

**XU** Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

**28<sup>o</sup>**  
Encontro de Iniciação Científica da UENF

**20<sup>o</sup>**  
Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

**16<sup>a</sup>**  
Jornada de Iniciação Científica da UFF



**U III** Congresso Fluminense de Pós-Graduação

**23<sup>a</sup>**  
Mostra de Pós-Graduação da UENF

**8<sup>a</sup>**  
Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

**8<sup>a</sup>**  
Mostra de Pós-Graduação da UFF

## Otimização da técnica Single Tube-nested PCR para genotipagem de célula única e embriões bovinos produzidos *in vitro*

Jéssica Macedo Rafael de Arruda, Paula Magnelli Mangiavacchi, Paulo Vitor Maravilha Braga, Leticia dos Santos Nascimento, Mariana da Silva Mendonça, Maria Clara Caldas Bussiere, Angelo José Burla Dias, Álvaro Fabricio Lopes Rios

O sistema de edição gênica CRISPR-Cas tornou-se uma ferramenta essencial para produção de organismos geneticamente modificados (OGMs). Um dos obstáculos após protocolos com a CRISPR é a genotipagem para identificação do transgene e entendimento dos efeitos genéticos. A Single Tube nested PCR (ST-nPCR), utilizada para identificação de micro-organismos, pode ser otimizada para detecção de baixas quantidades de DNA em amostras de célula única e embriões bovinos produzidos *in vitro*. A ST-nPCR é uma das variações da nested PCR (nPCR), no qual em ambos os protocolos é possível fazer duas rodadas para amplificação de regiões do DNA alvo. Na ST-nPCR as amplificações ocorrem no mesmo tubo de reação, enquanto que na nPCR, utiliza-se o produto da 1<sup>a</sup> PCR para realizar a 2<sup>a</sup> amplificação. Além de diminuir o risco de contaminação cruzada, a técnica permite a análise de muitos *loci* simultaneamente e em tempo reduzido. O projeto atual visa otimizar a técnica de genotipagem ST-nPCR para detecção de transgenes em amostras de célula única e de embriões bovinos produzidos *in vitro* após protocolos de CRISPR. As regiões escolhidas para padronização da técnica foram os genes *ROSA 26* (3'ARM), *locus* frequentemente utilizado para inserção de transgenes, o *TSPY* para sexagem dos embriões geneticamente modificados, e o gene *BLG* ( $\beta$ -lactoglobulina), utilizado como promotor gênico do transgene. Além disso, analisar diferentes concentrações de *primers* para aumento de sensibilidade e eficiência da técnica. Para tal, foram utilizadas diferentes concentrações dos *primers* externos (0,01 $\mu$ M; 0,05 $\mu$ M; 0,1 $\mu$ M e 0,2 $\mu$ M) e internos (0,2  $\mu$ M e 0,5  $\mu$ M). Os resultados mostraram que a região *ROSA 26* 3' ARM de todas as amostras apresentou amplificação nas diferentes concentrações de *primers*. O mesmo foi observado na região do *TSPY*, no qual todas as amostras amplificaram em todas as quatro concentrações de *primers* estabelecidas. Para a região *BLG*, as amostras encontram-se em etapa de padronização. De acordo com os dados encontrados até o momento, é possível concluir que a técnica ST-nPCR, em concentrações mínimas de *primers* e DNA alvo, apresenta sensibilidade e eficiência necessária para genotipagem e detecção dos transgenes em amostras geneticamente modificadas. As próximas etapas do projeto visam amplificar duas regiões concomitantemente via ST-nPCR, padronizando as melhores concentrações de *primers* para genotipagem de amostras após modificações via CRISPR-Cas.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: UENF  
Eixo temático: Biociências/ Biotecnologia Animal  
Fomento da bolsa (quando aplicável): CNPq

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:



**XU Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica**

**28<sup>o</sup>**

Encontro de Iniciação Científica da UENF

**20<sup>o</sup>**

Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

**16<sup>a</sup>**

Jornada de Iniciação Científica da UFF



**III Congresso Fluminense de Pós-Graduação**

**23<sup>a</sup>**

Mostra de Pós-Graduação da UENF

**8<sup>a</sup>**

Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

**8<sup>a</sup>**

Mostra de Pós-Graduação da UFF

## Optimization of the Single Tube-nested PCR technique for single-cell genotyping and in vitro-produced bovine embryos

*Jéssica Macedo Rafael de Arruda, Paula Magnelli Mangiavacchi, Paulo Vitor Maravilha Braga, Leticia dos Santos Nascimento, Mariana da Silva Mendonça, Maria Clara Caldas Bussiere, Angelo José Burla Dias, Álvaro Fabricio Lopes Rios*

The CRISPR-Cas gene editing system has become an essential tool for the production of genetically modified organisms. One of the challenges after CRISPR protocols is genotyping for transgene identification and understanding of genetic effects. Single Tube nested PCR (ST-nPCR), used for microorganism identification, can be optimized for the detection of low quantities of DNA in single-cell samples and *in vitro*-produced bovine embryos. ST-nPCR is one variation of nested PCR (nPCR), where both protocols involve two rounds of amplification of target DNA regions. In ST-nPCR, the amplifications occur in the same reaction tube, while in nPCR, the product of the 1st PCR is used for the 2nd amplification. In addition to reducing the risk of cross-contamination, the technique allows for the analysis of multiple loci simultaneously and in a shorter time. The current project aims to optimize the ST-nPCR genotyping technique for transgene detection in single-cell samples and in vitro-produced bovine embryos after CRISPR protocols. The chosen regions for standardizing the technique are the *ROSA26* (3'ARM) genes, frequently used for transgene insertion, *TSPY* for sexing genetically modified embryos, and the *BLG* ( $\beta$ -lactoglobulin) gene, used as the gene promoter for the transgene. Furthermore, different primer concentrations were analyzed to increase the sensitivity and efficiency of the technique. For this purpose, different concentrations of outer primers (0.01  $\mu$ M, 0.05  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, and 0.2  $\mu$ M) and inner (0.2  $\mu$ M and 0.5  $\mu$ M) were used. Regarding the 3'ARM region, all samples showed amplification at different primer concentrations. The same was observed for the *TSPY* region, where all samples amplified at all four established primer concentrations. For the *BLG* region, the samples are still in the standardization stage. Based on the data found so far, it is possible to conclude that the ST-nPCR technique, with minimal primer and target DNA concentrations, exhibits the sensitivity and efficiency required for genotyping and detection of transgenes in genetically modified samples. The next steps of the project involve simultaneous amplification of two regions using ST-nPCR, standardizing the optimal primer concentrations for genotyping samples after CRISPR-Cas modifications.

Research Program of IC, IT or PG: UENF

Thematic axis: Bioscience/ Animal Biotechnology

Scholarship funding (when applicable): CNPq

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:

