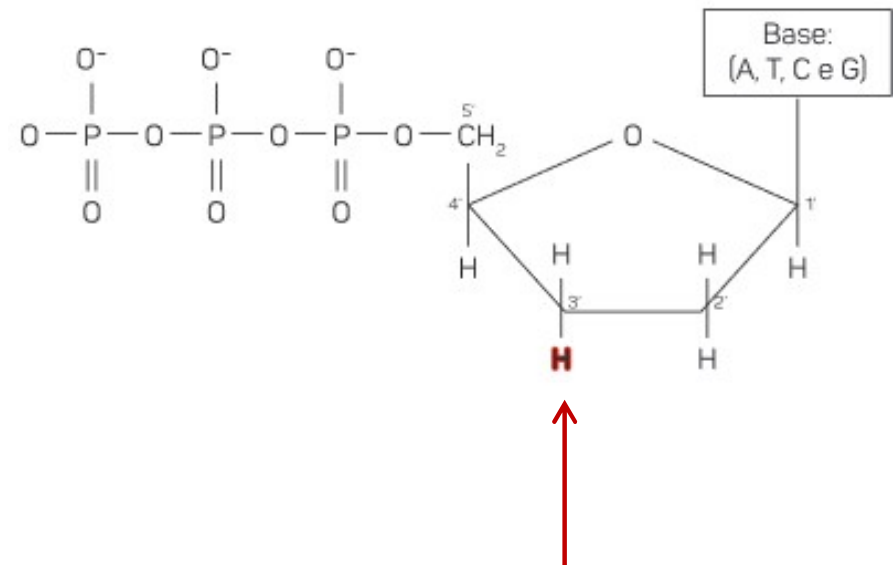
# Sequenciamento do DNA – Método de Sanger

Sequenciamento do DNA com **inibidores de terminação de cadeia**

**DESOXINUCLEOTÍDEOS (dNTP)**

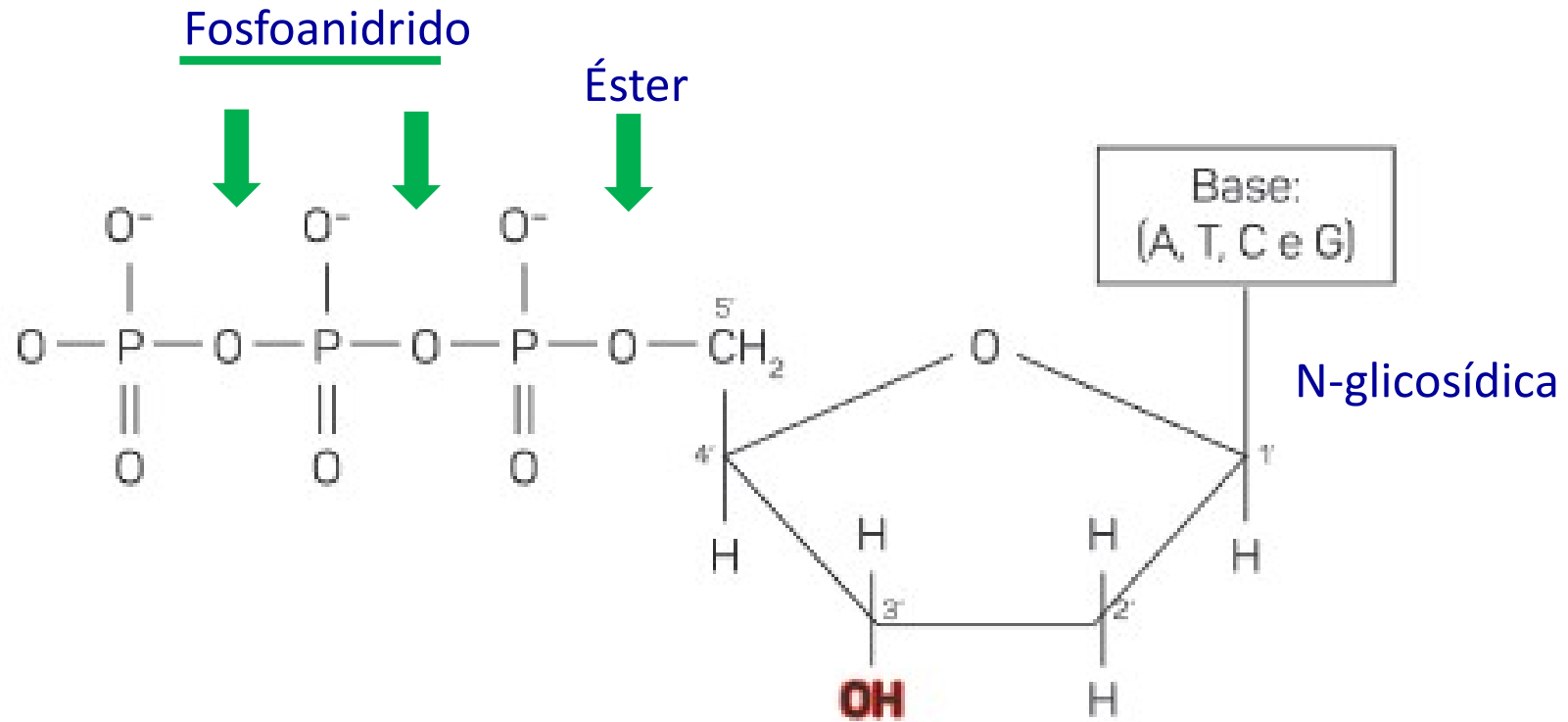


**Inibidores: DIDESOXINUCLEOTÍDEOS (ddNTP)**



Notar a ausência da hidroxila na posição 3' da **DESOXIRIBOSE**

# Revisão das ligações nos **DESOXINUCLEOTÍDEOS (dNTP)**



Nota: Cai na Prova

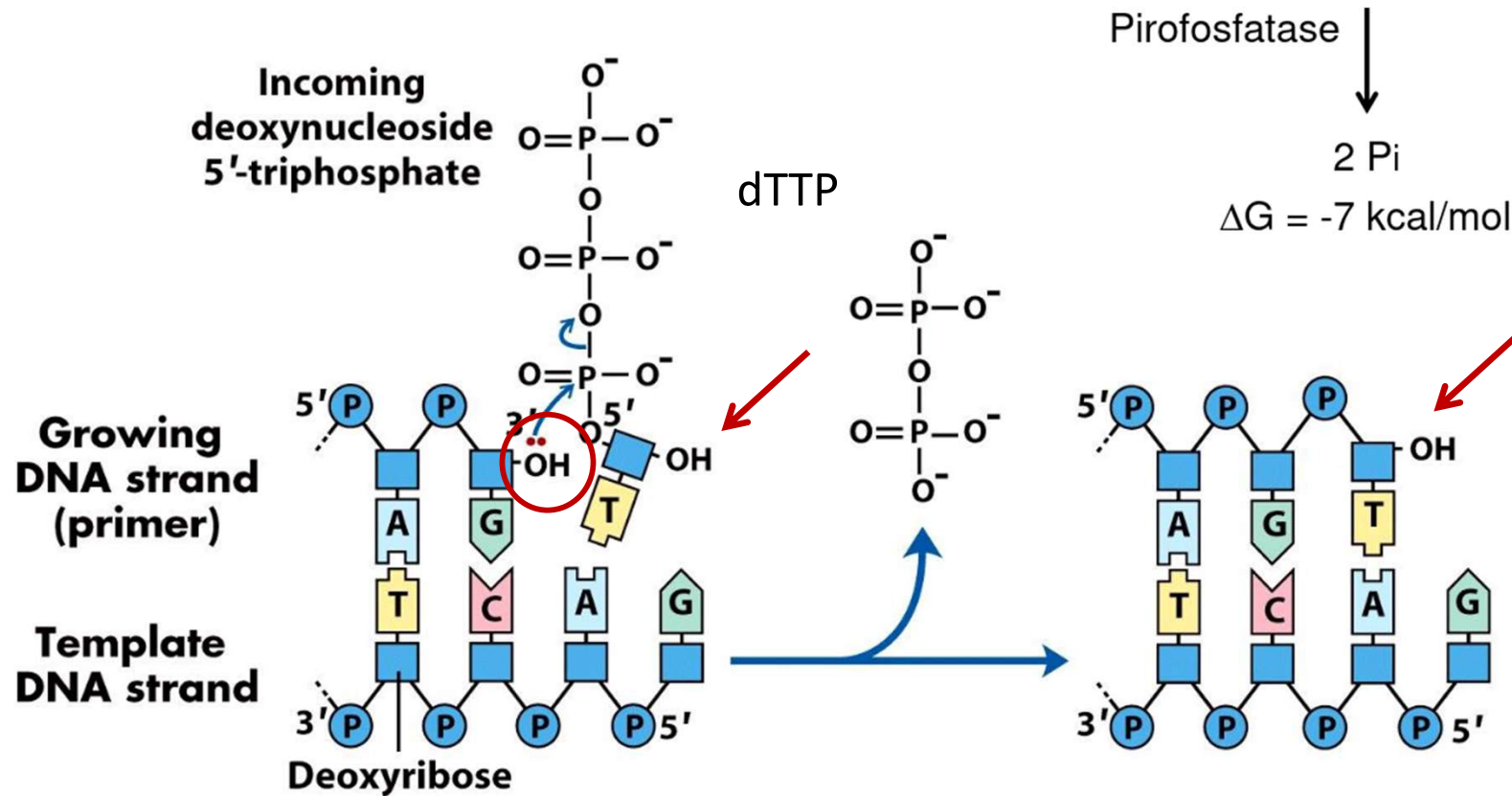
# Sequenciamento do DNA – Método de Sanger

## REAGENTES

- DNA dupla fita desnaturado
- Um iniciador (primer) **complementar à extremidade 3' da fita de DNA (fita molde)**
- DNA polimerase
- 4 desoxinucleosídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 4 **didesoxinucleosídeos** trifosfato (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) (**em menor concentração**)

# Princípio do método de Sanger

1. A DNA polimerase vai “copiando” a fita molde, a partir do primer, e adicionando os dNTPs complementares.



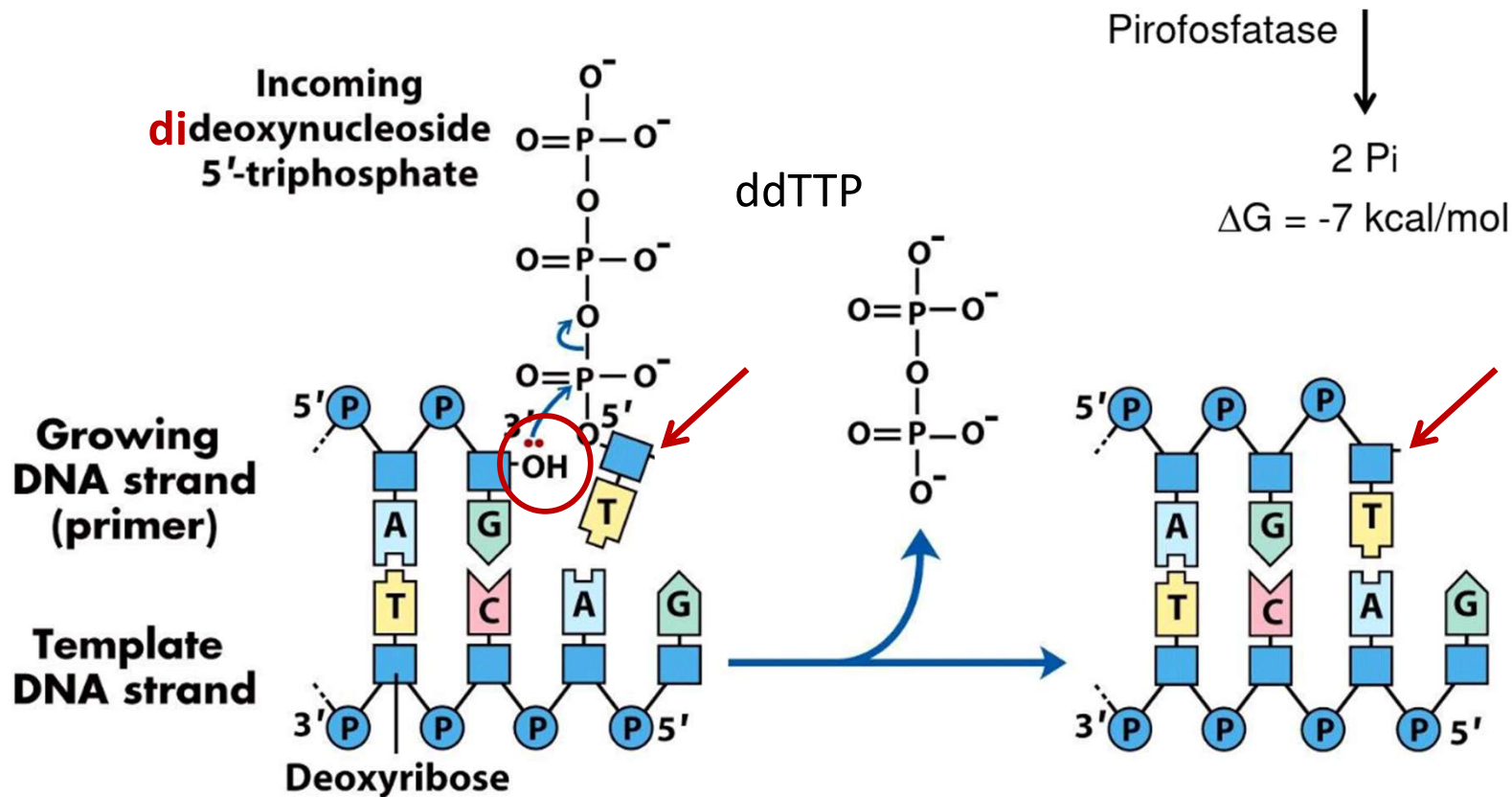
Notar a orientação das fitas!

Notar o papel da 3' OH do nucleotídeo terminal

# Princípio do método de Sanger

2. Em algum momento um **dideoxinucleotídeo** é incorporado pela DNA polimerase na fita nova de DNA.

A ausência do grupo 3'-OH determina a **parada da síntese de DNA**.



Notar que a fita nova termina com o ddnucleotídeo

Neste caso com ddTMP

# Primeiros ensaios de sequenciamento

## Sequenciamento manual

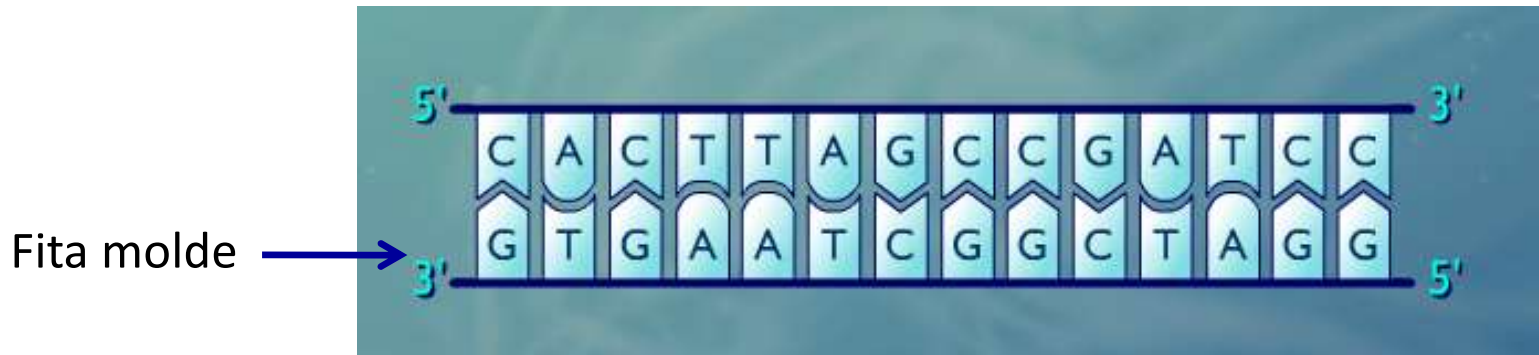
### 4 tubos separados

Tubos	1	2	3	4
DNA desnaturado	+	+	+	+
Iniciador marcado ( $\alpha$ P <sup>32</sup> )	+	+	+	+
DNA polimerase	+	+	+	+
os 4 dNTPs	+	+	+	+
1 ddNTP/tubo	ddGTP	ddCTP	ddATP	ddTTP

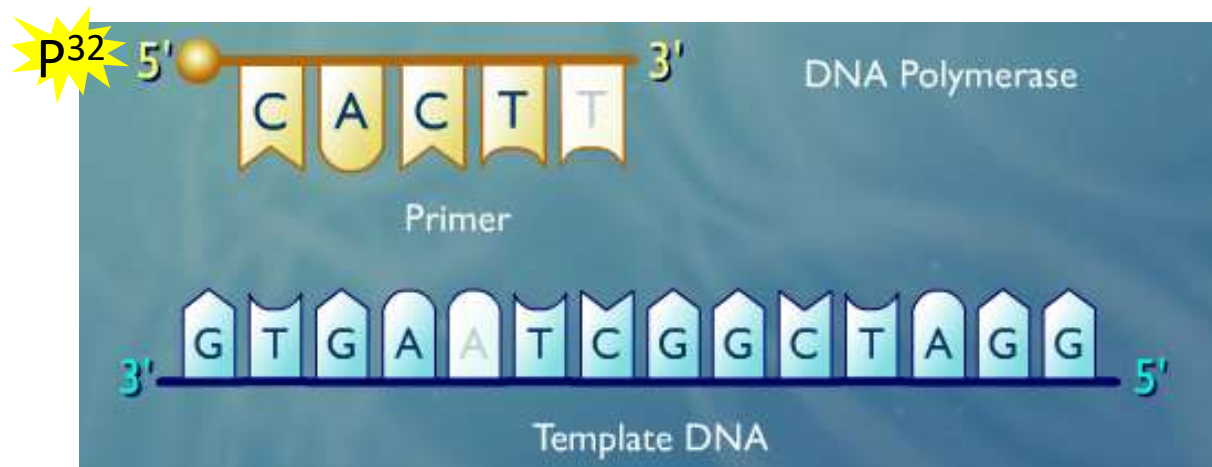




## DNA dupla fita



### Desnaturação do DNA e anelamento do primer



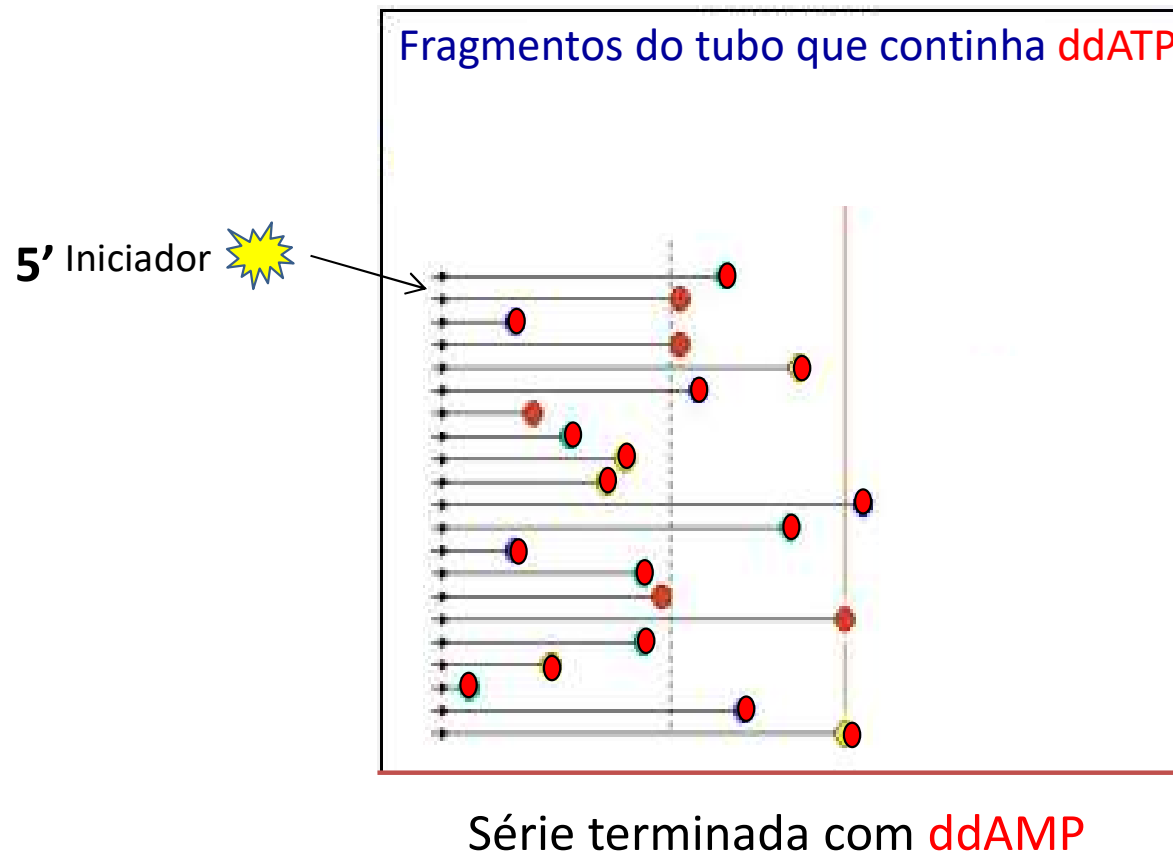
- Iniciador – complementar à extremidade 3' da fita de DNA
- Sentido da síntese 5' → 3'
- A marca radioativa corresponde à fita de DNA que está sendo sintetizada

## Resultado

Em cada tubo é sintetizada **uma série de fragmentos de DNA** de tamanhos diferentes (terminação aleatória)

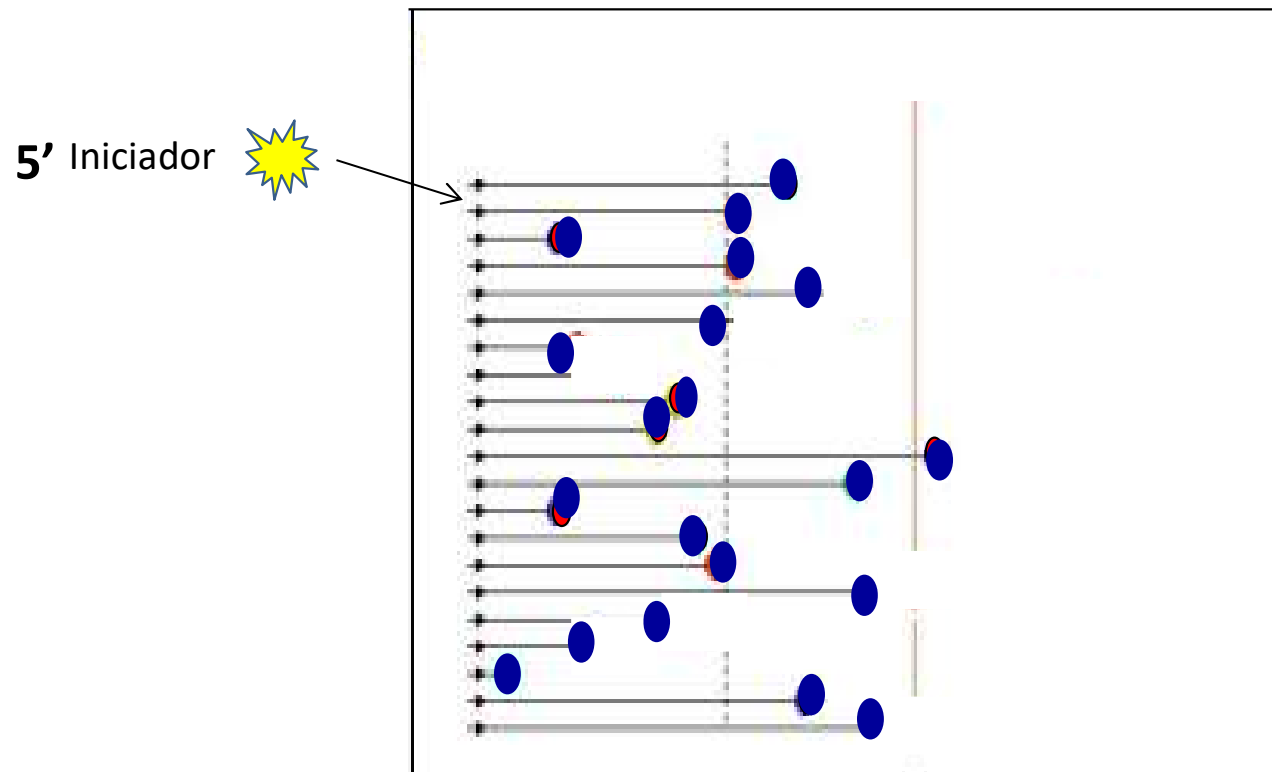
**Todos os fragmentos começam com o mesmo iniciador marcado com  $P^{32}$**

**Cada fragmento termina ao acaso com um dos didesoxinucleotídeos.**



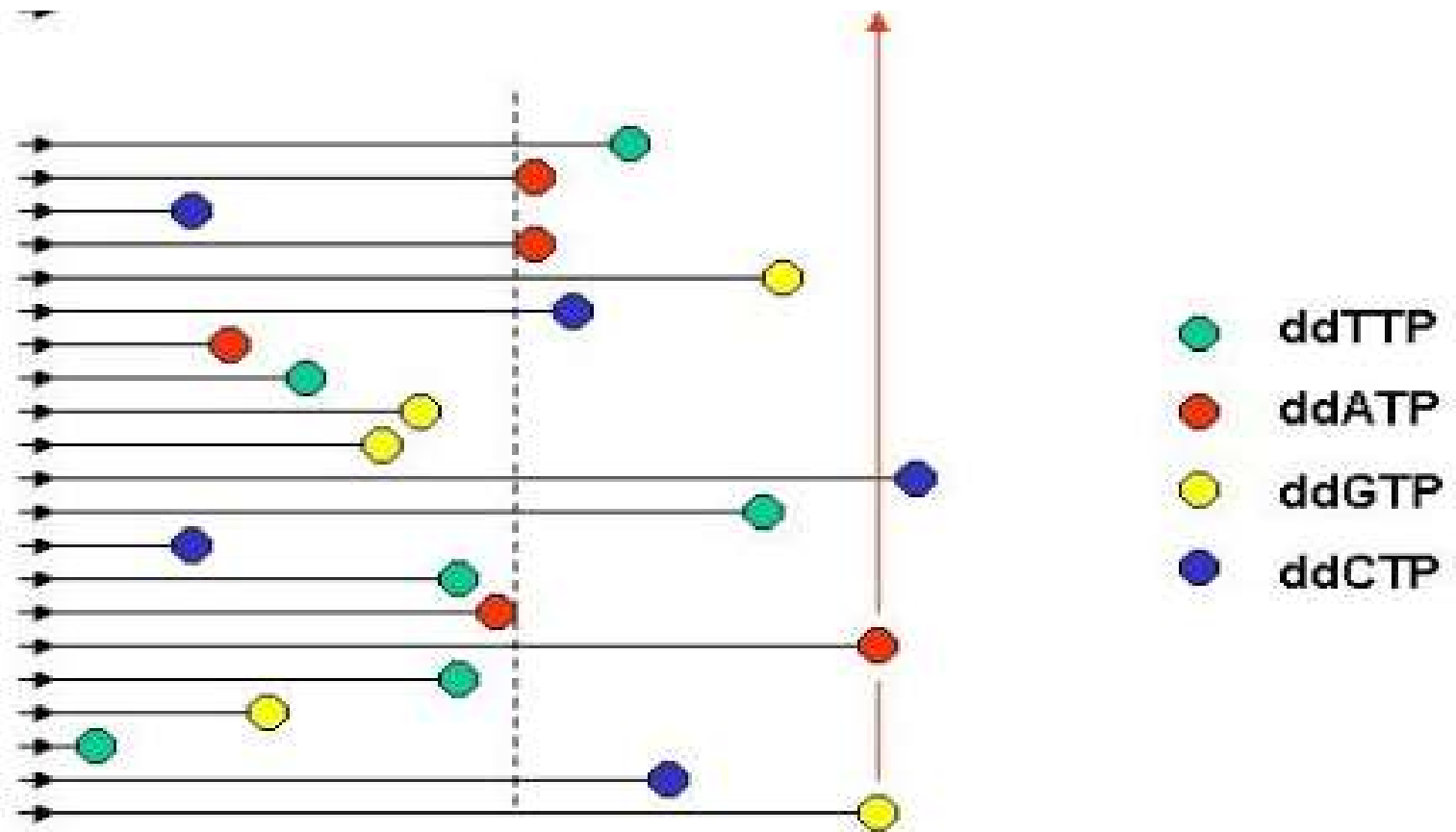
## Fragmentos do tubo que continha ddCTP

Fragmentos de tamanhos diferentes – Todos terminados com ddCMP

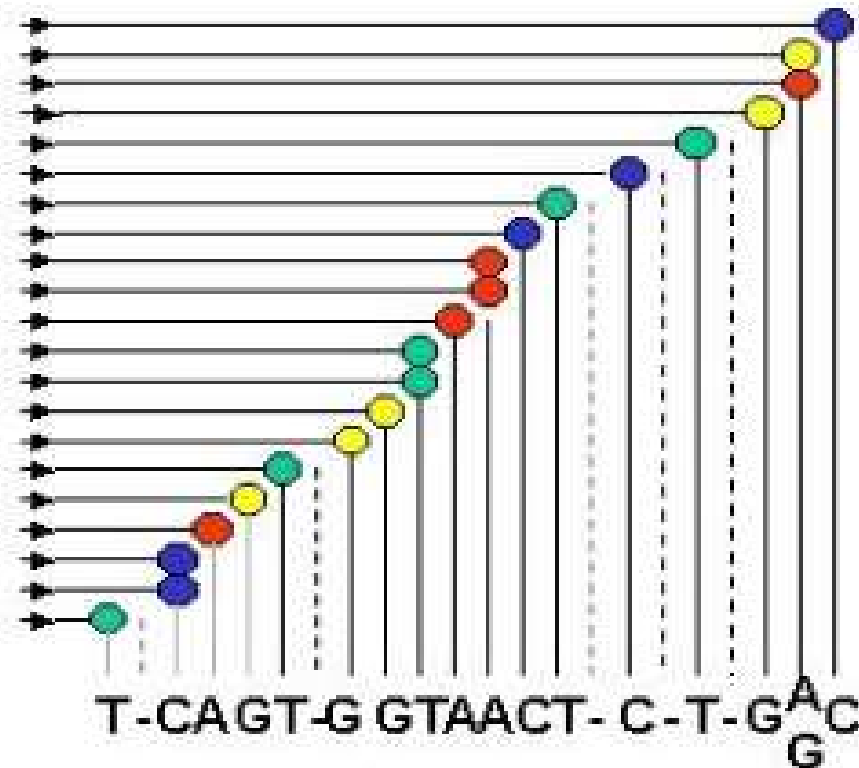


Série terminada com ddCMP

## Variação do tamanho do conjunto dos fragmentos sintetizados nos 4 tubos



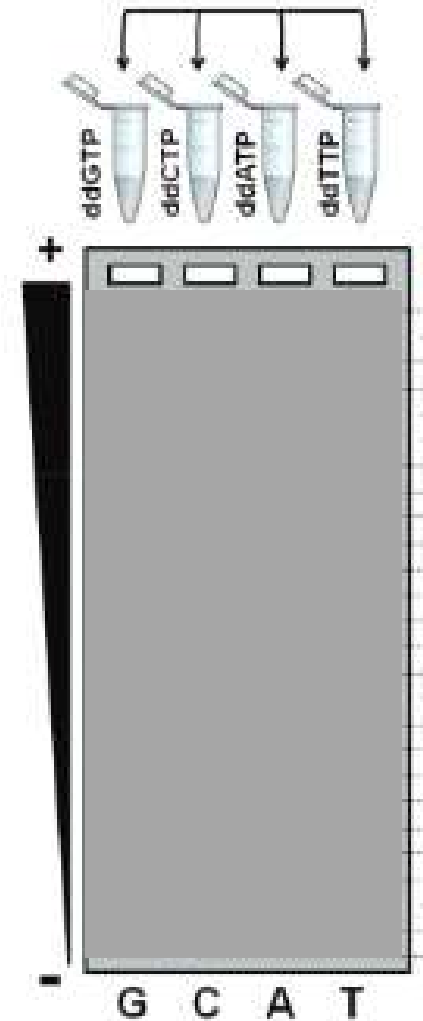
O conjunto dos fragmentos cobre **toda a extensão de uma fita do gene**



Terminada a reação, a **amostra de cada tubo** é desnaturada e submetida a eletroforese em gel de **poliacrilamida para DNA**

Gel de poliacrilamida permite separar fragmentos com variações de tamanho **de 1 nucleotídeo**. Gel de agarose não separa.

# Eletoforese em gel de poliacrilamida dos fragmentos sintetizados



Uma canaleta para cada tubo de reação

## Como “veja” as bandas no gel ?

Uma vez que o primer é marcado com  $P^{32}$  

Todos os fragmentos estarão radioativos

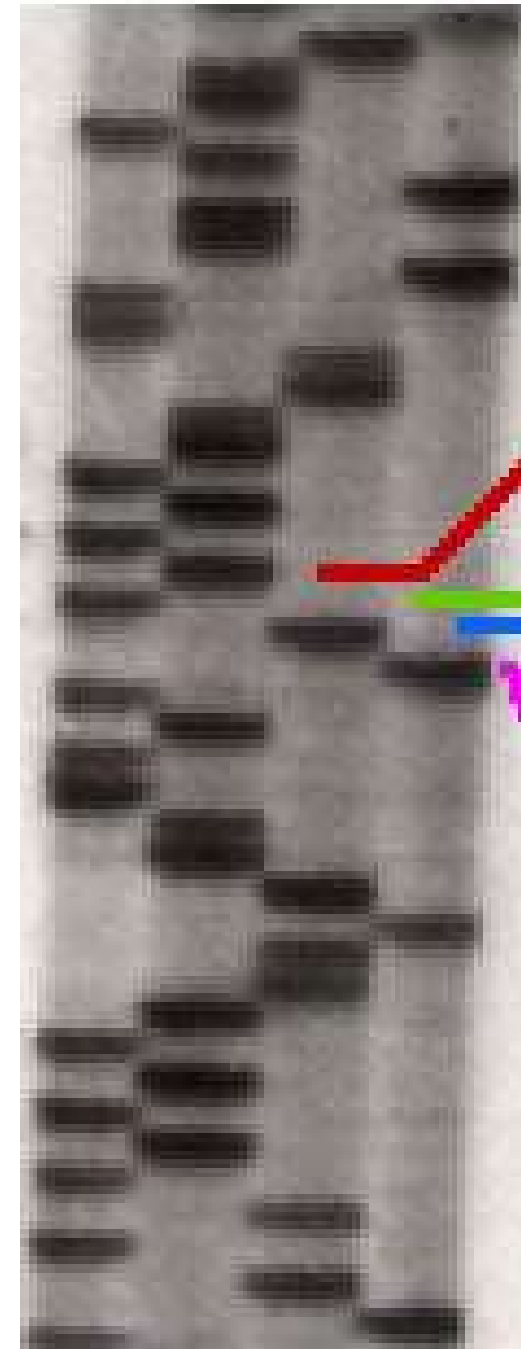
Faz-se uma autoradiografia do gel cobrindo-o com um filme de raio X

Depois revela-se o filme e tem-se a imagem

Menor fragmento 

Amostras ddNTP

A T G C



Leitura visual.

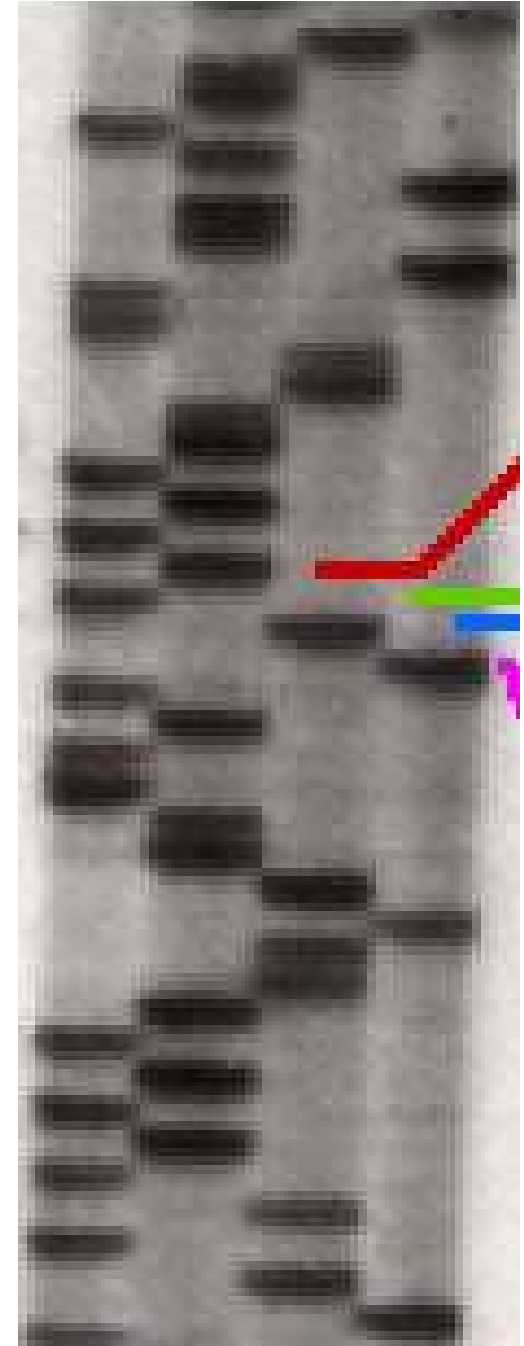
Cada fragmento tem diferença de UM nucleotídeo

**5'ACGAGATATATGGCGTTAATACGATT.....**

Esta é a sequência da fita que está sendo sintetizada  
sentido de 5' para 3'

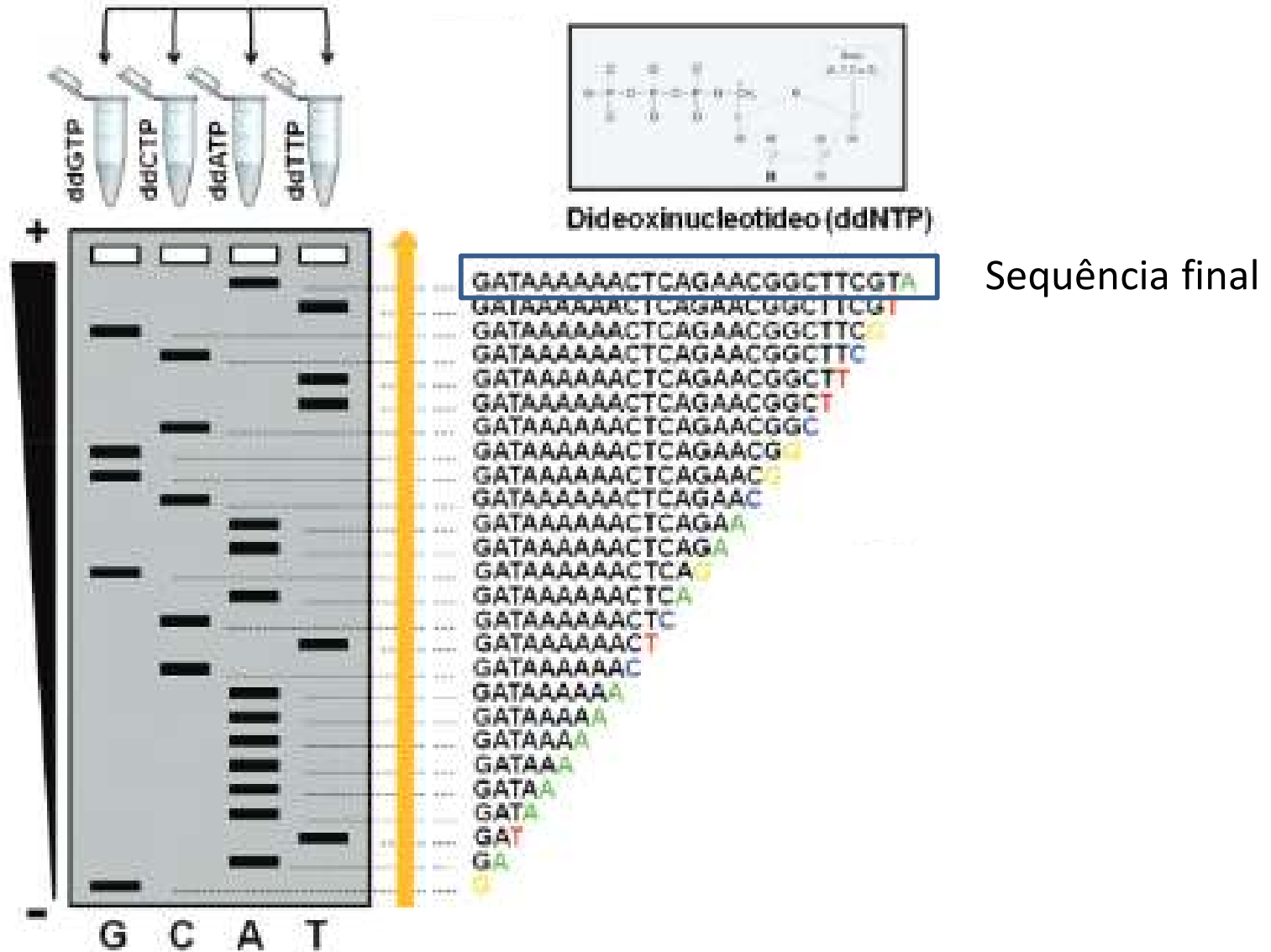
Amostras ddNTP

**A T G C**





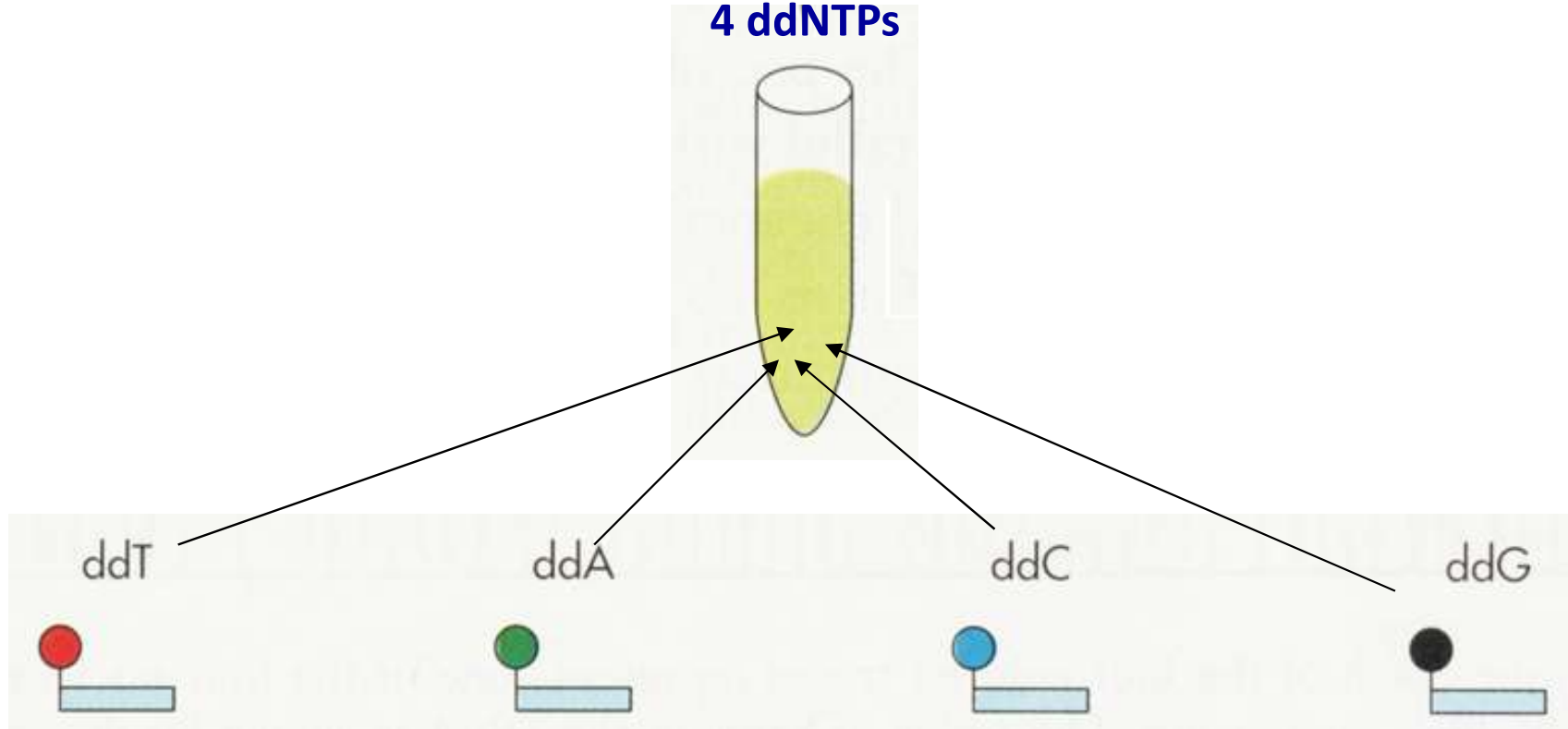
## Exemplo 2. Leitura da sequência



# EVOLUÇÃO: Reação de sequenciamento com didesoxinucleotídeos fluorescentes. Sequenciamento automático

Um tubo só

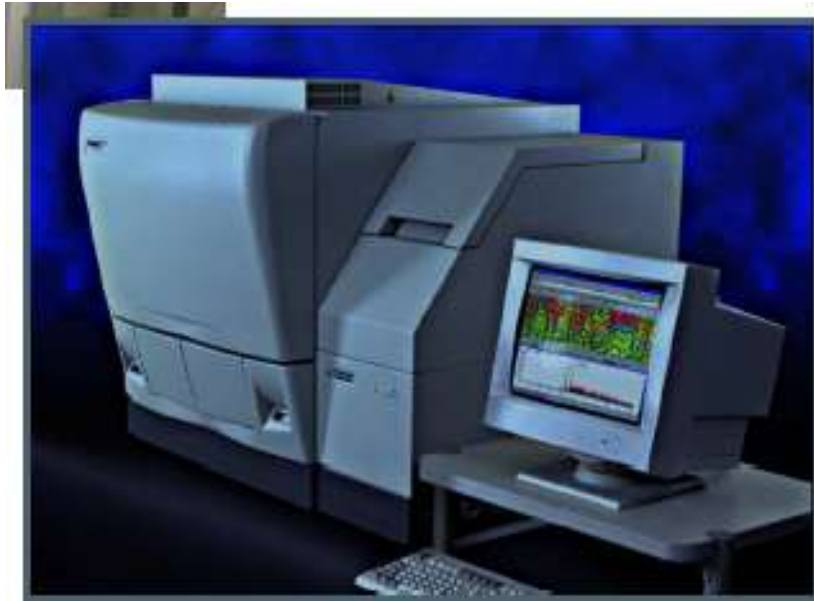
DNA desnaturado  
Primer Não Marcado  
DNA polimerase  
4 dNTPs  
4 ddNTPs



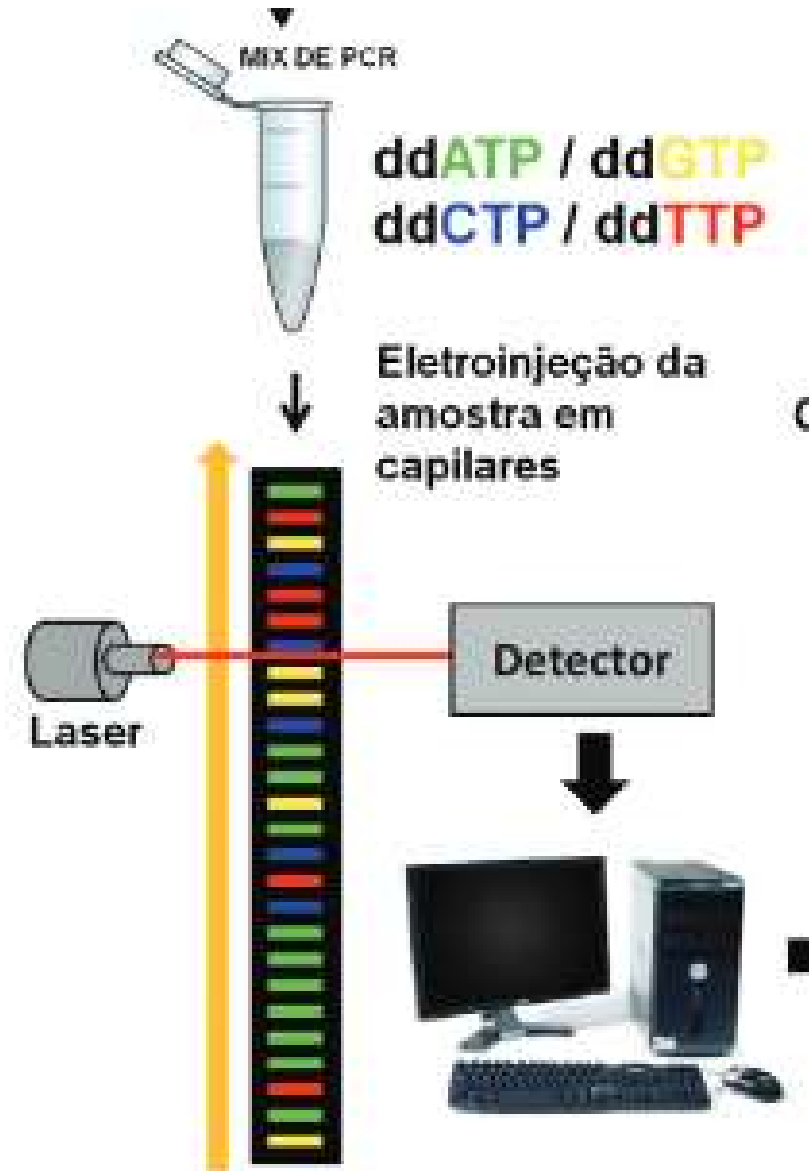
Cada ddNTP é marcado com uma sonda fluorescente diferente, que emite luz em comprimento de onda próprio. Reação feita em termociclador com Taq polimerase

Terminada a reação, a amostra é desnaturada e levada ao sequenciador (ABI Prism 3700).

No sequenciador ocorre a eletroforese

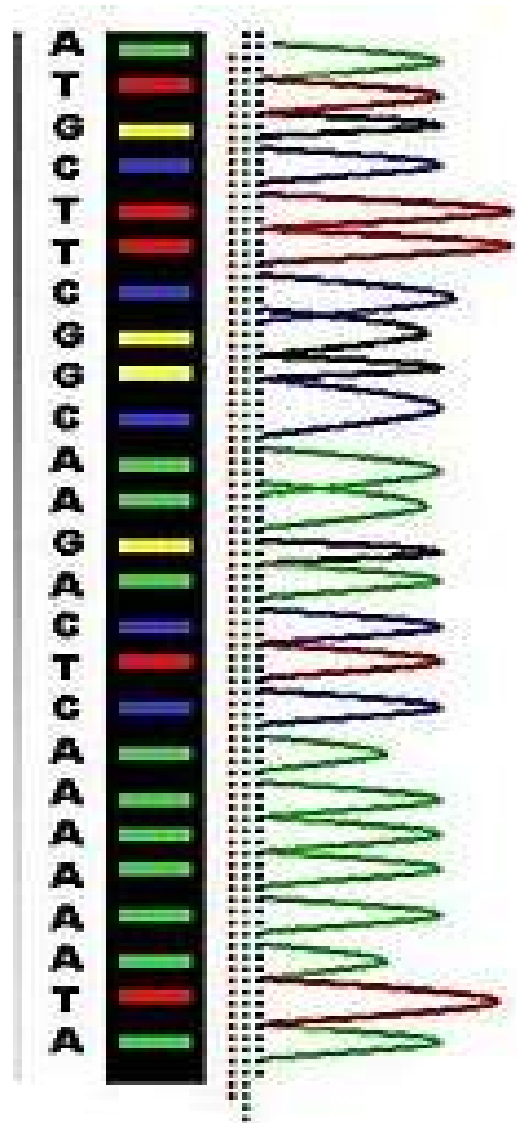


Durante a corrida os fluoróforos são excitados, lidos e registrados



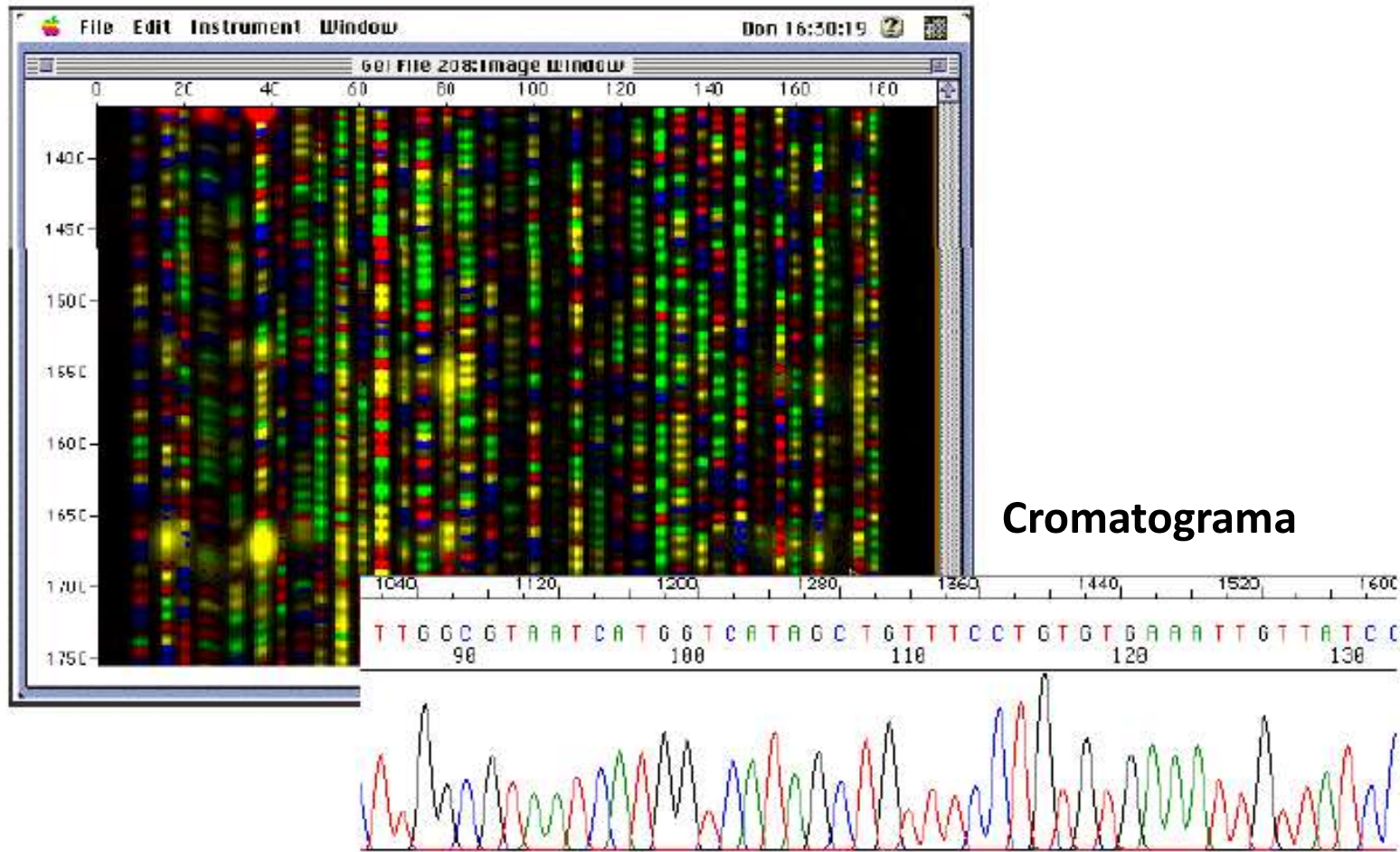
A fluorescência emitida pela passagem do fragmento de DNA pela janela de medição é registrada por um sistema de microcâmeras sensoras.

O sinal é transformado num **gráfico**, conhecido como **cromatograma**.



No sequenciador são analisadas muitas amostras de cada vez

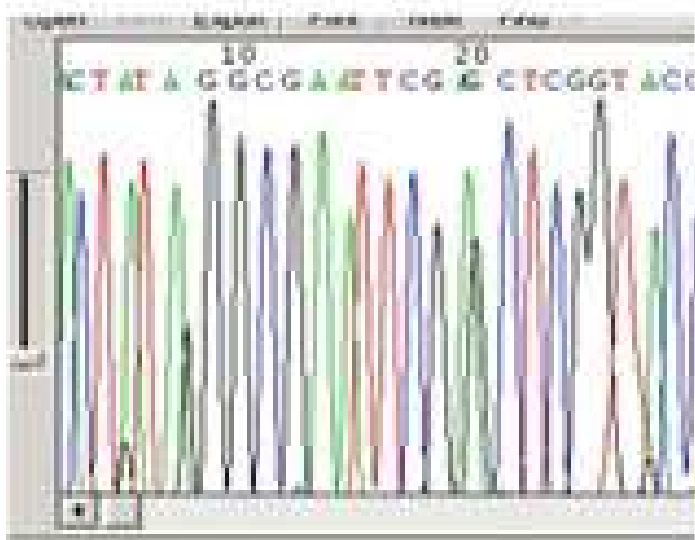
Cada coluna corresponde a uma sequência



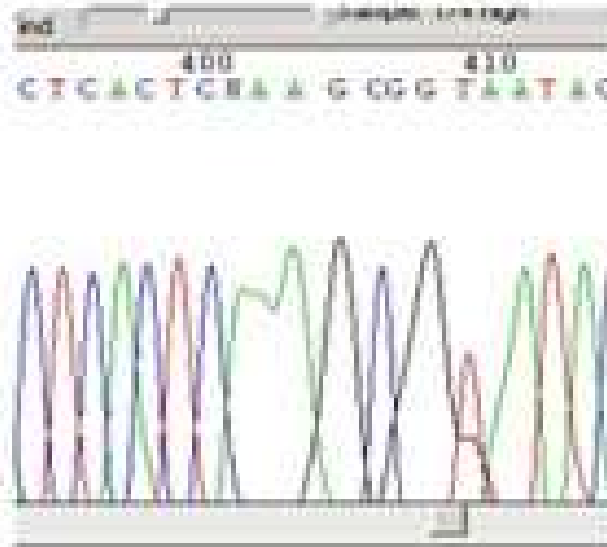
O pesquisador recebe o cromatograma de cada sequência e verifica sua qualidade

# Qualidade das sequências

Qualidade boa



Qualidade média



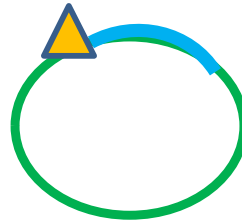
Qualidade ruim



Dependendo do tipo de sequenciador **~600 bases** são determinadas em cada corrida/reação

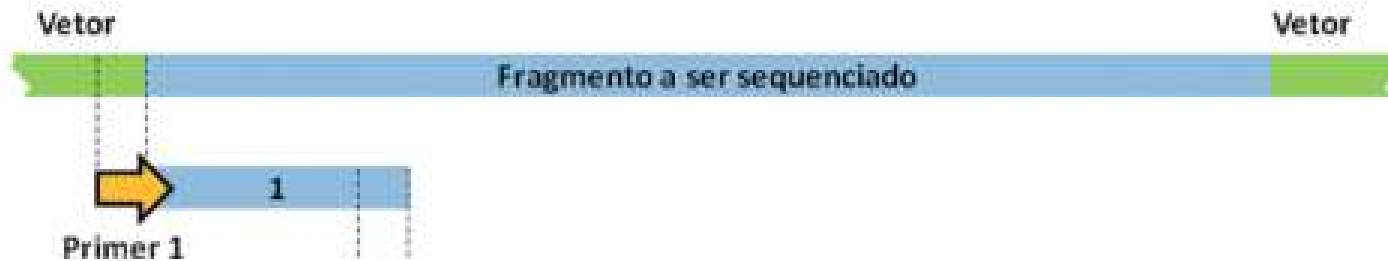
# Como sequenciar um gene de 3 kb?

A amostra a ser sequenciada está clonada em um vetor



Etapa 1: Desenhar primer para a sequência do VETOR que está próxima do gene a ser sequenciado. ➡

A sequência de todo o vetor é conhecida



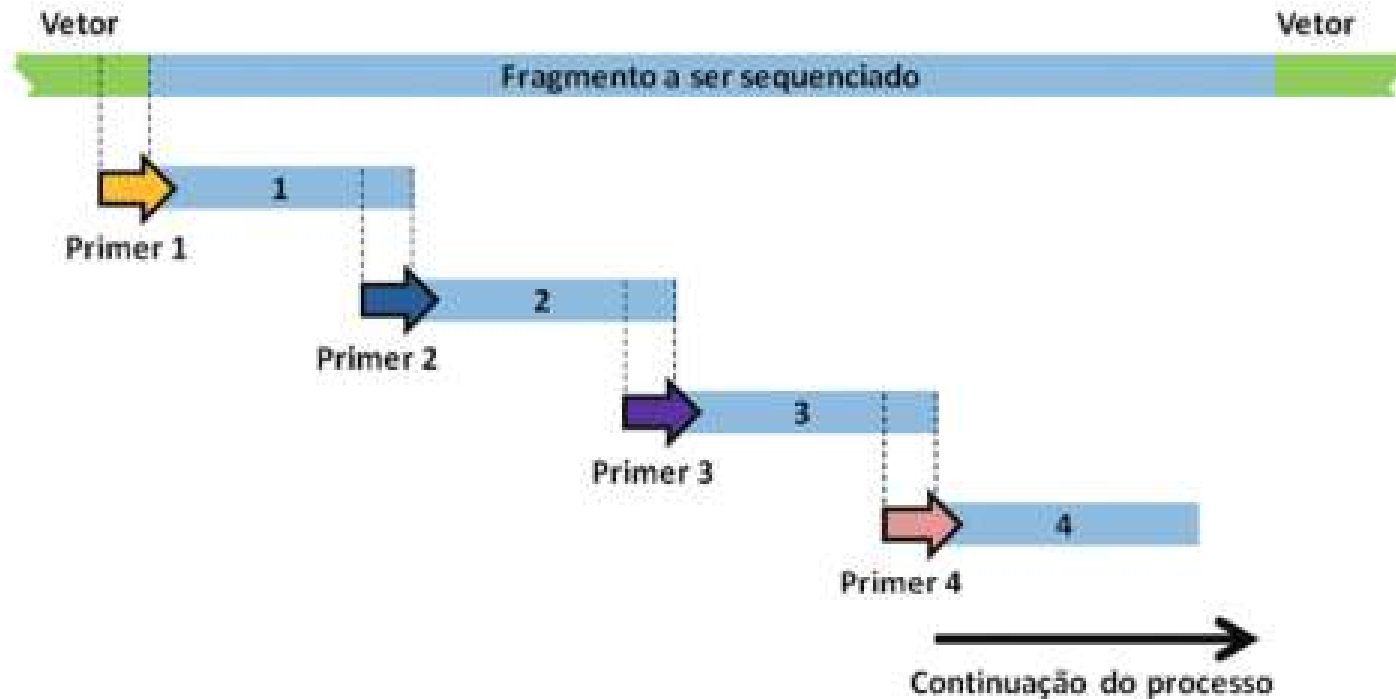
Sequenciar 600 nucleotídeos

# Sequenciamento por “primer walking”

Etapa 2: Desenhar primer para a sequência 3' terminal do fragmento sequenciado

Primer 2 → Sequencia-se mais 600 nucleotídeos.

Etc.



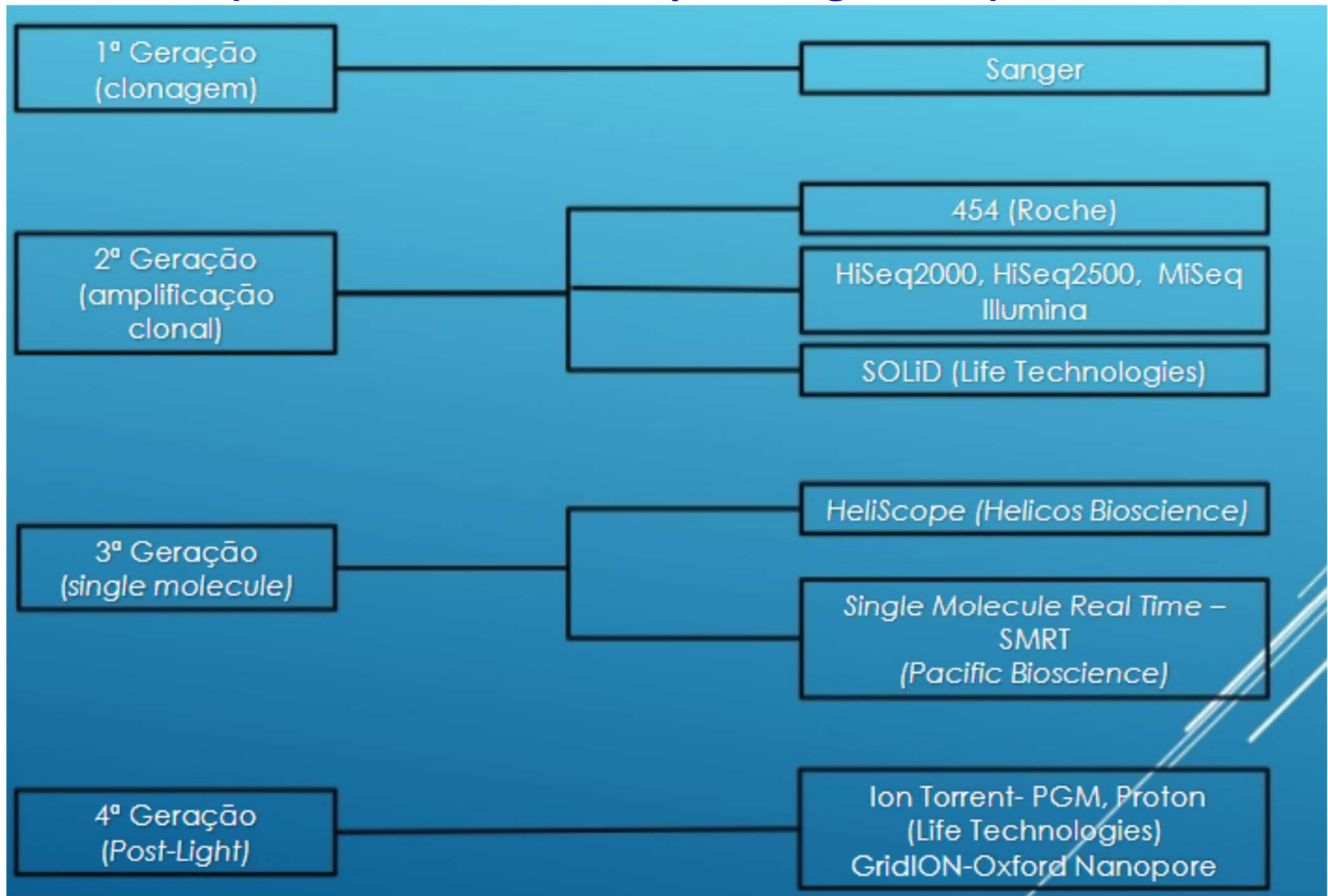
**Figura 8.** Modelo esquemático da técnica de *Primer Walking*. Um oligonucleotídeo inicial é usado no processo, determinando a sequência a jusante após uso da técnica de sequenciamento. Como existe uma limitação da ação da polimerase e devido a baixa resolução dos géis de sequenciamento, haverá um momento em que os nucleotídeos não serão mais determinados, reduzindo a eficiência do processo. A partir desta nova sequência determinada (1), desenha-se um novo oligonucleotídeo nas proximidades da posição 3' e tem-se início a um novo processo de sequenciamento, gerando o fragmento 2, que servirá para molde do desenho de um novo oligonucleotídeo, e assim por diante continua-se o processo. Repare que é como se fossem dados pequenos passos para se conhecer a sequência completa, daí a definição *primer walking*.



**O método de Sanger automatizado continua sendo usado para sequenciar DNAs pequenos.**

**Para o sequenciamento de Genomas usam-se outras tecnologias.**

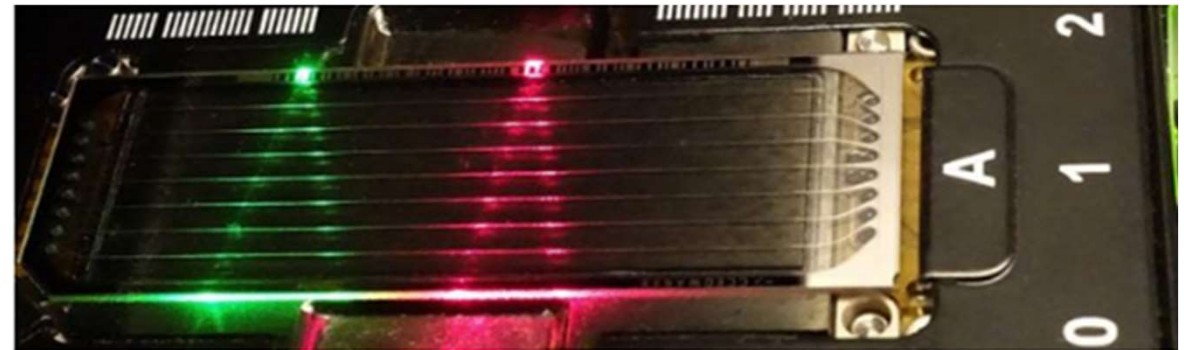
# Plataformas de Sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing – NGS)



# Plataformas de Sequenciamento de nova geração



Illumina Short Read Sequencing

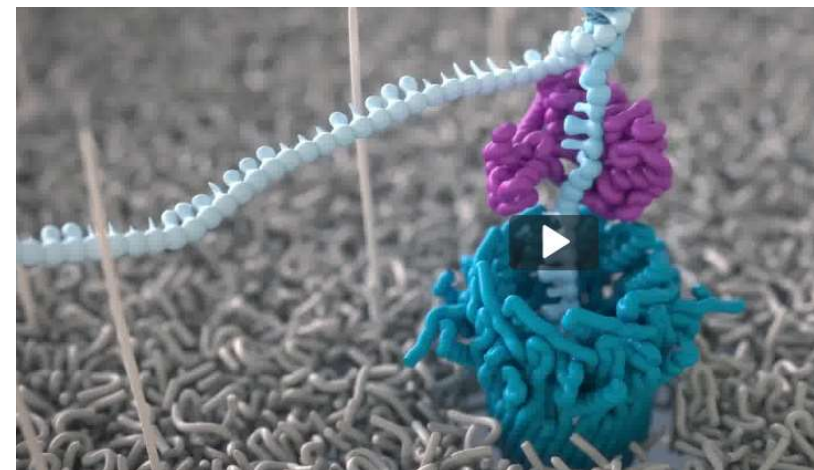


Nanopore technology

Sequel II



NovaSeq 6000



# Plataformas de Sequenciamento de Nova Geração

Sanger	~ $6 \times 10^2$ nucleotídeos sequenciados/corrída,
SNG	~ $10^8$ - $10^9$ nucleotídeos sequenciados/corrída

## Campo aberto para QUÍMICOS!

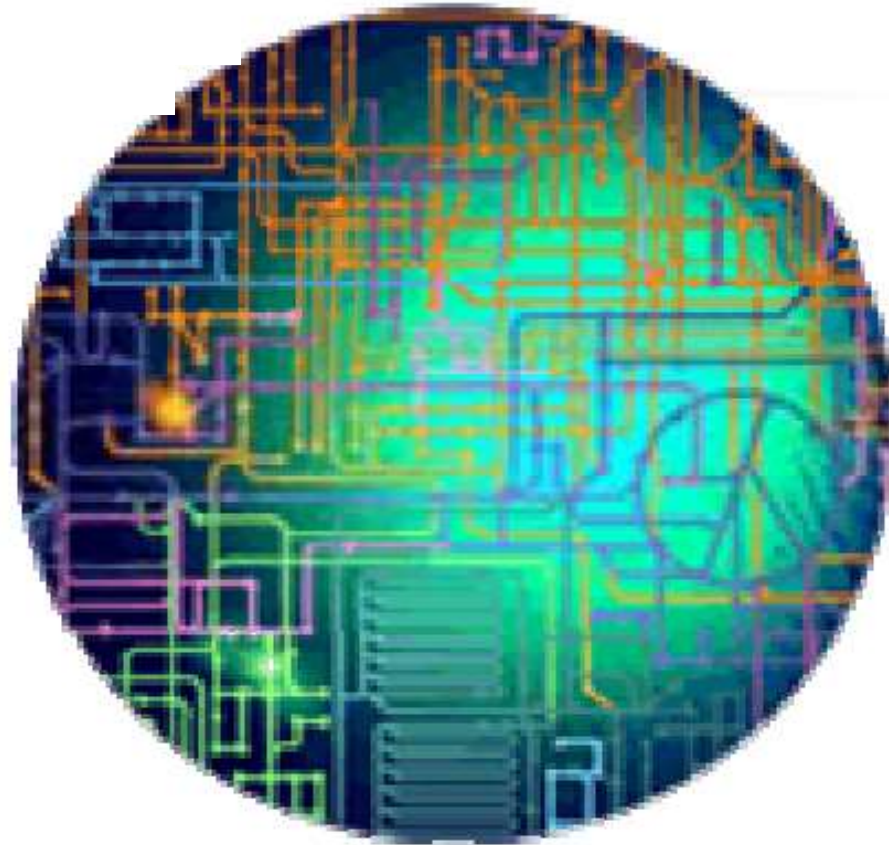
Diferentes matrizes; reagentes; métodos; equipamentos

Competição entre companhias públicas e privadas por melhor qualidade e preço

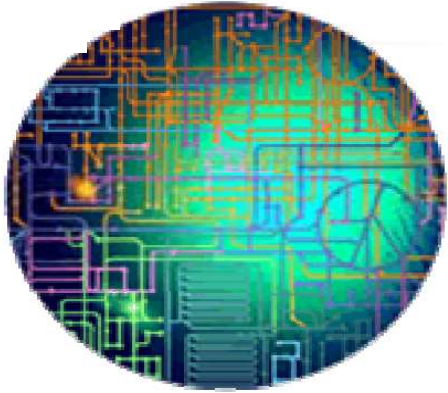
### NOTA

SNGs usadas para sequenciamento **em larga escala** (Genomas, Transcriptomas)

# Bioinformática



Ferramentas para a análise de dados



## Bioinformática

**Bioinformática** é um ramo da ciência que utiliza e desenvolve ferramentas computacionais aplicadas à coleta, armazenamento e análise de dados genômicos.

O profissional em bioinformática deve

- ter conhecimentos de biologia molecular, ciência da computação e bioinformática.
- ter conhecimentos de biologia, bioquímica, química, estatística e matemática, dentre outros.

# **Bancos de Dados**

Repositórios de Informações



## Criado em 1998

### Repositório de sequências biológicas

- Sequências de Nucleotídeos
- Sequências de Proteínas
- Estruturas
- Genes
- Genomas
- Expressão Gênica

### Repositório de artigos científicos

PubMed – mais de 30 milhões de citações de literatura de Biomedicina

### Submissão de novas sequências

**Nota: No IQUSP vários grupos têm expertise em Bioinformática**

### Ferramentas para busca e análise de sequências

- Entrez
- Buscas de similaridade (BLAST)
- Análise de estruturas
- Análise de Genomas, etc. etc.



# Depósito da Sequência em bancos de dados

Nos bancos de dados a informação referentes a cada gene é apresentada em **Nucleotídeos**.

**Cada sequência depositada recebe um número de acesso**

A sequência corresponde à extremidade 5' do gene

## I - Trypanosoma cruzi strain CL Brener ABC transporter gene

ATG inicial →

>XM\_801573.1

```
ATGTCGTGCTGCCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAACTCCCAGCTCCGCTTCATCATTGGAGTCTGACG
ACCAAATCGCGTCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCTCATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCCGGATT
CTCCATCAAGGGCTCCGTCGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCCGTGAGTGGACGCTTT
TCTATTCCTGCTCATGGCATAATTTGGCATAATTCGGCAAACGGCACGAAAATTTCTTGGCGCCTCACAG
GAACAGCGTTACCGTACGATGCCTTGCTGTGATGGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTTTCTCAA
TGCTATCTCTGACCGACTTAAAACCTCGCGTACCCTTAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGGGACTTG
GAGTACAAGCGTCATTACCGCAGGATGGTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCACCACGGGCAA
CACCCGAAGATTCCCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAACGAATAAATTT
TGTTGAGGAACTTTGGAGGAATTACGCCCTTGTCCTGACTGCCGTGAGACCATTGTTGGCATCCCTGGCCTT
GTCTCTGGTCTTTCAGGTGGTGAACGCAACGCACAAGTATTGGAGTGGAGCTCATTGCGATCCTAAAA
TTCTCTTGCTGGATGAACCCACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCTTCTGAA
TAACATTGCCCCGAACAGGCCGCACGGTGATTTACACCATTACCAGCCACTGCTGAGACATTGACGTAC
TTTGATGATCTCATGCTTCTCACTGGGGTTCGATGTGCTTACCATGGCACGATGGCAAAATCTGTGGAAT
ACTTTGAGTCCATCGGATTCCTCCTGACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTTGTCTCCA
AGATCCAGAAATTTCCAAGTACTGGTTAAAAAATGGAAGAGCTATCTAAAACACGGTGTGAGAACCCCA
CATACAACCGGGTTGAGCTAAATCCCAATCCCCTCCGAGTCTCCACCGCAAGAATATTGAAAGCTACC
TTAGTAGGTTTGGGAGCACCTCGGGTATCCAATTCAGGAGCTTTTTCGTCGTTTTTCCATAGATCTCAG
TCGCAATCATGTATACATTTTTCACATTTTATACAGGCTGCCTTCTTGCAGTAATTGTGGGTCTCATA
TTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAAGATCGCGAGGGAGTTTTTTTTATGGTAACGATGA
ATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATGCAAGATAAGCCTTTGTACGTGCGGGA
GCAAAATGGTTGGCTCATACTCCCTTTTATTTTCTTTTATCAAAAACCCCTGGTGGAGTTTCCAATGCGC
GTGTTTTTGCCTTTCTTGAGTGCATTTTATACTGGATGGTGGGTTTTTACCGCCAGGCAGGAGCTT
TTTTTTACTACTTTGCGGTTCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCTCGGGTCTGGGTTTGCATTGGTGC
CACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCCGTGATTTTGTGCCGCTTGCCATGGTCGGT
GGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTTCAATCCGATTTGGTACTGGTTGGAGAAACCATCCTTTATTCGTC
AGGCCTATATCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCGGTGTGATGGTAGAGGCAA
ACCACCGGGCTACTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACTTGGGTTTCAGCAG
AAGCAATATGAAAGCTGGATTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTTGGGCCG
TTATTTCCCTGACTCTGCCGCGGTACAAAGTTTTAG
```

**Nos bancos de dados também consta a sequência de aminoácidos traduzida de muitos genes (um software faz a tradução)**  
**Cada sequência proteica tem um número de acesso**

**I - Trypanosoma cruzi strain CL Brener ABC transporter**  
**A sequência começa com a Metionina N-terminal**

Met ← **>XP\_806666.1** ABC transporter [Trypanosoma cruzi strain CL Brener  
MSCCRAEVNEPVTPSSASSLESDDQIASKQKGNEPLIEDYSIIAPGFSIKGSVAQFDAVEQNKSSVSGRF  
SIPVSWHNLAYSANGTKILCGLTGTALPSRCLAVMGSSGAGKTTFLNAISDRLKTSRTLKLTGKRQLGDL  
EYKRHYRRMVG FVAQDDILSPRATPEDSLRFSLRVRRGTSISETNKFVEETLEELRLVHCRETIVGIPGL  
VSGLSGGERKRTSIGVELICDPKILLDEPTSGLDSVTSVKIVHLLNNIARTGRTVIYTIHQPTAETLY  
FDDLMLLTGGRCAYHGTMAKSVEYFESIGFPCPERYTPSDFFMKLLQDPEISKVLVKKWKSYLKHGVRTP  
HTTAVELNPNPSESPTAKNIESYLSRFGSTSGIQFQELFRRFSIDLSRNHVYIFSHFIQAAFFAVIVGLI  
FLNVKDDLQAGMVDREGVFFMVTMNRAMGQTFIMVNSFMQDKPLYVREQMVGSYSPFIFFLSKTLVEFPMR  
VFFAFLECCILYWMVGFYRQAGAFFYYFAVIALLTEVASGLGFAIGATFKSLVVASGTAPVILLPLAMVG  
GLLANTDRLHPYWYWLEKPSFIRQAYILLARNEFKHIDHIRCDGRGKPPGYCKDKPQNGEDILRQLGFQQ  
KQYESWILWLTLALLYIAFRGWAVISLYSAARTKF

**Não precisa mais sequenciar os aminoácidos de uma proteína!**

# Exemplos de buscas

# Busca e caracterização de genes

## Problema:

Quero desenhar primers para amplificar por PCR o gene do transportador ABC de **Trypanosoma cruzi strain CL Brener**, cujo número de acesso é **XM\_801573.1**

## Procedimento:

Acesse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Na ferramenta Nucleotide: copie o número de acesso **XM\_801573.1**



The image shows the top navigation bar of the NCBI website with the logo and links for 'Resources' and 'How To'. Below this is the GenBank search interface. It features a search box with a dropdown menu set to 'Nucleotide'. To the right of the search box is a blue 'Search' button. Below the search box is a horizontal menu with several categories: GenBank, Submit, Genomes, WGS, Metagenomes, TPA, TSA, INSDC, and Other, each with a downward arrow indicating a dropdown menu.

# Resultado: Muitas informações sobre o gene

esquisa Google x Trypanosoma cruzi ABC transport x +

ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM\_801573.1

Tube Maps Traduzir Conta corrente BB ... Banco do Brasil

## Trypanosoma cruzi ABC transporter, putative (Tc00.1047053506249.70), partial mRNA

NCBI Reference Sequence: XM\_801573.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS XM\_801573 **1998 bp** mRNA linear INV 06-JAN-2023

DEFINITION Trypanosoma cruzi ABC transporter, putative (Tc00.1047053506249.70), partial mRNA.

ACCESSION XM\_801573

VERSION XM\_801573.1

DBLINK BioProject: [PRJNA15540](#)  
BioSample: [SAMN02953627](#)

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Trypanosoma cruzi

ORGANISM [Trypanosoma cruzi](#)  
Eukaryota; Discoba; Euglenozoa; Kinetoplastea; Metakinetoplastina; Trypanosomatida; Trypanosomatidae; Trypanosoma; Schizotrypanum.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1998)

AUTHORS El-Sayed,N.M., Myler,P.J., Bartholomeu,D.C., Nilsson,D., Aggarwal,G., Tran,A.N., Ghedin,E., Worthey,E.A., Delcher,A.L., Blandin,G., Westenberger,S.J., Caler,E., Cerqueira,G.C., Branche,C., Haas,B., Anupama,A., Arner,E., Aslund,L., Attipoe,P., Bontempi,E., Bringaud,F., Burton,P., Cadag,E., Campbell,D.A., Carrington,M., Crabtree,J., Darban,H., da Silveira,J.F., de Jong,P., Edwards,K., Englund,P.T., Fazelina,G., Feldblyum,T., Ferella,M., Frasch,A.C., Gull,K., Horn,D., Hou,L., Huang,Y., Kindlund,E., Klingbeil,M., Kluge,S., Koo,H., Lacerda,D., Levin,M.J., Lorenzi,H., Louie,T., Machado,C.R., McCulloch,R., McKenna,A., Mizuno,Y., Mottram,J.C., Nelson,S., Ochaya,S., Osoegawa,K., Pai,G., Parsons,M., Pentony,M., Pettersson,U., Pop,M., Ramirez,J.L., Rinta,J., Robertson,L., Salzberg,S.L., Sanchez,D.O., Seyler,A., Sharma,R., Shetty,J., Simpson,A.J., Sisk,E., Tammi,M.T., Tarleton,R., Teixeira,S., Van Aken,S., Vogt,C., Ward,P.N., Wickstead,B., Wortman,J., White,O., Fraser,C.M., Stuart,K.D. and Andersson,B.

TITLE The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease

JOURNAL Science 309 (5733), 409-415 (2005)

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Show in Genome Data Viewer

Reference sequence information

RefSeq protein product  
See the reference protein sequence for ABC transporter, putative (XP\_806666.1).

More about the gene

**Tc00.1047053506249.70**  
Tc00.1047053506249.70 gene  
Also Known As: Tc00.1047053506249.70

Related information

BioProject

BioSample

Protein

PubMed

Taxonomy

Annotated Genomic

Full text in PMC



## Sequência traduzida da proteína

```
/product="ABC transporter, putative"  
/protein_id="XP_806666.1"  
/db_xref="GeneID:3536733"  
/translation="MSCRAEVNEPVTSSASSLESDDQIASKQKGNELIEDYSIIA  
PGFSIKGSVAQFDAVEQNKSSVSGRFSIPVSWHNLAYSANGTKILCGLTGTALPSRCL  
AVMGSSGAGKTTFLNAISDRCLKTSRTLKLTKGRQLGDLEYKRHYRRMVGVAQDDILS  
PRATPEDSLRFLRVRRGTSISETNKFVEETLEELRLVHCRETIVGIPGLVSGLSGGE  
RKRTSIGVELICDPKILLLDEPTSGLDVSVKIVHLLNNIARTGRTVIYTIHQPTAE  
TLTYFDDLMLLTGGRCAYHGTMAKSVEYFESIGFPCPERYTPSDFFMKLLQDPEISKV  
LVKKWKSYLKHGVRTPHTTAVELNPNPSESPTAKNIESYLSRFGSTSGIQFQELFRF  
SIDLSRNHVYIFSHFIQAFFAVIVGLIFLNKDDLAGMQDREGVFFMVTMNRAMGQT  
FIMVNSFMQDKPLYVREQMVGSYSPFIFFLSKTLVEFPMRVFFAFLECCILYWMVGFY  
RQAGAFFYFVAVIALLEVASGLGFAIGATFKSLVVASGTAPVILLPLAMVGGLLANT  
DRLHPYWYWLEKPSFIRQAYILLARNEFKHIDHIRCDGRGKPPGYCKDKPQNGEDILR  
QLGFQQKQYESWILWLTALLYIAFRGWAVISLYSAARTKF"
```

ORIGIN

```
1 atgtcgtgct gccgagcggg ggtgaatgag ccagtaactc ccagctccgc ttcattcattg  
61 gagtctgacg accaaatcgc gtcgaagcag aagggtaacg aaccctcat cgaagactat  
121 agcatcatcg cccccgatt ctccatcaag ggctccgctc gcagttcga cgtgtggaa  
181 caaaaataaga gctccgtgag tggacgcttt tctattcccg tctcatggca taatttggca  
241 tattcggcaa acggcacgaa aattccttgc ggccctcacag gaacagcgtt accgtcacga  
301 tgccttgctg tgatgggatc cagcgggtgc ggcaagacga cttttctcaa tgctatctct  
361 gaccgactta aaacctcgcg tacccttaag ctgacagggg aacgccagct gggggacttg  
421 gagtacaagc gtcattaccg caggatggtt ggttttgtgg cgcaagacga cattctctca  
481 ccacgggcaa caccgaaga tcccttcgc ttttcgctgc gcgtgaggcg tggcacaagc  
541 ataagtgaag cgaataaatt tgttgaggaa actttggagg aattacgcct tgtccactgc  
601 cgtgagacca ttgttgcat ccttggcctt gctctggtc tttcaggtgg tgaacgcaa  
661 cgcacaagta ttggagtggg gtcatttgc gatcctaaaa tctcttgct ggtgaacc  
721 acctctggtc tggactcgt gacatctgtg aagattgtgc atctctgaa taacttgcc  
781 cgaacaggcc gcacggtgat ttacaccatt caccagccca ctgctgagac attgacgtac  
841 tttgatgatc tcatgcttct cactgggggt cgatgtgctt accatggcac gatggcaaaa  
901 tctgtggaat actttgagtc catcggattc ccctgtcctg aacgatatac gccaaagcgt  
961 ttctttatga agttgctcca agatccagaa atttccaagg tactggttaa aaaaatggaag  
1021 agctatctaa aacacggtgt gagaaccca catacaaccg cggttgagct aaaaatggaag  
1081 ccctccgagt ctcccaccgc gaagaatatt gaaagctacc ttagtagggt tgggagcacc  
1141 tcgggtatcc aattccagga gctttttcgt cgtttttcca tagatctcag tcgcaatcat  
1201 gtatacattt tttcacattt tatacaggct gccttctttg cagtaattgt gggctcctata  
1261 tttctgaatg ttaaagatga tttagctggt atgcaagatc gcgagggagt ttttttatg  
1321 gtaacgatga atcgggctat ggggcagact tttatcatgg tcaactcctt tatgcaagat  
1381 aagcctttgt acgtgcggga gcaaatggtt ggctcactat ccccttttat tttctttta  
1441 tcaaaaacc tgggtgagtt tccaatgctc gtgttttttg cttttcttga gtgctgtatt  
1501 ttatactgga tgggtgggtt ttaccgagc gcaggagctt tttttacta ctttgcggtc  
1561 atcgcgctgc ttactgaagt ggcctcgggt cttgggtttg ccattggtgc cacgtttaaa  
1621 agtttggtcg ttgcttcggg taccgcgccc gtgattttgc tgccgcttgc catggtcggg  
1681 ggtcttttgg cgaacacaga tcgacttcat ccgtattggt actgggttga gaaaccatcc  
1741 tttattcgtc aggcctatat tcttcttggc cgcaatgaat ttaagcatat cgaccacatt  
1801 cgggtgtgat gtagaggcaa accaccggc tactgtaaag ataagcccca aaacggcgag  
1861 gatatcttgc gccaaacttg gtttcagcag aagcaatatg aaagctggat tttgtggcta  
1921 actcttgccc ttttatatat tgctttccgc gggtgggccc ttatttcctt gtactctgcc  
1981 gcgcgtacaa agtttttag
```

## Sequência do gene 1-1998

# Desenho de primers

Muitas ferramentas disponíveis

Copie a sequência de nucleotídeos

Informe quantos primers deseja

Informe o tamanho do amplicon Ex. 1998 pb

Informe a faixa de Tm dos primers

Start

## Resultado

ABC Forward 5' GTGAACGCAAACGCACAAGTA 3'

ABC Reverse 5' GAGGTGGGTTCATCCAGCAA 3'

**PRONTO. JÁ POSSO FAZER A PCR!!!!!!!!!!!!!!**