



FERNANDA MATIAS
(organizadora)

**PRÁTICAS E PROTOCOLOS BÁSICOS
DE
BIOLOGIA MOLECULAR**

Blucher

Fernanda Matias

(organizadora)

PRÁTICAS E PROTOCOLOS BÁSICOS
DE BIOLOGIA MOLECULAR

Práticas e protocolos básicos de biologia molecular
© 2017 Fernanda Matias (organizadora)
Editora Edgard Blücher Ltda.

Publisher Edgard Blücher
Editor Eduardo Blücher
Coordenação editorial Jonas Eliakim
Produção editorial Carla Almeida
Revisão técnico-científica Clarissa Salton
Figuras Kamilla Carvalho
Diagramação Villa D'Artes
Revisão de texto MPMB
Imagem da capa iStockPhotos

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo Novo Acordo Ortográfico, conforme
5. ed. do *Vocabulário Ortográfico da Língua
Portuguesa*, Academia Brasileira de Letras,
março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por
quaisquer meios, sem autorização escrita da
Editora.

Todos os direitos reservados pela Editora
Edgard Blücher Ltda.

FICHA CATALOGRÁFICA

Práticas e protocolos básicos de biologia
molecular / organização de Fernanda Matias ;
[revisão técnico-científica Clarissa Salton ;
figuras de Kamilla Carvalho]. -- São Paulo :
Blucher, 2021.
276 p.

Diversos autores.
ISBN 978-65-5506-316-5

1. Biologia molecular 2. Laboratórios biológicos
3. Biologia molecular - Manuais de laboratório I.
Matias, Fernanda II. Salton, Clarissa

21-0067

CDD 572.8

Índice para catálogo sistemático:
1. Biologia molecular

CONTEÚDO

Parte I – Organizando o laboratório	19
Capítulo 1 – Boas práticas de laboratório	21
1.1 <i>Princípios gerais</i>	22
1.1.1 <i>Noções básicas de organização do pessoal da unidade de operação</i>	23
1.1.2 <i>Local de trabalho, reagentes, material de uso comum e equipamentos</i>	24
1.1.3 <i>Manutenção das instalações</i>	25
1.2 <i>Cuidados específicos em um laboratório</i>	26
1.2.1 <i>Pipetadores e micropipetadores automáticos</i>	26
1.2.2 <i>Câmara de controle biológico (“fluxo laminar”)</i>	27
1.2.3 <i>Autoclaves</i>	28
1.2.4 <i>Centrífugas</i>	29
1.2.5 <i>Materiais combustíveis e inflamáveis</i>	29
1.2.6 <i>Cabine química (capela)</i>	30
1.2.7 <i>Material criogênico e traps de resfriamento</i>	31
1.2.8 <i>Aparelhos e equipamentos elétricos</i>	31
1.3 <i>Limpeza de bancadas</i>	31
1.3.1 <i>Diluições para soluções básicas de limpeza</i>	32
1.4 <i>Descarte de materiais</i>	33
1.4.1 <i>Procedimentos gerais de descarte</i>	33
1.4.1.1 <i>Resíduos químicos</i>	33
1.4.1.2 <i>Resíduos perfurocortantes</i>	34
1.4.1.3 <i>Material biológico</i>	34
<i>Referências</i>	35
Capítulo 2 – Biossegurança	37
2.1 <i>Riscos de acidentes</i>	37
2.2 <i>Riscos ergonômicos</i>	38
2.3 <i>Riscos físicos</i>	38
2.4 <i>Riscos químicos</i>	38
2.5 <i>Riscos biológicos</i>	38
2.5.1 <i>Níveis de contenção física para riscos biológicos</i>	39
2.6 <i>Montando o manual de biossegurança do laboratório</i>	40
2.6.1 <i>Noções básicas de segurança do pessoal da unidade de operação</i>	40

2.6.2 Saúde e higiene	41
2.6.3 Cuidados gerais	41
2.6.4 Higienização das mãos	42
2.6.5 Equipamentos e procedimentos de emergência.....	43
2.6.6 Acidente com produtos químicos.....	43
2.6.7 Acidente com material biológico.....	43
2.6.8 Acidente com incêndio	44
2.7 Mapa de risco.....	45
2.8 Métodos de controle de agentes de riscos	46
Referências	47

Capítulo 3 – Procedimento Operacional Padrão (POP) 49

3.1 Como fazer um POP.....	49
3.2 Principais passos para se elaborar um POP.....	50
3.3 Exemplo de POP.....	51
3.3.1 Considerações gerais.....	51
3.3.1.1 Desinfecção	51
3.3.1.2 Esterilização	52
3.3.1.3 Limpeza	52
3.3.1.4 Saneante	52
3.3.2 Equipamentos e produtos.....	52
3.3.2.1 Equipamentos	52
3.3.2.2 Produtos.....	53
3.3.3 Procedimento	53
3.3.3.1 Como usar a autoclave vitale	53
3.3.3.2 Como usar a estufa de leo	59
Referências	60

Parte II – DNA..... 61

Capítulo 4 – Extração de DNA 63

4.1 Tampões e reagentes - DNA	63
4.1.1 Solução fenol-sevag.....	63
4.1.1.1 Atenção	64
4.1.2 Solução sevag.....	64
4.1.3 Tampão TE.....	64
4.2 Protocolos de extração de DNA genômico	64
4.2.1 Equipamentos necessários	64
4.2.2 Extração de DNA genômico de fungos	64
4.2.2.1 Reagentes.....	64
4.2.2.2 Procedimento	65
4.2.3 Extração de DNA genômico de bactérias gram-negativas	65

4.2.3.1	Reagentes.....	65
4.2.3.2	Procedimento.....	66
4.2.4	Extração de DNA genômico de bactérias gram-positivas.....	67
4.2.4.1	Reagentes.....	67
4.2.4.2	Procedimento.....	68
4.2.5	Protocolo rápido para extração de DNA genômico de bactérias gram-positivas ou gram-negativas.....	69
4.2.5.1	Reagentes.....	69
4.2.5.2	Procedimento.....	70
4.2.6	Protocolo para extração de DNA genômico de leveduras.....	70
4.2.6.1	Reagentes.....	70
4.2.6.2	Procedimento.....	71
4.2.7	Extração de DNA genômico foliar.....	72
4.2.7.1	Reagentes.....	72
4.2.7.2	Procedimento.....	73
4.2.8	Extração de DNA genômico de linhagens celulares humanas.....	74
4.2.8.1	Reagentes.....	74
4.2.8.2	Procedimento.....	75
4.2.9	Extração de DNA genômico de células animais.....	76
4.2.9.1	Reagentes.....	76
4.2.9.2	Procedimento.....	77
4.2.10	Extração pelo método de Salting Out – sangue.....	78
4.2.10.1	Reagentes.....	78
4.2.10.2	Procedimento.....	78
4.2.11	Extração de DNA animal pelo método orgânico em membrana concentradora.....	79
4.2.11.1	Reagentes.....	79
4.2.11.2	Procedimento.....	79
4.3	Extração de DNA para PCR.....	80
4.3.1	Fungos.....	80
4.3.1.1	Reagentes.....	80
4.3.1.2	Procedimento.....	80
4.3.2	Bactérias.....	80
4.3.2.1	Procedimento.....	80
	Referências.....	81
Capítulo 5 – Limpeza, análise e manipulação de DNA.....		83
5.1	Limpeza de DNA – Desproteíntização.....	83
5.2	Precipitação de DNA.....	83
5.2.1	Precipitação com cloreto de sódio e etanol.....	84
5.2.1.1	Reagentes.....	84
5.2.1.2	Procedimento.....	84
5.2.2	Precipitação com acetato de amônia e isopropanol.....	84
5.2.2.1	Reagentes.....	84
5.2.2.2	Procedimento.....	84
5.2.3	Precipitação com acetato de sódio e etanol.....	85

5.2.3.1 Reagentes.....	85
5.2.3.2 Procedimento	85
5.3 Limpeza de DNA com RNase.....	86
5.3.1 Solução de RNase	86
5.3.2 Procedimento	86
5.4 Gel de agarose para análise de DNA.....	86
5.4.1 Corante de corrida de gel de agarose.....	86
5.4.2 Tampão TAE (50x) pH 8,0.....	86
5.4.3 Tampão TBE (10x).....	86
5.4.4 Procedimento	87
Referências	87
Capítulo 6 – Restrição do DNA	89
6.1 Restrição simples	89
6.1.1 Protocolo padrão.....	89
6.1.2 Protocolo utilizado para restrição simples de produto de PCR.....	89
6.1.3 Protocolo utilizado para restrição simples de plasmídeo	90
6.2 Restrição dupla.....	90
6.2.1 Protocolo padrão.....	90
6.2.2 Protocolo utilizado para restrição dupla de produto de PCR.....	90
6.2.3 Protocolo utilizado para restrição dupla de plasmídeo	90
6.3 Procedimento.....	91
6.4 Ligação de DNA	91
6.4.1 Protocolo padrão.....	91
6.4.2 Protocolo alternativo.....	92
6.4.3 Procedimento	92
6.5 Restrição com enzima coesiva ou de pontas cegas	92
6.5.1 Limpeza	92
6.5.1.1 Procedimento	93
6.5.2 Embotamento com DNA Klenow	93
6.5.2.1 Procedimento	93
6.5.3 Embotamento com T4 DNA polimerase	93
6.5.3.1 Procedimento	93
6.5.4 Desfosforilação do plasmídeo	94
6.5.4.1 Procedimento	94
Referências	94
Parte III – RNA	95
Capítulo 7 – Manipulação do RNA	97
7.1 Manipulação geral	98
7.2 Plásticos descartáveis e não descartáveis	98

7.3 Vidraria	98
7.4 Soluções.....	99
7.4.1 Reagentes.....	99
7.4.2 Procedimento	99
7.5 Tratamento de soluções com DEPC	99
7.5.1 Procedimento	99
7.6 Eletroforese de RNA em gel de agarose	100
7.6.1 Cubas de eletroforese.....	100
7.6.2 Tampões	100
7.6.2.1 Tampão de aplicação formaldeído 10x	100
7.6.2.2 Tampão MOPS 10x (1 L)	100
7.6.2.3 Tampão de reação 1x (por amostra).....	101
7.7 Aplicação de amostra.....	101
7.7.1 Reagentes	101
7.7.2 Procedimento	101
7.8 Extração de RNA.....	102
7.8.1 Extração de RNA utilizando o TRIZOL	102
7.8.1.1 Reagentes.....	102
7.8.1.2 Procedimento	102
7.9 Armazenamento do RNA	103
7.10 Quantificação do RNA	103
7.10.1 Lavagem das cubetas de quartzo	104
7.10.1.1 Reagentes.....	104
7.10.1.2 Procedimento	104
7.11 Pureza do RNA.....	104
7.12 Contaminação por DNA.....	105
7.13 Integridade do RNA	105
7.14 Precipitação do RNA.....	105
7.14.1 Materiais	106
7.14.2 Procedimento	106
Referências	106

Parte IV – Amplificação gênica..... 107

Capítulo 8 – Desenho de iniciadores..... 111

8.1 Regras básicas para desenhar os primers	111
8.1.1 Tamanho dos iniciadores.....	111
8.1.2 Temperatura de desnaturação do primer	112
8.1.2.1 Cálculo básico.....	112
8.1.2.2 Cálculo dependente de sal.....	113
8.1.2.3 Cálculo baseado em termodinâmica	113
8.1.3 Temperatura de anelamento do iniciador (T_a).....	114

8.1.4 Conteúdo de G-C.....	114
8.1.4.1 Repetições e runs	115
8.1.5 Grampo de GC (clamp de GC).....	115
8.1.6 Estruturas secundárias dos primers	115
8.1.6.1 Grampos (hairpins)	115
8.1.6.2 Dímero de primers senso (self dimer)	116
8.1.6.3 Dímero de primers antissenso (cross dimer)	116
8.1.6.4 Evite estruturas secundárias no molde (template do DNA)	116
8.1.6.5 Evite homologia cruzada	117
8.2 Iniciadores degenerados	117
8.2.1 Exemplo de primer degenerado e uso de inosina.....	118
8.3 Desenhando os iniciadores	118
8.3.1 Desenho de primers degenerados.....	119
8.3.1.1 Usando os programas	119
8.4 Testando os iniciadores.....	122
Referências	124
Capítulo 9 – Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	125
9.1 Material necessário	125
9.2 Diluição dos iniciadores (primers)	127
9.3 Escolha da polimerase.....	127
9.4 Metodologia da PCR.....	129
9.4.1 Protocolo básico para o preparo da “mistura de PCR”	130
9.4.1.1 Reagentes.....	130
9.4.1.2 Procedimento	131
9.5 Contaminação	133
9.6 Aperfeiçoamento	134
9.6.1 Hot Start	134
9.6.2 PCR Booster	134
9.6.3 PCR Touchdown	134
9.7 Inibidores.....	134
9.8 Aditivos.....	135
9.9 PCR de colônia	136
9.9.1 Protocolo básico de PCR de colônia.....	137
9.9.1.1 Reagentes.....	137
9.9.1.2 Procedimento	137
Referências	138
Capítulo 10 – PCR em tempo real.....	139
10.1 Síntese de cDNA.....	141
10.1.1 Eliminação de DNA (protocolo promega)	141
10.1.2 Síntese de cDNA (protocolo promega)	142

10.1.2.1 Desnaturação do RNA	142
10.1.2.2 Mix para transcrição reversa	142
10.1.2.3 Programa de síntese de cDNA (um ciclo de cada passo).....	142
10.2 PCR em tempo real: procedimento	143
10.3 Detecção não específica de corantes de ligação ao DNA	143
10.4 Preparação da amostra de cDNA	146
10.5 Sondas de detecção específicas e alvo-específicas.....	147
10.5.1 Sondas TaqMan (TaqMan® Probes).....	148
10.5.1.1 Funcionamento da sonda TaqMan®	148
10.5.1.2 Parâmetros utilizados para desenhar um ensaio TaqMan®	148
10.6 PCR Multiplex	150
Referências	150

Capítulo 11 – Sequenciamento de DNA..... 151

11.1 Purificação do DNA para sequenciamento	153
11.2 Produto de PCR	153
11.3 Protocolo SAP-EXO	153
11.3.1 Material necessário	153
11.3.2 Procedimento:	154
11.4 Recuperando o DNA a partir dos kits de purificação de PCR	155
11.5 Vetores	155
11.6 Quantificação do DNA	156
11.6.1 Gel de eletroforese de agarose.....	156
11.6.2 Espectrofotometria.....	156
11.7 Sequenciamento pelo método do BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit.....	158
11.7.1 Reagentes para volume final de 15 µL	158
11.7.2 Reagentes para volume final de 20 µL	159
11.7.3 Precipitação do produto amplificado a ser sequenciado.....	159
11.7.4 Injetando as amostras.....	160
Referências	161

Capítulo 12 – Mineração em bancos de dados biológicos..... 163

12.1 O receptor de quimiocina do tipo 5 (CCR5) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV)	163
12.2 Entrez e PubMed.....	164
12.3 Explorando outros bancos	169
12.3.1 Protein: base de dados das sequências	169
12.3.2 Structure: estruturas tridimensionais macromoleculares	172
12.3.3 Nucleotide: subconjunto central de registros de sequência de nucleotídeos	174
12.3.4 GSS (genome survey sequence): sequência de análise do genoma	175
12.3.5 Gene: informação centrada em genes	175
12.3.6 BioSystems: rotas e sistemas de moléculas de interação	176

12.3.7 GEO Profiles: perfis de expressão e de abundância molecular	178
12.3.8 PubChem BioAssay: quadro de bioatividade de substâncias químicas.....	179
Referências	181
Parte V – Proteínas	183
Capítulo 13 – Análise e quantificação de proteínas	185
13.1 <i>Quantificação de proteínas por espectrofotômetro</i>	185
13.1.1 <i>Método de Bradford</i>	185
13.1.1.1 <i>Reagentes.....</i>	185
13.1.1.2 <i>Preparo da curva padrão</i>	186
13.1.1.3 <i>Preparo da solução B</i>	186
13.1.1.4 <i>Procedimento:</i>	186
13.1.2 <i>Método de Lowry</i>	188
13.1.2.1 <i>Reagentes.....</i>	188
13.1.2.2 <i>Solução A.....</i>	188
13.1.2.3 <i>Solução B.....</i>	188
13.1.2.4 <i>Solução C.....</i>	188
13.1.2.5 <i>Solução D.....</i>	188
13.1.2.6 <i>Solução E.....</i>	188
13.1.2.7 <i>Procedimento</i>	189
13.1.3 <i>Método de Lowry modificado.....</i>	190
13.1.3.1 <i>Reagentes.....</i>	190
13.1.3.2 <i>Procedimentos da solução CTC.....</i>	190
13.1.3.3 <i>Reagente de Lowry.....</i>	190
13.1.3.4 <i>Reagente de Folin 0,4N</i>	191
13.1.3.5 <i>Solução padrão de Albumina 1 mg/mL</i>	191
13.1.3.6 <i>Procedimento</i>	191
13.2 <i>Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE);</i> <i>gel desnaturante</i>	192
13.2.1 <i>Gel de concentração</i>	194
13.2.1.1 <i>Protocolo de gel a 4%.....</i>	194
13.2.1.2 <i>Protocolo de gel a 5%</i>	194
13.2.2 <i>Tampões de amostra</i>	195
13.2.2.1 <i>Reagentes.....</i>	195
13.2.2.2 <i>Procedimento</i>	196
13.2.3 <i>Eletroforese</i>	196
13.2.3.1 <i>Reagentes.....</i>	196
13.2.3.2 <i>Procedimento</i>	196
13.3 <i>Coloração de proteínas com Azul de Coomassie</i>	197
13.3.1 <i>Reagentes.....</i>	197
13.3.1.1 <i>Solução corante.....</i>	197

13.3.1.2 Solução descolorante	197
13.3.2 Procedimento	197
13.4 Coloração de proteínas com prata I	198
13.4.1 Reagentes	198
13.4.1.1 Solução A	198
13.4.1.2 Solução B.....	198
13.4.1.3 Solução C.....	198
13.4.1.4 Solução reveladora.....	198
13.4.2 Procedimento	198
13.5 Coloração de proteínas com prata II	199
13.5.1 Reagentes.....	199
13.5.1.1 Solução de DTT.....	199
13.5.1.2 Solução de nitrato de prata.....	199
13.5.1.3 Solução reveladora.....	199
13.5.2 Procedimento	199
13.6 Coloração de proteínas com prata III	200
13.6.1 Reagentes	200
13.6.1.1 Solução fixadora.....	200
13.6.1.2 Solução de lavagem	200
13.6.1.3 Solução preparadora.....	200
13.6.1.4 Solução de coloração	200
13.6.1.5 Solução reveladora.....	200
13.6.1.6 Solução de parada.....	200
13.6.1.7 Solução de armazenamento.....	200
13.6.2 Procedimento	200
13.7 Descoloração de géis	201
13.7.1 Descoloração de géis corados com prata I	201
13.7.1.1 Reagentes	201
13.7.1.2 Solução descolorante	201
13.7.1.3 Procedimento	202
13.7.2 Descoloração de géis corados com prata II	202
13.7.2.1 Reagentes.....	202
13.7.2.2 Procedimento	202
Referências	203
Capítulo 14 – Expressão de genes e proteínas	205
14.1 Regiões controladoras	205
14.2 Marcadores, caudas e sítios de clivagem	205
14.3 Subclonagem	206
14.4 Seleção de um hospedeiro adequado.....	206
14.5 Células de mamíferos	207
14.5.1 Células de camundongos.....	207
14.5.2 Células de hamsters.....	207

14.5.3 Células de ratos	207
14.5.4 Células COS.....	207
14.5.5 Células embrionárias de rim humano.....	208
14.5.6 Outras células humanas	208
14.5.7 Células de drosófila	208
14.6 Leveduras	208
14.7 Expressão de proteínas em procaríotos.....	208
14.8 Indução com IPTG.....	211
Referências.....	211
Capítulo 15 – Vetores.....	213
15.1 Seleção de um vetor de expressão.....	213
15.1.1 Regiões promotoras	214
15.1.2 Região de poliadenilação	214
15.1.3 Marcadores de seleção.....	214
15.1.4 Regulação da expressão.....	214
15.1.5 Sistemas de vetores simples e duplos.....	214
15.2 Vetores para clonagem de plantas	215
15.2.1 Vetores provenientes de Agrobacterium tumefaciens.....	215
15.2.2 Transferência direta de DNA	215
15.3 Vetores de clonagem em insetos	216
15.3.1 Elementos P de Drosophila melanogaster	216
15.3.2 Vetores de clonagem baseados em vírus de insetos.....	217
15.4 Vetores de clonagem em mamíferos	217
15.4.1 Simian virus 40 (SV40).....	217
15.4.2 Adenovírus.....	218
15.4.3 Vírus associados ao adenovírus (AAV).....	218
15.4.4 Papiloma vírus bovino	218
15.5 Vetores de leveduras	219
15.6 Vetores de bactérias	221
15.6.1 Bacteriófagos	221
15.6.2 Plasmídeos	221
15.6.3 Fagemídios	222
15.6.4 Cosmídeos	222
15.6.5 Outros tipos de vetores	222
15.6.5.1 Derivados do bacteriófago P1	222
15.6.5.2 PAC (cromossomo artificial P1)	222
15.6.5.3 BAC (cromossomo artificial bacteriano).....	223
15.7 Lendo o mapa de um vetor	223
15.8 Isolamento e purificação de vetores.....	226
15.9 Isolamento e purificação de DNA plasmidial bacteriano por lise alcalina	227

15.9.1 Reagentes.....	227
15.9.1.1 Solução GETL.....	227
15.9.1.2 Acetato de potássio.....	227
15.9.2 Procedimento	227
15.10 Isolamento e purificação de DNA plasmidial bacteriano por ebulição: miniprep	228
15.10.1 Reagentes.....	228
15.10.2 Solução STET.....	228
15.10.2.1 Para 100 mL	228
15.10.3 Preparo de RNase.....	228
15.10.4 Procedimento	229
15.11 Isolamento e purificação de DNA plasmidial de levedura	230
15.11.1 Reagentes.....	231
15.11.1.1 Tampão de Lise.....	231
15.11.2 Procedimento	231
Referências	231
Capítulo 16 – Transformação	233
16.1 Preparação de bactérias competentes pelo método de cloreto de cálcio	233
16.1.1 Material necessário.....	233
16.1.2 Procedimento	234
16.2 Preparação de bactérias competentes pelo método de magnésio (ou sais).....	234
16.2.1 Material necessário.....	234
16.2.1.1 Preparo do tampão de transformação.....	235
16.2.2 Procedimento	235
16.3 Preparo de células eletrocompetentes	236
16.3.1 Material necessário.....	236
16.3.2 Procedimento	236
16.4 Transformação de bactérias com plasmídeos pelo método de choque térmico.....	237
16.4.1 Material necessário.....	237
16.4.2 Procedimento	237
16.5 Transformação de células E. coli por eletroporação.....	238
16.5.1 Material necessário.....	238
16.5.2 Procedimento	238
16.6 Transformação de leveduras	239
16.6.1 Reagentes.....	239
16.6.2 Material necessário.....	239
16.6.3 Procedimento para obtenção de células competentes.....	239
16.7 Procedimento para transformação	240
16.7.1 Material necessário.....	240
16.7.2 Procedimento:	240
16.8 Transformação rápida e fácil de leveduras (método TRAF0)	241
16.8.1 Material necessário:.....	241

16.8.2 Procedimento:	241
16.9 Transformação de leveduras; método do acetato de lítio	243
16.9.1 Material necessário:	243
16.9.2 Procedimento:	243
Referências	244
Capítulo 17 – Visualização e manipulação <i>in silico</i> de proteínas tridimensionais	245
17.1 Swiss-PDBViewer	245
17.1.1 Obtenção e instalação	245
17.1.2 Utilização	246
17.1.3 Painel de controle (CP)	247
17.1.4 SPDBV-Color	250
17.2 Chimera	252
17.2.1 Abrindo uma molécula no Chimera (File)	253
17.2.2 Seleção & ação (Selection & Action)	253
17.2.3 Opções pré-definidas (Presets)	256
17.2.4 Ferramentas (Tools)	256
17.2.4.1 Controles gerais (General controls)	257
17.2.4.2 Controles de visualização (Viewing controls)	258
17.2.4.3 Análise estrutural (Structural analysis)	259
17.2.4.4 Comparação estrutural (Structure comparison)	259
17.3 Comentários adicionais	260
Referências	261
ANEXO I	263
ANEXO II	269
Sobre os autores	273

PARTE I – ORGANIZANDO O LABORATÓRIO

Antes de iniciarmos qualquer trabalho, devemos avaliar as suas condições. Isso significa conferir se todos os reagentes estão disponíveis, avaliar os protocolos que serão utilizados, a rotina de experimentação e o tempo necessário e verificar se tudo está acertado para a execução do experimento. Ou seja: é necessário organizar o laboratório.

Visando facilitar o uso do laboratório e o treinamento de pessoal, devemos adotar um manual de biossegurança e de procedimentos operacionais padrão. Esses dois itens fazem parte das boas práticas de laboratório que determinam o bom funcionamento e a padronização das regras de uso daquele ambiente e das experimentações que lá serão feitas. Dessa forma, garantimos um melhor desempenho no ambiente de trabalho, com menos perda de tempo a cada experimentação feita pelos diferentes usuários.

CAPÍTULO 1

BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

Sabrina Dick, Karina Teixeira Pinheiro

Laboratórios não são lugares necessariamente perigosos, embora possam apresentar certo risco potencial. Todos os que trabalham direta ou indiretamente nesses ambientes devem ser responsáveis ao desenvolver suas atividades, evitando atitudes que possam acarretar acidentes e possíveis danos a eles mesmos, aos colegas, ao patrimônio e ao meio ambiente. Esteja sempre atento e seja cuidadoso e metódico com relação ao trabalho a ser executado, concentrando-se nas atividades e evitando quaisquer distrações. Da mesma forma, não distraia os demais usuários durante a execução de trabalhos no laboratório.

Os acidentes não acontecem; eles são causados. Resultam, normalmente, de uma atitude indiferente dos utilizadores, da ausência de senso comum, da falha no cumprimento das instruções a serem seguidas ou da pressa excessiva na obtenção de resultados. Vale salientar que os riscos de acidentes são maiores quando nos acostumamos a conviver com o perigo e passamos a ignorá-lo. Sendo assim, acidentes podem ser evitados, ou pelo menos terem suas consequências minimizadas, desde que sejam tomadas as devidas precauções.

Os princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) são o conjunto de regras básicas necessárias para o funcionamento seguro dos laboratórios e das aulas práticas, e dizem respeito à organização e às condições sob as quais estudos em laboratórios e/ou de campo são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados e relatados. As BPL são um sistema de qualidade fundamental para o desenvolvimento de testes de qualidade assegurada e para a confiabilidade de todo o processo técnico-científico.

No Brasil, a partir do Decreto nº 6.275, de 28 de novembro de 2007, a Coordenação Geral de Acreditação (Cgcre), vinculada ao Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade (Inmetro), passou a ser a autoridade brasileira de monitoramento da conformidade aos princípios das BPL, reconhecendo e acreditando instalações de teste que realizam estudos exigidos por órgãos regulamentadores para o registro de produtos agrotóxicos, farmacêuticos, aditivos de alimentos e rações, cosméticos, veterinários, produtos químicos industriais e organismos geneticamente modificados (OGM), entre outros, visando avaliar os riscos ambiental e à saúde humana. Para estabelecer os procedimentos e os documentos normativos utilizados no reconhecimento

da conformidade de instalações/unidades de teste aos princípios das BPL, a Cgcre criou a “Norma Nº NIT-DICLA-035 - Princípios das boas práticas de laboratório (BPL)”¹ a partir de documentos publicados pela Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômica (OCDE). Os documentos que complementam essa norma são: NIT-DICLA-034; NIT-DICLA-036; NIT-DICLA-037; NIT-DICLA-038; NIT-DICLA-039; NIT-DICLA-040; NIT-DICLA-041; NIT-DICLA-043.

A implantação das BPL tem como objetivos a garantia de dados confiáveis, a padronização de procedimentos, a racionalização do trabalho e a eliminação de erros operacionais, além de possibilitar maior rapidez no acesso às informações, melhorias nos resultados, aperfeiçoamento dos procedimentos de trabalho e aceitação ampla dos dados produzidos.

A seguir, são expostas algumas diretrizes básicas das BPL. Para o caso de se pretender a acreditação do Inmetro, sugerimos que sejam seguidas as etapas do Programa de Monitoramento de BPL e instaurado um sistema de gestão de qualidade e biossegurança comprometido com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), ambos disponíveis nos websites das respectivas instituições. Essa certificação, bem como as da Organização Internacional para Padronização (International Organization for Standardization - ISO), confere uma maior confiabilidade de produtos, processos e/ou serviços de uma organização.

1.1 PRINCÍPIOS GERAIS

As regras e os conselhos gerais para desenvolver um trabalho laboratorial com segurança estão principalmente relacionados a organização. Isso significa que o tempo dedicado à organização das atividades contribui para prevenir riscos químicos, biológicos e acidentes inerentes à manipulação de reagentes e equipamentos.

Antes de qualquer trabalho laboratorial, o operador deve estar informado sobre os riscos oferecidos pelos produtos químicos e equipamentos a serem utilizados. Conhecer os procedimentos de segurança e de emergência em casos de acidentes ajuda na proteção contra os possíveis riscos. O operador deve sempre planejar o trabalho que vai realizar, pois só assim poderá executá-lo com segurança.

Dicas

- Nenhum trabalho é tão importante e tão urgente que não possa ser planejado e executado com segurança.
- A segurança é uma responsabilidade coletiva que requer a cooperação de todos os indivíduos do laboratório.

¹ Disponível no site do Inmetro: <http://www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/>. Acesso em: 13 abr. 2017.

As BPL exigem que todos os membros de um laboratório observem algumas regras básicas de utilização das dependências, conforme descritas a seguir.

1.1.1 NOÇÕES BÁSICAS DE ORGANIZAÇÃO DO PESSOAL DA UNIDADE DE OPERAÇÃO

1. Leve à bancada de trabalho apenas o material indispensável à sua execução. Guardar os objetos pessoais (bolsas, casacos etc.) nos armários existentes na área externa ao laboratório, se disponíveis, ou em área exclusiva para esses objetos.
2. Certifique-se de que os integrantes do grupo e os visitantes estejam utilizando os equipamentos de segurança adequados. O acesso de pessoas não autorizadas ao laboratório deve ser restrito e controlado.
3. Sempre trabalhe vestindo um jaleco branco com mangas longas. Atente aos fatos de que o jaleco deve ser usado apenas durante a experimentação e que ele só deve ser retirado do laboratório para lavagem, o que deve ser feito toda semana. Antes de lavá-lo normalmente, esterilize-o com a ajuda de um aparelho de autoclave utilizando um recipiente adequado.
4. Novos usuários devem ter treinamento e orientação específicos sobre as BPL e sobre os princípios de biossegurança aplicados ao trabalho que irão desenvolver. Esse treinamento deve ser providenciado pelo responsável pelo laboratório.
5. Não perturbe ou distraia quem estiver realizando um trabalho no laboratório.
6. Todos os procedimentos, como uso de equipamentos, protocolos de preparação de soluções etc., devem ser conduzidos de acordo com um procedimento operacional padrão (POP) de fácil acesso aos usuários do laboratório. Os POP devem ser revistos periodicamente, datados e assinados pelo responsável pelo laboratório.
7. Planeje bem os protocolos e realize seus procedimentos operacionais. Antes de começar um experimento, saiba exatamente o que será consumido e quais equipamentos serão utilizados, verificando suas disponibilidades.
8. Crie o hábito de registrar todos os detalhes de experimentos em um caderno individual (que deve ser mantido no laboratório) para garantir a reprodutibilidade experimental e possibilitar a detecção de erros experimentais e suas correções.
9. Evite trabalhar sozinho e fora do horário de trabalho convencional. Procure sempre trabalhar próximo de alguém que possa ouvi-lo se houver qualquer problema. Caso precise utilizar o laboratório fora do

horário convencional de trabalho, comunique o fato ao responsável pelo local e, se necessário, peça a ele uma autorização.

10. Ao trabalhar com materiais ou técnicas de risco, o responsável pelo laboratório tem o direito de exigir que outra pessoa esteja presente.
11. Certos cilindros de gases, como os de CO e H₂, não podem permanecer nos laboratórios quando não estiverem sendo usados. Os demais cilindros, quando em uso, ou mesmo quando armazenados, devem estar sempre presos às paredes ou às bancadas.
12. Não utilize vidrarias trincadas, lascadas ou quebradas no laboratório.
13. Sempre utilize luvas para manusear ponteiros e mantenha os suportes sempre cheios.
14. Caminhe com atenção e nunca corra no laboratório.
15. Não faça nada com pressa!

1.1.2 LOCAL DE TRABALHO, REAGENTES, MATERIAL DE USO COMUM E EQUIPAMENTOS

1. O local de trabalho deve ser mantido sempre em ordem. Ao perceber algo fora do lugar, coloque-o de volta no local apropriado. A iniciativa própria para manter a ordem é sempre muito bem-vinda.
2. Seja cuidadoso para não contaminar equipamentos dentro ou fora da sala.
3. Todos os usuários deverão limpar e arrumar as bancadas e os equipamentos após o uso. Descontamine todas as superfícies de trabalho diariamente, antes e após o uso, e quando houver respingos ou derramamentos. Observe o processo de desinfecção específico para a escolha e a utilização do agente desinfetante adequado.
4. Cuide da limpeza adequada do material utilizado para não contaminar os reagentes.
5. Mantenha os reagentes inflamáveis tão longe de chamas ou fontes de calor quanto possível.
6. Use os equipamentos do laboratório apenas para seu propósito designado. Utilize os equipamentos somente após ter lido e compreendido suas instruções de manuseio e segurança.
7. Sempre anote a data de utilização de um equipamento quando houver um “livro” de registro de uso.
8. Ao perceber que um equipamento está quebrado, registre o problema em um livro de registro de uso e o comunique imediatamente aos responsáveis para que o reparo possa ser providenciado.
9. Consulte dados de segurança, propriedades físicas e toxicidade de reagentes químicos com os quais não esteja familiarizado antes

de utilizá-los, e esteja atento aos procedimentos apropriados de manuseio de agentes perigosos.

10. Todos os recipientes que contenham produtos, especialmente os que oferecem algum risco, devem estar devidamente rotulados com uma clara identificação, o mais completa possível.
11. Evite exposição a gases, vapores e aerossóis. Utilize sempre uma cabine química (capela) ou uma câmara de controle biológico (“fluxo laminar”) para manusear esses materiais.
12. Evite qualquer contato entre reagentes e a pele.
13. Nunca deixe frascos de reagentes abertos e estoque-os o mais próximo possível do chão.
14. Não carregue reagentes químicos pelos corredores. Mantenha-os sempre próximos à estação de trabalho para evitar acidentes.
15. Nunca aqueça recipientes fechados.
16. Siga os procedimentos de descarte adequados para cada reagente ou material de laboratório.
17. Sempre que efetuar a diluição de um ácido concentrado, adicione lentamente, e sob agitação, o ácido sobre a água, e nunca o contrário.
18. Ao aquecer um tubo de ensaio contendo qualquer substância, nunca direcione a extremidade aberta do tubo a você ou a uma pessoa próxima.
19. Ao testar o odor de um produto químico, desloque os vapores que se desprendem do frasco com as mãos em sua direção. Nunca coloque o frasco sob o nariz. Tenha em mente que esse teste nem sempre pode ser feito.

Dica

- Lembre-se de que, dependendo da concentração, todas as substâncias são tóxicas.

1.1.3 MANUTENÇÃO DAS INSTALAÇÕES

1. As áreas de trabalho devem estar sempre limpas e livres de obstruções.
2. Escadas e saguões não devem ser usados para estocagem de materiais ou equipamentos de laboratório. Isso se aplica também a equipamentos de uso pessoal (por exemplo, bicicletas, rádios etc.).
3. As áreas de circulação e de passagem dos laboratórios devem ser sempre mantidas limpas.
4. Os acessos aos equipamentos e às saídas de emergência nunca devem estar bloqueados.

5. Os equipamentos de laboratório devem ser inspecionados e mantidos em boas condições de uso por pessoas qualificadas para esse trabalho. A frequência de inspeção depende da taxa de risco do equipamento e das instruções do fabricante. Os registros contendo inspeções, manutenções e revisões dos equipamentos devem ser guardados e arquivados pelo líder do laboratório.
6. Todos os equipamentos devem ser guardados adequadamente para prevenir quebra ou perda de componentes.
7. Quando possível, os equipamentos devem possuir filtros de linha que evitem sobrecarga devido à queda e ao posterior restabelecimento de energia elétrica.
8. Os equipamentos e reagentes químicos devem ser estocados de forma apropriada.
9. Reagentes derramados devem ser limpos imediatamente e de maneira segura.
10. Os materiais descartados devem ser etiquetados e colocados em locais adequados.
11. Materiais usados ou não etiquetados não devem ser acumulados no interior do laboratório e devem ser descartados imediatamente após a sua identificação, seguindo os métodos adequados para descarte de material de laboratório.

Dicas

- Para organizar melhor o laboratório, codifique os reagentes, identifique-os com um adesivo e faça uma lista contendo o código e o nome de cada reagente. Essa lista deve estar disponível para consulta a todos.
- Identifique com letras grandes em papel autoadesivo o que há em cada gaveta e atrás de cada porta.

1.2 CUIDADOS ESPECÍFICOS EM UM LABORATÓRIO

1.2.1 PIPETADORES E MICROPIPETADORES AUTOMÁTICOS

1. Muito cuidado para não encostar a haste do pipetador nas paredes dos frascos ou nos líquidos.
2. O pistão das micropipetas possui dois estágios: o primeiro é o de ajuste de aspiração e o segundo é o de dispensa do volume medido. Para garantir a precisão da pipetagem, pressione o pistão até o primeiro estágio e, após o encaixe da ponteira, mergulhe-a no líquido e solte lentamente o pistão. Para liberar totalmente o líquido pipetado, basta pressionar o pistão até o segundo estágio.

3. Pressione o pistão de modo lento e constante.
4. Sempre troque a ponteira antes de aspirar líquidos, amostras ou reagentes diferentes.
5. NUNCA pipete líquidos com temperatura superior a 70 °C ou inferior a 4 °C.
6. Não vire o pipetador de cabeça para baixo ou deite-o enquanto houver líquido na ponteira, pois o líquido pode ir para o interior da micropipeta, prejudicando a calibragem e diminuindo o tempo de vida útil da mesma.
7. Tenha cuidado ao aspirar suas amostras para que elas não entrem no pipetador. Caso isso ocorra, proceda à limpeza interna dele ou solicite ajuda de seu supervisor para o procedimento.
8. Depois de pipetar líquidos ácidos ou corrosivos, remova o porta-cone e lave o pistão, o selo, o-ring e o interior do porta-cone com água destilada. Se não souber como proceder, solicite ajuda.
9. Se sujar o pipetador por fora, tenha sempre o cuidado de limpá-lo.
10. NUNCA ajuste o volume acima da especificação.

1.2.2 CÂMARA DE CONTROLE BIOLÓGICO (“FLUXO LAMINAR”)

1. A circulação de pessoas no laboratório durante o uso da cabine deve ser evitada.
2. Ligue a cabine e a luz UV de 15 min a 20 min antes e após o seu uso.
3. Trabalhe com as portas do laboratório fechadas.
4. Antes de iniciar o trabalho e ao finalizá-lo, descontamine todo o interior da câmara com gaze estéril embebida em álcool etílico ou isopropílico a 70%.
5. Lave mãos e antebraços com água e sabão e seque-os com papel toalha descartável.
6. Passe álcool etílico ou isopropílico a 70% nas mãos e nos antebraços.
7. Use jaleco de manga longa, luvas, máscara, gorro e propé quando necessário.
8. Coloque os equipamentos, os meios, a vidraria etc. no plano de atividade da área de trabalho.
9. Limpe todos os objetos antes de introduzi-los na cabine.
10. Organize os materiais de modo que itens limpos e contaminados não se misturem.
11. Minimize os movimentos dentro da cabine.

12. Coloque os recipientes para descarte de material no fundo ou nas laterais da área de trabalho (pode ser em câmaras laterais).
13. Cuide para nunca obstruir o fluxo de ar da cabine pelo mau posicionamento de objetos em seu interior.
14. Faça uso de um incinerador elétrico ou de um microqueimador automático. Quando utilizar o bico de Bunsen, tome cuidado com a altura da chama, pois ela pode queimar o filtro HEPA. Sempre que possível, use um pipetador automático. Se utilizar pipetadores de vidro, higienize-os em uma autoclave em embalagens individuais ou em tubos específicos para esse fim, deixando a ponta da pipeta para baixo.
15. Conduza as manipulações no centro da área de trabalho.

1.2.3 AUTOCLAVES

1. As autoclaves utilizam como método de esterilização o calor úmido sob pressão (vapor de água saturado). A esterilização se dá após pelo menos 20 min a 121 °C, pressão de 1 atmosfera (101 kPa, 151 lb/in acima da pressão atmosférica).
2. Prepare o material cobrindo as aberturas e as partes vulneráveis com folha de alumínio, no caso de vidrarias, ou empacote-o completamente em campo de algodão ou papel crepado, ou ainda envelopando-o em papel grau cirúrgico.
3. Sempre cole a fita indicativa de autoclavagem antes do processo de esterilização. Isso só não é necessário em caso de utilização do papel grau cirúrgico que vem com o indicador de esterilização na lateral.
4. Todos os frascos, vazios ou não, devem sempre estar com suas tampas semiabertas.
5. Não utilize autoclaves automáticas (que liberam a pressão interna abruptamente) para esterilização de líquidos e meios de cultura. Nesses casos, a autoclave deve diminuir a pressão interna pelo resfriamento gradual do sistema até a temperatura ambiente, para que então se proceda à abertura do equipamento e à retirada do material estéril. Se a pressão for liberada repentinamente, com o sistema aquecido, o líquido a ser esterilizado entrará em ebulição e poderá vazar dentro da autoclave, podendo causar danos ao equipamento.
6. Providencie com antecedência o material estéril a ser utilizado, identificando-o com nome e data de esterilização.
7. Sempre que utilizar a autoclave para descontaminação de material infectante, proceda à limpeza interna da mesma e à troca da água de seu interior. Preferencialmente, utilize a autoclave apenas para descontaminação de material.
8. Use água destilada nas autoclaves sempre que possível.

9. Periodicamente, realize um teste biológico de esterilização nas autoclaves. O Ministério da Saúde recomenda o uso dos indicadores biológicos, semanalmente, na instalação e na manutenção da autoclave e também em todas as cargas que contenham artigos implantáveis. Os indicadores biológicos para autoclaves consistem em esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, geralmente autocontidos, e você deve seguir as indicações do fabricante do teste para assegurar a sua validade. Todos os resultados desses testes devem ser documentados e arquivados.

1.2.4 CENTRÍFUGAS

1. Sempre verifique se os tubos a serem centrifugados estão bem fechados.
2. Se houver uma tampa interna, verifique se a mesma se encontra bem encaixada e fechada.
3. No caso de centrífugas refrigeradas, após a sua utilização, desligue-a e aguarde o derretimento de possíveis cristais de gelo para proceder com a secagem da água que se formou, e só então feche a tampa. Nunca desligue o equipamento e feche-o se houver gelo ou água em seu interior. Isso pode ocasionar contaminação por microrganismos e deterioração das borrachas de vedação, entre outros problemas.
4. Tenha sempre muito cuidado ao utilizar ultracentrífugas. Elas podem atingir velocidades de centrifugação altíssimas e, se não forem bem utilizadas, podem provocar acidentes.

1.2.5 MATERIAIS COMBUSTÍVEIS E INFLAMÁVEIS

1. Guarde todos os materiais combustíveis e inflamáveis apropriadamente.
2. Trabalhe sempre com uma ventilação adequada se uma atmosfera inflamável puder ser gerada; por exemplo, ao pipetar solventes inflamáveis.
3. Avise a todos os presentes no laboratório quando estiver realizando um procedimento que utilize líquidos ou gases combustíveis ou inflamáveis.

Dica

- Ao trabalhar com materiais combustíveis ou inflamáveis, evite o uso do bico de Bunsen, de modo direto ou indireto, pela proximidade da chama e pelos materiais utilizados. Se precisar usar a chama, utilize-a apenas durante o tempo necessário e apague-a assim que terminar o trabalho. Não é recomendável proceder a uma destilação em pressão reduzida utilizando uma chama devido à possibilidade de superaquecimento

local. Antes de acender a chama, remova todos os materiais combustíveis e inflamáveis da área de trabalho. Evite também utilizar a chama próxima a equipamentos que possam gerar faíscas.

1.2.6 CABINE QUÍMICA (CAPELA)

As capelas dos laboratórios servem para conter o trabalho com reações que utilizem ou produzam vapores tóxicos, irritantes ou inflamáveis, mantendo o laboratório livre de tais componentes. Com a janela corrediça abaixada, a capela fornece uma barreira física entre o executor da tarefa e a reação química. Todos os procedimentos envolvendo a liberação de materiais voláteis, tóxicos ou inflamáveis devem ser realizados em uma capela para eliminar os riscos.

Dica

- As capelas não são uma proteção contra explosões.

Quando existe risco de explosão, outras medidas adicionais devem ser tomadas para proteção individual. Os equipamentos utilizados em capelas devem ser aparelhados com condensadores, *traps* de resfriamento ou sugadores para conter e coletar, na medida do possível, os solventes de descarte e os vapores tóxicos. A capela não é um meio de descarte de reagentes químicos.

1. As capelas devem ser verificadas antes de cada utilização (no mínimo uma vez por mês) para assegurar que a exaustão de gases funcione apropriadamente. Antes de sua utilização, assegure-se de que o fluxo de ar esteja adequado.
2. A janela corrediça deve permanecer fechada, exceto quando a capela estiver passando por reparos ou quando estiver sendo utilizada. Na eventualidade de estar aberta, a janela deve ficar elevada entre 30 a 45 cm.
3. Os aparelhos, equipamentos e reagentes devem ser colocados pelo menos a 15 cm de distância da janela da capela. Esse procedimento reduz a turbulência durante o manuseio e evita a perda de contaminantes para fora da capela, na área do laboratório.
4. As capelas não devem ser utilizadas como local de estoque de reagentes. Isso pode interferir no fluxo de ar em seu interior e provocar riscos adicionais às reações e aos processos efetuados no seu interior. Os frascos com reagentes químicos e os frascos para descarte de solventes devem estar presentes no interior da capela somente enquanto estiverem em uso, e devem ser estocados em lugares apropriados após o uso.
5. As capelas devem ser deixadas em funcionamento contínuo durante o manuseio de reagentes em seu interior.

6. O uso da capela é altamente recomendado ao se trabalhar com materiais e combustíveis inflamáveis, materiais oxidantes, materiais com efeitos tóxicos sérios e imediatos, materiais com outros efeitos tóxicos, materiais corrosivos e materiais que reagem perigosamente.

1.2.7 MATERIAL CRIOGÊNICO E TRAPS DE RESFRIAMENTO

1. Utilize luvas e máscaras apropriadas ao preparar ou manusear *traps* de resfriamento abaixo de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou líquidos criogênicos (por exemplo, nitrogênio líquido).
2. Nunca utilize nitrogênio líquido ou ar líquido no resfriamento de materiais inflamáveis ou combustíveis em contato com o ar. O oxigênio da atmosfera pode condensar e há risco de explosão.
3. Utilize sempre um frasco de Dewar específico para líquidos criogênicos, e não um frasco normal para vácuo.
4. Use luvas apropriadas ao manusear materiais criogênicos (por exemplo, gelo seco).
5. Sistemas de resfriamento contendo gelo seco/solvente devem ser preparados com cuidado pela adição lenta de pequenas quantidades de gelo seco ao solvente; isso evita que, ao borbulhar, o solvente seja derramado.
6. Nunca coloque a cabeça no interior de um recipiente contendo gelo seco, uma vez que um alto nível de CO_2 pode se acumular dentro do recipiente e provocar asfixia.

1.2.8 APARELHOS E EQUIPAMENTOS ELÉTRICOS

1. Todos os equipamentos elétricos adquiridos ou aprovados devem ter certificado de qualidade.
2. Não utilize extensões para ligar aparelhos a instalações permanentes.
3. Utilize interruptores com circuito de fio terra quando existir o risco de o operador estar simultaneamente em contato com água e equipamentos elétricos.
4. Somente pessoal qualificado e treinado está autorizado a consertar ou modificar equipamentos elétricos ou eletrônicos.

1.3 LIMPEZA DE BANCADAS

Independentemente do procedimento a ser realizado sobre a bancada, uma correta e eficiente limpeza dessa superfície é indispensável. Todo o

procedimento pode ser comprometido se a bancada utilizada estiver contaminada. A limpeza deve ser feita com papel toalha, sem esfregar repetida ou circularmente e sempre utilizando luvas (como mostra a Figura 1.1). Utilize uma solução de hipoclorito de sódio (0,5%) seguido de etanol (70%).

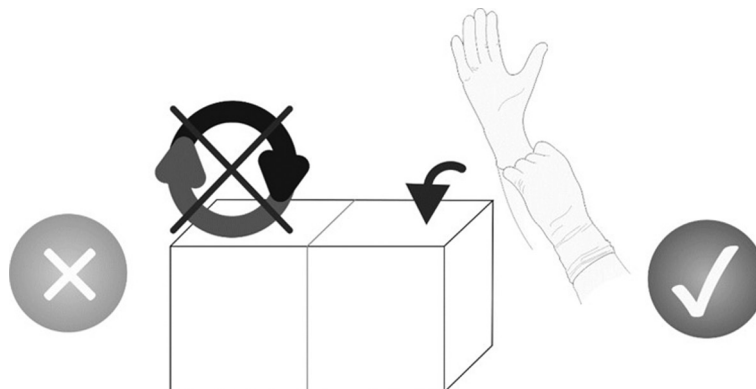


Figura 1.1 Modo correto de limpeza de uma bancada.

1.3.1 DILUIÇÕES PARA SOLUÇÕES BÁSICAS DE LIMPEZA

Em geral, os produtos utilizados na limpeza de bancadas e materiais precisam ser diluídos, pois sua composição pura torna-se desnecessária ou até mesmo prejudicial. Assim, é preciso diluir tais produtos a concentrações específicas.

Usando a fórmula apresentada a seguir, inicia-se o processo de diluição. Com esta fórmula é possível identificar a quantidade (volume) do produto original necessária para se obter a concentração final desejada.

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

em que

V1 = volume do produto original;

V2 = volume do produto diluído (varia de acordo com a necessidade do laboratório);

C1 = concentração original do produto;

C2 = concentração desejada/diluída.

Após descobrir o volume do produto original necessário para a diluição, basta medi-lo utilizando uma proveta ou pipeta. Coloque o volume medido em uma proveta e complete com água destilada até chegar ao volume desejado (o mesmo utilizado no cálculo). Para finalizar, deposite a solução produzida em um recipiente devidamente identificado.

Esse roteiro pode ser utilizado na produção de soluções de etanol, hipoclorito de sódio, detergentes, entre outros.

Exemplo:

Tendo à disposição 1l de hipoclorito de sódio a 99,8% (considera-se 100%) em estoque e desejando 500 mL de solução a 0,5%, utilize a fórmula da seguinte maneira:

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 \times 100 = 500 \times 0,5$$

$$V1 = 2,5 \text{ mL}$$

Serão necessários 2,5 mL de hipoclorito a 99,8% para produzir 500 mL de hipoclorito a 0,5%.

Utilizando uma pipeta, separe 2,5 mL do hipoclorito a 99,8% e o deposite em uma proveta, completando o volume com água destilada até a marca de 500 mL. Deposite a solução produzida em um recipiente devidamente identificado.

1.4 DESCARTE DE MATERIAIS

O manuseio e o descarte de resíduos devem ser feitos de maneira a não colocar em risco a integridade dos trabalhos. Isso inclui coleta, armazenamento, locais de descarte e procedimentos de descontaminação e transporte.

1.4.1 PROCEDIMENTOS GERAIS DE DESCARTE

Cada uma das categorias de resíduos orgânicos e inorgânicos relacionados deve ser separada e acondicionada de acordo com os procedimentos e as formas específicas e adequadas a cada uma. Na embalagem contendo esses resíduos deve ser afixada uma etiqueta autoadesiva preenchida a lápis e contendo as seguintes informações: laboratório de origem, conteúdo qualitativo, classificação quanto à natureza e advertências. Os resíduos armazenados para posterior recolhimento e descarte/incineração devem ser recolhidos separadamente em recipientes coletores impermeáveis, resistentes, com tampas rosqueadas para evitar derramamentos e evaporação de gases.

1.4.1.1 Resíduos químicos

São compostos por resíduos orgânicos ou inorgânicos tóxicos, corrosivos, inflamáveis, explosivos, teratogênicos etc. Para a realização dos procedimentos adequados de descarte, é importante a observância do grau de toxicidade e do procedimento de não mistura de resíduos de diferentes naturezas e

composições. Os que não puderem ser recuperados devem ser armazenados em recipientes próprios para posterior descarte.

No armazenamento de resíduos químicos devem ser considerados a compatibilidade dos produtos envolvidos, a natureza deles e o volume máximo a ser armazenado. Todas as embalagens devem ser rotuladas e indicar seu conteúdo qualitativo, a classificação quanto à sua natureza e advertências.

1.4.1.2 Resíduos perfurocortantes

São compostos por: agulhas, ampolas, pipetas, lâminas de bisturi, lâminas de barbear e qualquer vidraria quebrada ou que se quebre facilmente. Esses resíduos devem ser descartados em recipientes descartáveis de paredes rígidas, com tampa e resistentes à autoclavagem. Esses recipientes devem estar localizados tão próximo quanto possível da área de uso dos materiais. É importante salientar que não se deve quebrar, entortar ou tentar recapear agulhas.

1.4.1.3 Material biológico

As disposições inadequadas dos resíduos gerados em laboratório poderão constituir focos de doenças infectocontagiosas se não forem observados os procedimentos para seu tratamento. O material biológico deve ser descartado em lixeiras próprias, com sacos plásticos do tipo 1, de capacidade máxima de 100 L, como indica a NBR 9190 da ABNT. Após o descarte, os sacos devem ser totalmente fechados de forma a não permitir o derramamento de seu conteúdo, mesmo se virados para baixo. Uma vez fechados, precisam ser mantidos íntegros até o processamento de resíduo ou a chegada ao seu destino final. Os sacos plásticos deverão ser identificados com nome do laboratório de origem, sala, técnico responsável e data do descarte.

Havendo derramamento do conteúdo, cubra o material derramado com uma solução desinfetante (hipoclorito de sódio a 10.000 ppm), recolhendo-o em seguida e procedendo à lavagem do local.

1. Sempre use os equipamentos de proteção necessários. Todos os utensílios que entrarem em contato direto com o material deverão passar por uma desinfecção posterior.
2. O material biológico deve ser descontaminado em autoclave (121 °C/125 F) e pressão de 1 atmosfera (101 kPa, 151 lb/in acima da pressão atmosférica) durante pelo menos 20 min, ou encaminhado para incineração. Lembre-se de que sempre que a autoclave for utilizada na descontaminação de resíduos você deverá limpá-la por dentro e trocar a água de seu interior.

REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 9004:2000**: Sistema de gestão da qualidade: diretrizes para melhoria de desempenho. Rio de Janeiro, 2000.
- ALVES, J. C.; BARATELLA, A. P. **Recomendações de segurança para trabalhos em capelas químicas**. Campinas: Designs Laboratório, [20--]. Disponível em: <http://designslaboratorio.com.br/imagens/capelas/Palestra_Capela.PDF>. Acesso em: 10 maio 2017.
- BARBOSA FILHO, A. N. **Segurança do trabalho e gestão ambiental**. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2010.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Assessoria de Comunicação. **Cadernos de biossegurança**: legislação. Brasília, DF, 2002. Disponível em: <http://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/caderno_de_legislacao_biosseguranca.pdf>. Acesso em: 10 maio 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Acreditação para laboratórios de microbiologia**. Brasília, DF, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. **Requisitos gerais de biossegurança para laboratórios de saúde pública**. Brasília, DF, 2006.
- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. São Paulo: LTC, 2005.
- INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Programa de monitoramento de BPL**: Inmetro e seus respectivos documentos orientativos, documentos normativos, formulários e modelos. Brasília, DF: [20--]. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/>. Acesso em: 1 maio 2014.
- SOUSA JUNIOR, M. A. et al. Gerenciamento de resíduos de saúde: uma questão da biossegurança no meio ambiente. **Diálogos & Ciência**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 91-97, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2004000300011&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 28 ago. 2017.
- NEVES, W. B. et al. Mapa de risco em laboratório clínico: avaliação de riscos ambientais em laboratório de biologia molecular. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 36, p. 1045-1053, 2006.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual de segurança biológica em laboratório**. 3. ed. Genebra, 2004.
- PORTO ALEGRE. Secretaria Municipal de Saúde. Comissão Municipal de Controle de Infecção. **Controle e monitoramento de microrganismos multirresistentes**. Porto Alegre, maio, 2014. Disponível em: <http://proweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/controle_e_monitoramento_de_microrganismos_multirresistentes.pdf>. Acesso em: 10 maio 2017.
- SANTOS, M. S. T. et al. **Segurança e saúde no trabalho em perguntas e respostas**. São Paulo: IOB, 2013.



FERNANDA MATIAS
(organizadora)

**PRÁTICAS E PROTOCOLOS BÁSICOS
DE
BIOLOGIA MOLECULAR**

Blucher

Fernanda Matias

(organizadora)

PRÁTICAS E PROTOCOLOS BÁSICOS
DE BIOLOGIA MOLECULAR

Práticas e protocolos básicos de biologia molecular
© 2017 Fernanda Matias (organizadora)
Editora Edgard Blücher Ltda.

Publisher Edgard Blücher
Editor Eduardo Blücher
Coordenação editorial Jonas Eliakim
Produção editorial Carla Almeida
Revisão técnico-científica Clarissa Salton
Figuras Kamilla Carvalho
Diagramação Villa D'Artes
Revisão de texto MPMB
Imagem da capa iStockPhotos

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo Novo Acordo Ortográfico, conforme
5. ed. do *Vocabulário Ortográfico da Língua
Portuguesa*, Academia Brasileira de Letras,
março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por
quaisquer meios, sem autorização escrita da
Editora.

Todos os direitos reservados pela Editora
Edgard Blücher Ltda.

FICHA CATALOGRÁFICA

Práticas e protocolos básicos de biologia
molecular / organização de Fernanda Matias ;
[revisão técnico-científica Clarissa Salton ;
figuras de Kamilla Carvalho]. -- São Paulo :
Blucher, 2021.
276 p.

Diversos autores.
ISBN 978-65-5506-316-5

1. Biologia molecular 2. Laboratórios biológicos
3. Biologia molecular - Manuais de laboratório I.
Matias, Fernanda II. Salton, Clarissa

21-0067

CDD 572.8

Índice para catálogo sistemático:
1. Biologia molecular

CONTEÚDO

Parte I – Organizando o laboratório	19
Capítulo 1 – Boas práticas de laboratório	21
1.1 <i>Princípios gerais</i>	22
1.1.1 <i>Noções básicas de organização do pessoal da unidade de operação</i>	23
1.1.2 <i>Local de trabalho, reagentes, material de uso comum e equipamentos</i>	24
1.1.3 <i>Manutenção das instalações</i>	25
1.2 <i>Cuidados específicos em um laboratório</i>	26
1.2.1 <i>Pipetadores e micropipetadores automáticos</i>	26
1.2.2 <i>Câmara de controle biológico (“fluxo laminar”)</i>	27
1.2.3 <i>Autoclaves</i>	28
1.2.4 <i>Centrífugas</i>	29
1.2.5 <i>Materiais combustíveis e inflamáveis</i>	29
1.2.6 <i>Cabine química (capela)</i>	30
1.2.7 <i>Material criogênico e traps de resfriamento</i>	31
1.2.8 <i>Aparelhos e equipamentos elétricos</i>	31
1.3 <i>Limpeza de bancadas</i>	31
1.3.1 <i>Diluições para soluções básicas de limpeza</i>	32
1.4 <i>Descarte de materiais</i>	33
1.4.1 <i>Procedimentos gerais de descarte</i>	33
1.4.1.1 <i>Resíduos químicos</i>	33
1.4.1.2 <i>Resíduos perfurocortantes</i>	34
1.4.1.3 <i>Material biológico</i>	34
<i>Referências</i>	35
Capítulo 2 – Biossegurança	37
2.1 <i>Riscos de acidentes</i>	37
2.2 <i>Riscos ergonômicos</i>	38
2.3 <i>Riscos físicos</i>	38
2.4 <i>Riscos químicos</i>	38
2.5 <i>Riscos biológicos</i>	38
2.5.1 <i>Níveis de contenção física para riscos biológicos</i>	39
2.6 <i>Montando o manual de biossegurança do laboratório</i>	40
2.6.1 <i>Noções básicas de segurança do pessoal da unidade de operação</i>	40

2.6.2 Saúde e higiene	41
2.6.3 Cuidados gerais	41
2.6.4 Higienização das mãos	42
2.6.5 Equipamentos e procedimentos de emergência.....	43
2.6.6 Acidente com produtos químicos.....	43
2.6.7 Acidente com material biológico.....	43
2.6.8 Acidente com incêndio	44
2.7 Mapa de risco.....	45
2.8 Métodos de controle de agentes de riscos	46
Referências	47

Capítulo 3 – Procedimento Operacional Padrão (POP) 49

3.1 Como fazer um POP.....	49
3.2 Principais passos para se elaborar um POP.....	50
3.3 Exemplo de POP.....	51
3.3.1 Considerações gerais.....	51
3.3.1.1 Desinfecção	51
3.3.1.2 Esterilização	52
3.3.1.3 Limpeza	52
3.3.1.4 Saneante	52
3.3.2 Equipamentos e produtos.....	52
3.3.2.1 Equipamentos	52
3.3.2.2 Produtos.....	53
3.3.3 Procedimento	53
3.3.3.1 Como usar a autoclave vitale	53
3.3.3.2 Como usar a estufa de leo	59
Referências	60

Parte II – DNA..... 61

Capítulo 4 – Extração de DNA 63

4.1 Tampões e reagentes - DNA	63
4.1.1 Solução fenol-sevag.....	63
4.1.1.1 Atenção	64
4.1.2 Solução sevag.....	64
4.1.3 Tampão TE.....	64
4.2 Protocolos de extração de DNA genômico	64
4.2.1 Equipamentos necessários	64
4.2.2 Extração de DNA genômico de fungos	64
4.2.2.1 Reagentes.....	64
4.2.2.2 Procedimento	65
4.2.3 Extração de DNA genômico de bactérias gram-negativas	65

4.2.3.1	Reagentes.....	65
4.2.3.2	Procedimento.....	66
4.2.4	Extração de DNA genômico de bactérias gram-positivas.....	67
4.2.4.1	Reagentes.....	67
4.2.4.2	Procedimento.....	68
4.2.5	Protocolo rápido para extração de DNA genômico de bactérias gram-positivas ou gram-negativas.....	69
4.2.5.1	Reagentes.....	69
4.2.5.2	Procedimento.....	70
4.2.6	Protocolo para extração de DNA genômico de leveduras.....	70
4.2.6.1	Reagentes.....	70
4.2.6.2	Procedimento.....	71
4.2.7	Extração de DNA genômico foliar.....	72
4.2.7.1	Reagentes.....	72
4.2.7.2	Procedimento.....	73
4.2.8	Extração de DNA genômico de linhagens celulares humanas.....	74
4.2.8.1	Reagentes.....	74
4.2.8.2	Procedimento.....	75
4.2.9	Extração de DNA genômico de células animais.....	76
4.2.9.1	Reagentes.....	76
4.2.9.2	Procedimento.....	77
4.2.10	Extração pelo método de Salting Out – sangue.....	78
4.2.10.1	Reagentes.....	78
4.2.10.2	Procedimento.....	78
4.2.11	Extração de DNA animal pelo método orgânico em membrana concentradora.....	79
4.2.11.1	Reagentes.....	79
4.2.11.2	Procedimento.....	79
4.3	Extração de DNA para PCR.....	80
4.3.1	Fungos.....	80
4.3.1.1	Reagentes.....	80
4.3.1.2	Procedimento.....	80
4.3.2	Bactérias.....	80
4.3.2.1	Procedimento.....	80
	Referências.....	81
Capítulo 5	– Limpeza, análise e manipulação de DNA.....	83
5.1	Limpeza de DNA – Desproteíntização.....	83
5.2	Precipitação de DNA.....	83
5.2.1	Precipitação com cloreto de sódio e etanol.....	84
5.2.1.1	Reagentes.....	84
5.2.1.2	Procedimento.....	84
5.2.2	Precipitação com acetato de amônia e isopropanol.....	84
5.2.2.1	Reagentes.....	84
5.2.2.2	Procedimento.....	84
5.2.3	Precipitação com acetato de sódio e etanol.....	85

5.2.3.1 Reagentes.....	85
5.2.3.2 Procedimento	85
5.3 Limpeza de DNA com RNase.....	86
5.3.1 Solução de RNase	86
5.3.2 Procedimento	86
5.4 Gel de agarose para análise de DNA	86
5.4.1 Corante de corrida de gel de agarose.....	86
5.4.2 Tampão TAE (50x) pH 8,0.....	86
5.4.3 Tampão TBE (10x).....	86
5.4.4 Procedimento	87
Referências	87
Capítulo 6 – Restrição do DNA	89
6.1 Restrição simples	89
6.1.1 Protocolo padrão.....	89
6.1.2 Protocolo utilizado para restrição simples de produto de PCR.....	89
6.1.3 Protocolo utilizado para restrição simples de plasmídeo	90
6.2 Restrição dupla	90
6.2.1 Protocolo padrão.....	90
6.2.2 Protocolo utilizado para restrição dupla de produto de PCR.....	90
6.2.3 Protocolo utilizado para restrição dupla de plasmídeo	90
6.3 Procedimento.....	91
6.4 Ligação de DNA	91
6.4.1 Protocolo padrão.....	91
6.4.2 Protocolo alternativo.....	92
6.4.3 Procedimento	92
6.5 Restrição com enzima coesiva ou de pontas cegas	92
6.5.1 Limpeza	92
6.5.1.1 Procedimento	93
6.5.2 Embotamento com DNA Klenow	93
6.5.2.1 Procedimento	93
6.5.3 Embotamento com T4 DNA polimerase	93
6.5.3.1 Procedimento	93
6.5.4 Desfosforilação do plasmídeo	94
6.5.4.1 Procedimento	94
Referências	94
Parte III – RNA	95
Capítulo 7 – Manipulação do RNA	97
7.1 Manipulação geral	98
7.2 Plásticos descartáveis e não descartáveis	98

7.3 Vidraria	98
7.4 Soluções.....	99
7.4.1 Reagentes.....	99
7.4.2 Procedimento	99
7.5 Tratamento de soluções com DEPC	99
7.5.1 Procedimento	99
7.6 Eletroforese de RNA em gel de agarose	100
7.6.1 Cubas de eletroforese.....	100
7.6.2 Tampões	100
7.6.2.1 Tampão de aplicação formaldeído 10x	100
7.6.2.2 Tampão MOPS 10x (1 L)	100
7.6.2.3 Tampão de reação 1x (por amostra).....	101
7.7 Aplicação de amostra.....	101
7.7.1 Reagentes	101
7.7.2 Procedimento	101
7.8 Extração de RNA.....	102
7.8.1 Extração de RNA utilizando o TRIZOL	102
7.8.1.1 Reagentes.....	102
7.8.1.2 Procedimento	102
7.9 Armazenamento do RNA	103
7.10 Quantificação do RNA	103
7.10.1 Lavagem das cubetas de quartzo	104
7.10.1.1 Reagentes.....	104
7.10.1.2 Procedimento	104
7.11 Pureza do RNA	104
7.12 Contaminação por DNA.....	105
7.13 Integridade do RNA	105
7.14 Precipitação do RNA.....	105
7.14.1 Materiais	106
7.14.2 Procedimento	106
Referências	106

Parte IV – Amplificação gênica..... 107

Capítulo 8 – Desenho de iniciadores..... 111

8.1 Regras básicas para desenhar os primers	111
8.1.1 Tamanho dos iniciadores.....	111
8.1.2 Temperatura de desnaturação do primer	112
8.1.2.1 Cálculo básico.....	112
8.1.2.2 Cálculo dependente de sal.....	113
8.1.2.3 Cálculo baseado em termodinâmica	113
8.1.3 Temperatura de anelamento do iniciador (T_a).....	114

8.1.4 Conteúdo de G-C.....	114
8.1.4.1 Repetições e runs	115
8.1.5 Grampo de GC (clamp de GC).....	115
8.1.6 Estruturas secundárias dos primers	115
8.1.6.1 Grampos (hairpins)	115
8.1.6.2 Dímero de primers senso (self dimer)	116
8.1.6.3 Dímero de primers antissenso (cross dimer).....	116
8.1.6.4 Evite estruturas secundárias no molde (template do DNA)	116
8.1.6.5 Evite homologia cruzada	117
8.2 Iniciadores degenerados	117
8.2.1 Exemplo de primer degenerado e uso de inosina.....	118
8.3 Desenhando os iniciadores	118
8.3.1 Desenho de primers degenerados.....	119
8.3.1.1 Usando os programas	119
8.4 Testando os iniciadores.....	122
Referências	124
Capítulo 9 – Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	125
9.1 Material necessário	125
9.2 Diluição dos iniciadores (primers)	127
9.3 Escolha da polimerase.....	127
9.4 Metodologia da PCR.....	129
9.4.1 Protocolo básico para o preparo da “mistura de PCR”.....	130
9.4.1.1 Reagentes.....	130
9.4.1.2 Procedimento	131
9.5 Contaminação	133
9.6 Aperfeiçoamento	134
9.6.1 Hot Start	134
9.6.2 PCR Booster	134
9.6.3 PCR Touchdown	134
9.7 Inibidores.....	134
9.8 Aditivos.....	135
9.9 PCR de colônia	136
9.9.1 Protocolo básico de PCR de colônia.....	137
9.9.1.1 Reagentes.....	137
9.9.1.2 Procedimento	137
Referências	138
Capítulo 10 – PCR em tempo real.....	139
10.1 Síntese de cDNA.....	141
10.1.1 Eliminação de DNA (protocolo promega)	141
10.1.2 Síntese de cDNA (protocolo promega)	142

10.1.2.1 Desnaturação do RNA	142
10.1.2.2 Mix para transcrição reversa	142
10.1.2.3 Programa de síntese de cDNA (um ciclo de cada passo).....	142
10.2 PCR em tempo real: procedimento	143
10.3 Detecção não específica de corantes de ligação ao DNA	143
10.4 Preparação da amostra de cDNA	146
10.5 Sondas de detecção específicas e alvo-específicas.....	147
10.5.1 Sondas TaqMan (TaqMan® Probes).....	148
10.5.1.1 Funcionamento da sonda TaqMan®	148
10.5.1.2 Parâmetros utilizados para desenhar um ensaio TaqMan®	148
10.6 PCR Multiplex	150
Referências	150

Capítulo 11 – Sequenciamento de DNA..... 151

11.1 Purificação do DNA para sequenciamento	153
11.2 Produto de PCR	153
11.3 Protocolo SAP-EXO	153
11.3.1 Material necessário	153
11.3.2 Procedimento:	154
11.4 Recuperando o DNA a partir dos kits de purificação de PCR	155
11.5 Vetores	155
11.6 Quantificação do DNA	156
11.6.1 Gel de eletroforese de agarose.....	156
11.6.2 Espectrofotometria.....	156
11.7 Sequenciamento pelo método do BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit.....	158
11.7.1 Reagentes para volume final de 15 µL	158
11.7.2 Reagentes para volume final de 20 µL	159
11.7.3 Precipitação do produto amplificado a ser sequenciado.....	159
11.7.4 Injetando as amostras.....	160
Referências	161

Capítulo 12 – Mineração em bancos de dados biológicos..... 163

12.1 O receptor de quimiocina do tipo 5 (CCR5) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV)	163
12.2 Entrez e PubMed.....	164
12.3 Explorando outros bancos	169
12.3.1 Protein: base de dados das sequências	169
12.3.2 Structure: estruturas tridimensionais macromoleculares	172
12.3.3 Nucleotide: subconjunto central de registros de sequência de nucleotídeos	174
12.3.4 GSS (genome survey sequence): sequência de análise do genoma	175
12.3.5 Gene: informação centrada em genes	175
12.3.6 BioSystems: rotas e sistemas de moléculas de interação	176

12.3.7 GEO Profiles: perfis de expressão e de abundância molecular	178
12.3.8 PubChem BioAssay: quadro de bioatividade de substâncias químicas.....	179
Referências	181
Parte V – Proteínas	183
Capítulo 13 – Análise e quantificação de proteínas	185
13.1 <i>Quantificação de proteínas por espectrofotômetro</i>	185
13.1.1 <i>Método de Bradford</i>	185
13.1.1.1 <i>Reagentes.....</i>	185
13.1.1.2 <i>Preparo da curva padrão</i>	186
13.1.1.3 <i>Preparo da solução B</i>	186
13.1.1.4 <i>Procedimento:</i>	186
13.1.2 <i>Método de Lowry</i>	188
13.1.2.1 <i>Reagentes.....</i>	188
13.1.2.2 <i>Solução A.....</i>	188
13.1.2.3 <i>Solução B.....</i>	188
13.1.2.4 <i>Solução C.....</i>	188
13.1.2.5 <i>Solução D.....</i>	188
13.1.2.6 <i>Solução E.....</i>	188
13.1.2.7 <i>Procedimento</i>	189
13.1.3 <i>Método de Lowry modificado.....</i>	190
13.1.3.1 <i>Reagentes.....</i>	190
13.1.3.2 <i>Procedimentos da solução CTC.....</i>	190
13.1.3.3 <i>Reagente de Lowry.....</i>	190
13.1.3.4 <i>Reagente de Folin 0,4N</i>	191
13.1.3.5 <i>Solução padrão de Albumina 1 mg/mL</i>	191
13.1.3.6 <i>Procedimento</i>	191
13.2 <i>Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE); gel desnaturante</i>	192
13.2.1 <i>Gel de concentração</i>	194
13.2.1.1 <i>Protocolo de gel a 4%.....</i>	194
13.2.1.2 <i>Protocolo de gel a 5%</i>	194
13.2.2 <i>Tampões de amostra</i>	195
13.2.2.1 <i>Reagentes.....</i>	195
13.2.2.2 <i>Procedimento</i>	196
13.2.3 <i>Eletroforese</i>	196
13.2.3.1 <i>Reagentes.....</i>	196
13.2.3.2 <i>Procedimento</i>	196
13.3 <i>Coloração de proteínas com Azul de Coomassie</i>	197
13.3.1 <i>Reagentes.....</i>	197
13.3.1.1 <i>Solução corante.....</i>	197

13.3.1.2 Solução descolorante	197
13.3.2 Procedimento	197
13.4 Coloração de proteínas com prata I	198
13.4.1 Reagentes	198
13.4.1.1 Solução A	198
13.4.1.2 Solução B	198
13.4.1.3 Solução C	198
13.4.1.4 Solução reveladora	198
13.4.2 Procedimento	198
13.5 Coloração de proteínas com prata II	199
13.5.1 Reagentes	199
13.5.1.1 Solução de DTT	199
13.5.1.2 Solução de nitrato de prata	199
13.5.1.3 Solução reveladora	199
13.5.2 Procedimento	199
13.6 Coloração de proteínas com prata III	200
13.6.1 Reagentes	200
13.6.1.1 Solução fixadora	200
13.6.1.2 Solução de lavagem	200
13.6.1.3 Solução preparadora	200
13.6.1.4 Solução de coloração	200
13.6.1.5 Solução reveladora	200
13.6.1.6 Solução de parada	200
13.6.1.7 Solução de armazenamento	200
13.6.2 Procedimento	200
13.7 Descoloração de géis	201
13.7.1 Descoloração de géis corados com prata I	201
13.7.1.1 Reagentes	201
13.7.1.2 Solução descolorante	201
13.7.1.3 Procedimento	202
13.7.2 Descoloração de géis corados com prata II	202
13.7.2.1 Reagentes	202
13.7.2.2 Procedimento	202
Referências	203
Capítulo 14 – Expressão de genes e proteínas	205
14.1 Regiões controladoras	205
14.2 Marcadores, caudas e sítios de clivagem	205
14.3 Subclonagem	206
14.4 Seleção de um hospedeiro adequado	206
14.5 Células de mamíferos	207
14.5.1 Células de camundongos	207
14.5.2 Células de hamsters	207

14.5.3 Células de ratos	207
14.5.4 Células COS.....	207
14.5.5 Células embrionárias de rim humano.....	208
14.5.6 Outras células humanas	208
14.5.7 Células de drosófila	208
14.6 Leveduras	208
14.7 Expressão de proteínas em procaríotos.....	208
14.8 Indução com IPTG.....	211
Referências	211
Capítulo 15 – Vetores.....	213
15.1 Seleção de um vetor de expressão.....	213
15.1.1 Regiões promotoras	214
15.1.2 Região de poliadenilação	214
15.1.3 Marcadores de seleção.....	214
15.1.4 Regulação da expressão.....	214
15.1.5 Sistemas de vetores simples e duplos.....	214
15.2 Vetores para clonagem de plantas	215
15.2.1 Vetores provenientes de Agrobacterium tumefaciens.....	215
15.2.2 Transferência direta de DNA	215
15.3 Vetores de clonagem em insetos	216
15.3.1 Elementos P de Drosophila melanogaster	216
15.3.2 Vetores de clonagem baseados em vírus de insetos.....	217
15.4 Vetores de clonagem em mamíferos	217
15.4.1 Simian virus 40 (SV40).....	217
15.4.2 Adenovírus.....	218
15.4.3 Vírus associados ao adenovírus (AAV).....	218
15.4.4 Papiloma vírus bovino	218
15.5 Vetores de leveduras	219
15.6 Vetores de bactérias	221
15.6.1 Bacteriófagos	221
15.6.2 Plasmídeos	221
15.6.3 Fagemídios	222
15.6.4 Cosmídeos	222
15.6.5 Outros tipos de vetores	222
15.6.5.1 Derivados do bacteriófago P1	222
15.6.5.2 PAC (cromossomo artificial P1)	222
15.6.5.3 BAC (cromossomo artificial bacteriano).....	223
15.7 Lendo o mapa de um vetor	223
15.8 Isolamento e purificação de vetores.....	226
15.9 Isolamento e purificação de DNA plasmidial bacteriano por lise alcalina	227

15.9.1 Reagentes.....	227
15.9.1.1 Solução GETL.....	227
15.9.1.2 Acetato de potássio.....	227
15.9.2 Procedimento	227
15.10 Isolamento e purificação de DNA plasmidial bacteriano por ebulição: miniprep	228
15.10.1 Reagentes.....	228
15.10.2 Solução STET.....	228
15.10.2.1 Para 100 mL	228
15.10.3 Preparo de RNase.....	228
15.10.4 Procedimento	229
15.11 Isolamento e purificação de DNA plasmidial de levedura	230
15.11.1 Reagentes.....	231
15.11.1.1 Tampão de Lise.....	231
15.11.2 Procedimento	231
Referências	231
Capítulo 16 – Transformação	233
16.1 Preparação de bactérias competentes pelo método de cloreto de cálcio	233
16.1.1 Material necessário.....	233
16.1.2 Procedimento	234
16.2 Preparação de bactérias competentes pelo método de magnésio (ou sais).....	234
16.2.1 Material necessário.....	234
16.2.1.1 Preparo do tampão de transformação.....	235
16.2.2 Procedimento	235
16.3 Preparo de células eletrocompetentes	236
16.3.1 Material necessário.....	236
16.3.2 Procedimento	236
16.4 Transformação de bactérias com plasmídeos pelo método de choque térmico.....	237
16.4.1 Material necessário.....	237
16.4.2 Procedimento	237
16.5 Transformação de células E. coli por eletroporação.....	238
16.5.1 Material necessário.....	238
16.5.2 Procedimento	238
16.6 Transformação de leveduras	239
16.6.1 Reagentes.....	239
16.6.2 Material necessário.....	239
16.6.3 Procedimento para obtenção de células competentes.....	239
16.7 Procedimento para transformação	240
16.7.1 Material necessário.....	240
16.7.2 Procedimento:	240
16.8 Transformação rápida e fácil de leveduras (método TRAF0)	241
16.8.1 Material necessário:.....	241

16.8.2 Procedimento:	241
16.9 Transformação de leveduras; método do acetato de lítio	243
16.9.1 Material necessário:	243
16.9.2 Procedimento:	243
Referências	244
Capítulo 17 – Visualização e manipulação <i>in silico</i> de proteínas tridimensionais	245
17.1 Swiss-PDBViewer	245
17.1.1 Obtenção e instalação	245
17.1.2 Utilização	246
17.1.3 Painel de controle (CP)	247
17.1.4 SPDBV-Color	250
17.2 Chimera	252
17.2.1 Abrindo uma molécula no Chimera (File)	253
17.2.2 Seleção & ação (Selection & Action)	253
17.2.3 Opções pré-definidas (Presets)	256
17.2.4 Ferramentas (Tools)	256
17.2.4.1 Controles gerais (General controls)	257
17.2.4.2 Controles de visualização (Viewing controls)	258
17.2.4.3 Análise estrutural (Structural analysis)	259
17.2.4.4 Comparação estrutural (Structure comparison)	259
17.3 Comentários adicionais	260
Referências	261
ANEXO I	263
ANEXO II	269
Sobre os autores	273

PARTE I – ORGANIZANDO O LABORATÓRIO

Antes de iniciarmos qualquer trabalho, devemos avaliar as suas condições. Isso significa conferir se todos os reagentes estão disponíveis, avaliar os protocolos que serão utilizados, a rotina de experimentação e o tempo necessário e verificar se tudo está acertado para a execução do experimento. Ou seja: é necessário organizar o laboratório.

Visando facilitar o uso do laboratório e o treinamento de pessoal, devemos adotar um manual de biossegurança e de procedimentos operacionais padrão. Esses dois itens fazem parte das boas práticas de laboratório que determinam o bom funcionamento e a padronização das regras de uso daquele ambiente e das experimentações que lá serão feitas. Dessa forma, garantimos um melhor desempenho no ambiente de trabalho, com menos perda de tempo a cada experimentação feita pelos diferentes usuários.

CAPÍTULO 1

BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

Sabrina Dick, Karina Teixeira Pinheiro

Laboratórios não são lugares necessariamente perigosos, embora possam apresentar certo risco potencial. Todos os que trabalham direta ou indiretamente nesses ambientes devem ser responsáveis ao desenvolver suas atividades, evitando atitudes que possam acarretar acidentes e possíveis danos a eles mesmos, aos colegas, ao patrimônio e ao meio ambiente. Esteja sempre atento e seja cuidadoso e metódico com relação ao trabalho a ser executado, concentrando-se nas atividades e evitando quaisquer distrações. Da mesma forma, não distraia os demais usuários durante a execução de trabalhos no laboratório.

Os acidentes não acontecem; eles são causados. Resultam, normalmente, de uma atitude indiferente dos utilizadores, da ausência de senso comum, da falha no cumprimento das instruções a serem seguidas ou da pressa excessiva na obtenção de resultados. Vale salientar que os riscos de acidentes são maiores quando nos acostumamos a conviver com o perigo e passamos a ignorá-lo. Sendo assim, acidentes podem ser evitados, ou pelo menos terem suas consequências minimizadas, desde que sejam tomadas as devidas precauções.

Os princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) são o conjunto de regras básicas necessárias para o funcionamento seguro dos laboratórios e das aulas práticas, e dizem respeito à organização e às condições sob as quais estudos em laboratórios e/ou de campo são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados e relatados. As BPL são um sistema de qualidade fundamental para o desenvolvimento de testes de qualidade assegurada e para a confiabilidade de todo o processo técnico-científico.

No Brasil, a partir do Decreto nº 6.275, de 28 de novembro de 2007, a Coordenação Geral de Acreditação (Cgcre), vinculada ao Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade (Inmetro), passou a ser a autoridade brasileira de monitoramento da conformidade aos princípios das BPL, reconhecendo e acreditando instalações de teste que realizam estudos exigidos por órgãos regulamentadores para o registro de produtos agrotóxicos, farmacêuticos, aditivos de alimentos e rações, cosméticos, veterinários, produtos químicos industriais e organismos geneticamente modificados (OGM), entre outros, visando avaliar os riscos ambiental e à saúde humana. Para estabelecer os procedimentos e os documentos normativos utilizados no reconhecimento

da conformidade de instalações/unidades de teste aos princípios das BPL, a Cgcre criou a “Norma Nº NIT-DICLA-035 - Princípios das boas práticas de laboratório (BPL)”¹ a partir de documentos publicados pela Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômica (OCDE). Os documentos que complementam essa norma são: NIT-DICLA-034; NIT-DICLA-036; NIT-DICLA-037; NIT-DICLA-038; NIT-DICLA-039; NIT-DICLA-040; NIT-DICLA-041; NIT-DICLA-043.

A implantação das BPL tem como objetivos a garantia de dados confiáveis, a padronização de procedimentos, a racionalização do trabalho e a eliminação de erros operacionais, além de possibilitar maior rapidez no acesso às informações, melhorias nos resultados, aperfeiçoamento dos procedimentos de trabalho e aceitação ampla dos dados produzidos.

A seguir, são expostas algumas diretrizes básicas das BPL. Para o caso de se pretender a acreditação do Inmetro, sugerimos que sejam seguidas as etapas do Programa de Monitoramento de BPL e instaurado um sistema de gestão de qualidade e biossegurança comprometido com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), ambos disponíveis nos websites das respectivas instituições. Essa certificação, bem como as da Organização Internacional para Padronização (International Organization for Standardization - ISO), confere uma maior confiabilidade de produtos, processos e/ou serviços de uma organização.

1.1 PRINCÍPIOS GERAIS

As regras e os conselhos gerais para desenvolver um trabalho laboratorial com segurança estão principalmente relacionados a organização. Isso significa que o tempo dedicado à organização das atividades contribui para prevenir riscos químicos, biológicos e acidentes inerentes à manipulação de reagentes e equipamentos.

Antes de qualquer trabalho laboratorial, o operador deve estar informado sobre os riscos oferecidos pelos produtos químicos e equipamentos a serem utilizados. Conhecer os procedimentos de segurança e de emergência em casos de acidentes ajuda na proteção contra os possíveis riscos. O operador deve sempre planejar o trabalho que vai realizar, pois só assim poderá executá-lo com segurança.

Dicas

- Nenhum trabalho é tão importante e tão urgente que não possa ser planejado e executado com segurança.
- A segurança é uma responsabilidade coletiva que requer a cooperação de todos os indivíduos do laboratório.

¹ Disponível no site do Inmetro: <http://www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/>. Acesso em: 13 abr. 2017.

CAPÍTULO 2

BIOSSEGURANÇA

Sabrina Dick

Biossegurança é o conjunto de procedimentos, ações, técnicas, metodologias, equipamentos e dispositivos capazes de eliminar ou minimizar riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

Todo laboratório deve desenvolver seu manual de biossegurança de acordo com os riscos potenciais do local de trabalho e seus arredores, como corredores e salas de uso comum.

A seguir, alguns conceitos importantes para entender os riscos a que se pode estar submetido.

- **Risco ocupacional:** riscos para a saúde ou para a vida dos trabalhadores decorrentes de suas atividades laborais.
- **Classe de risco:** grau de risco associado ao material manipulado.
- **Análise de risco:** processo de levantamento, avaliação e comunicação de riscos considerando o ambiente e os processos de trabalho a fim de implementar ações destinadas à prevenção, ao controle, à redução ou à eliminação deles.

2.1 RISCOS DE ACIDENTES

Considera-se risco de acidente qualquer fator que coloque o trabalhador em situação de perigo e possa afetar sua integridade e seu bem-estar físico e moral. Os riscos de acidentes são ainda classificados por tipo, de acordo com a Portaria n. 3.214 (BRASIL, 1978).

Exemplos de riscos de acidente: arranjo físico inadequado, máquinas e equipamentos não compatíveis com a tarefa a ser realizada, iluminação inadequada, descuidos com eletricidade, probabilidade de incêndio ou explosão, armazenamento inapropriado, animais peçonhentos, entre outras situações de risco que poderão contribuir para um acidente.

2.2 RISCOS ERGONÔMICOS

Considera-se risco ergonômico qualquer fator que possa interferir nas características psicofisiológicas do trabalhador causando desconforto ou afetando sua saúde.

Exemplos de riscos ergonômicos: esforço físico intenso, levantamento e transporte manual de peso, controle rígido de produtividade, ritmo excessivo de trabalho, monotonia, repetitividade, responsabilidade excessiva, postura inadequada de trabalho, jornada de trabalho excessiva e prolongada, entre outras situações de estresse físico ou psíquico.

2.3 RISCOS FÍSICOS

Consideram-se agentes de riscos físicos as diversas formas de energia a que possam estar expostos os trabalhadores, tais como ruídos, vibrações, radiações não ionizantes, radiações ionizantes, ultrassom, materiais cortantes e pontiagudos, temperaturas extremas, umidade, pressões anormais.

2.4 RISCOS QUÍMICOS

Consideram-se agentes de riscos químicos as substâncias compostas ou os produtos que possam penetrar no organismo por via respiratória em forma de poeiras, fumos, névoas, neblinas, gases ou vapores, ou que possam ter contato ou ser absorvidos pelo organismo por meio da pele ou por ingestão.

2.5 RISCOS BIOLÓGICOS

Consideram-se agentes de riscos biológicos bactérias, fungos, parasitas, vírus, sangue e outros fluidos corporais.

Os agentes de riscos biológicos podem ser distribuídos em quatro classes, por ordem crescente de risco, de acordo com os seguintes critérios:

1. Patogenicidade para o homem.
2. Virulência.
3. Modos de transmissão.
4. Disponibilidade de medidas profiláticas eficazes.
5. Disponibilidade de tratamentos eficazes.
6. Endemicidade.

- **Classe de risco I:** escasso risco individual e comunitário. O microrganismo tem pouca probabilidade de provocar enfermidades humanas ou enfermidades de importância veterinária. Ex: *Bacillus subtilis*.

PARTE II – DNA

A molécula de DNA, ou ácido desoxirribonucleico, foi isolada pela primeira vez por Friedrich Miescher em 1869, mas caracterizada como uma dupla hélice apenas em 1953 por James D. Watson e Francis Crick. O DNA é uma longa cadeia polimérica formada por nucleotídeos. Cada nucleotídeo tem uma base nitrogenada do tipo adenosina (A), guanina (G), timina (T) ou citosina (C), sendo as duas primeiras purinas e as duas últimas pirimidinas, respectivamente, um grupamento fosfato e um açúcar. A interação entre a dupla fita ocorre por pontes de hidrogênio que dão a forma de hélice à estrutura. Uma base purina sempre estará ligada a uma pirimidina na ordem: A=T e C≡G; por isso, sequências de DNA contendo alto conteúdo de C≡G são mais difíceis de trabalhar, uma vez que essa ligação possui três pontes de hidrogênio. Quando se trabalha com amplificação de genes contendo alto conteúdo de C≡G, deve-se aplicar uma temperatura maior para o desnovelamento do DNA previamente à reação de amplificação ou à de restrição. Em cada fita, os nucleotídeos conectam-se por meio de uma ligação covalente fosfodiéster, a qual será utilizada posteriormente em uma reação de restrição, na quebra de enzimas específicas. A direção de replicação do DNA, a qual será utilizada pela enzima DNA polimerase, é 5'-3'. É importante lembrar disso na hora de fazer uma reação de amplificação ou um desenho de iniciadores. Como as fitas duplas são complementares, deve-se lembrar também que enquanto uma fita terminará em 3' (finalizando em um grupo hidroxil), a fita complementar terminará em 5' (finalizando em um grupo fosfato).

CAPÍTULO 4

EXTRAÇÃO DE DNA

Fernanda Matias

Quando se fala em extração de DNA, deve-se considerar que:

1. Haverá lise celular e, para que isso ocorra, são necessárias enzimas específicas e detergentes de acordo com cada célula. Muitas células, como fungos, bactérias gram-positivas e tecido vegetal, vão precisar de uma ajuda extra na quebra das células, que pode ser o uso de vórtex, de sonicação, de pérolas de vidro ou mesmo de nitrogênio líquido. O uso de detergentes, como o SDS, fará a remoção de lipídios de membrana, enquanto as enzimas, como a lisozima, agirão nos açúcares de membrana.
2. Após a lise, haverá contaminação do material com proteínas celulares, as quais serão degradadas com a ajuda de uma proteinase, sendo a mais comum a proteinase K. A precipitação de proteínas poderá ser feita com a adição de sais tais como amônia ou acetato de sódio. E a limpeza será feita com a adição de solução fenol-sevag.
3. O DNA precipita com a adição de álcool ou isopropanol e sua eficiência será aumentada com a adição de sais e reagentes gelados. Quanto mais branco o DNA, mais sal há em sua solução; então, cuidado com a quantidade de sais.
4. Sempre lave o DNA com álcool 70 para diminuir a quantidade de contaminantes como fenol e sais.
5. Se o DNA for utilizado na reação de amplificação como amplificação em cadeia da polimerase (PCR), trate o seu DNA apenas com Tris-HCl (pH 7,5) ou água ultrapura. O uso da água pode ocasionar quebra do DNA a longo prazo.

4.1 TAMPÕES E REAGENTES - DNA

4.1.1 SOLUÇÃO FENOL-SEVAG

- Fenol: 25 mL
- Clorofórmio: 24 mL
- Álcool isoamílico: 1 mL

4.1.1.1 Atenção

O fenol pode causar queimaduras graves e danificar roupas. A manipulação do fenol deve ser realizada em uma câmara de exaustão química (capela) com a utilização de todo Equipamento de Proteção Individual (EPI) indicado: luvas, óculos e jaleco. Utilize um recipiente de vidro exclusivo para o depósito de resíduos de fenol e clorofórmio. Faça as soluções contendo fenol em frasco que possa ser reutilizado para esse mesmo fim, diminuindo o lixo ambiental. Para as misturas, utilize sempre tubos cônicos de plástico que possam ser descartados.

4.1.2 SOLUÇÃO SEVAG

- Clorofórmio: 24 mL
- Álcool isoamílico: 1 mL

4.1.3 TAMPÃO TE

- EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) pH 8,0 1 mM
- Tris-HCl pH 8,0 10 mM

4.2 PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

4.2.1 EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS

- Pipetas e ponteiros (10, 20, 100, 200 e 1000 mL)
- Tubos de microcentrífuga 1,5 mL ou falcons de 50 mL
- Centrífuga refrigerada
- Vórtex
- Luvas de laboratório

4.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE FUNGOS

4.2.2.1 Reagentes

- *Breaking buffer*
- Solução fenol-sevag
- Etanol 100% gelado
- Etanol 70% gelado
- Água ultrapura ou tampão TE preaquecido a 50 °C
- Solução de RNase

Breaking buffer – *preparação de 50 mL*

- Triton X100 (100%): 1 mL
- SDS (dodecil sulfato de sódio) (10%): 5 mL

CAPÍTULO 5

LIMPEZA, ANÁLISE E MANIPULAÇÃO DE DNA

Fernanda Matias

Qualquer extração de DNA é baseada em três princípios: lise celular, precipitação e limpeza do material genético. Os protocolos apresentados neste livro contemplam as três fases de uma boa extração. No entanto, algumas impurezas podem permanecer no produto final, interferindo no resultado de algumas manipulações. Um bom exemplo disso é a restrição do DNA. Se o produto não estiver bem limpo, a reação de restrição pode ser inibida ou dar resultado aquém do esperado. Sempre verifique a qualidade de seu DNA em gel de agarose. Uma boa extração irá demonstrar uma banda limpa, sem arraste e sem sujeira abaixo dela. Se o DNA tiver arraste na mesma intensidade da banda, é possível que ele esteja degradado ou tenha sofrido quebras durante o processo de extração. Se o arraste for abaixo da banda, mais ou menos no meio do gel, e em intensidade mais fraca, é possível que o seu material esteja contaminado com proteínas. Para resolver isso, prossiga com a desproteínização. Uma banda mais abaixo da de interesse, entre 50-100 pb, indica que o material está contaminado com RNA. Nesse caso, faça a limpeza com RNase. O ideal é que você proceda com toda a limpeza novamente de acordo com os protocolos descritos a seguir.

5.1 LIMPEZA DE DNA – DESPROTEINIZAÇÃO

1. Para eliminar as proteínas contaminantes, adicione o mesmo volume do conteúdo do tubo em solução fenol-sevag (item 4.1.1).
2. Agite o tubo por inversão várias vezes.
3. Centrifugue em velocidade máxima a 20 °C por 10 min.
4. Repita essa etapa quantas vezes for necessário até que não se observe a interface branca.

5.2 PRECIPITAÇÃO DE DNA

A precipitação tem como objetivo eliminar os resíduos de fenol e clorofórmio, assim como concentrar o DNA no volume final.

5.2.1 PRECIPITAÇÃO COM CLORETO DE SÓDIO E ETANOL

5.2.1.1 Reagentes

- - NaCl 5 M
- - Etanol 100% gelado
- - Etanol 70% gelado

5.2.1.2 Procedimento

1. Adicione 2% do volume da solução de DNA de NaCl 5 M (para concentração final de 0,1 M) e 2,5 volumes de etanol 100% gelado.
2. Agite a mistura por inversão.
3. Deixe a solução no freezer por pelo menos 1 h.
4. Centrifugue em velocidade máxima por 10 min a 4 °C.
5. Lave o sedimento com etanol 70%.
6. Centrifugue em velocidade máxima por 10 min a 4 °C.
7. Inverta o tubo em papel absorvente e deixe o sedimento (DNA) secar em temperatura ambiente.
8. Após seco, ressuspenda o DNA em água ultrapura ou TE (item 4.1.3) pré-aquecido a 50 °C.

5.2.2 PRECIPITAÇÃO COM ACETATO DE AMÔNIA E ISOPROPANOL

5.2.2.1 Reagentes

- Acetato de amônia 7,5 M
- Isopropanol gelado
- Etanol 70% gelado

5.2.2.2 Procedimento

1. Adicione 20% do volume da solução de DNA de acetato de amônia 7,5 M e 2,5 volumes de isopropanol gelado.
2. Agite a mistura por inversão.
3. Deixe a solução no freezer por pelo menos 1 h.
4. Centrifugue em velocidade máxima por 10 min a 4 °C.
5. Lave o sedimento com etanol 70%.
6. Centrifugue em velocidade máxima por 10 min a 4 °C.

CAPÍTULO 6

RESTRIÇÃO DO DNA

Fernanda Matias

As enzimas de restrição são proteínas que reconhecem e clivam o DNA em pontos específicos, geralmente em sequências de 4, 6 e 8 bases, formando palíndromos ou pontas cegas. A nomenclatura é baseada na bactéria de origem, na linhagem e na ordem da descoberta. Por exemplo: *EcoRI* – *E* (*Escherichia coli*) R (RY13) I (primeira enzima a ser descoberta nessa bactéria). Essas enzimas são muito úteis em reconhecimentos de mapas gênicos ou de tendências gênicas ou ainda para uso em recombinação gênica com posterior ligação em vetores específicos que poderão ser utilizados como propagadores ou como vetores de expressão gênica.

6.1 RESTRIÇÃO SIMPLES

6.1.1 PROTOCOLO PADRÃO

Material necessário:

- Água ultrapura: 16,3 μL
- Tampão (10x): 2 μL
- BSA acetilada: 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 0,2 μL
- DNA: entre 0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – 1 μL
- Enzima: 10 U/ μL a 0,5 μL
- Volume total: 20 μL

6.1.2 PROTOCOLO UTILIZADO PARA RESTRIÇÃO SIMPLES DE PRODUTO DE PCR

Material necessário:

- Água ultrapura: 2,5 μL
- Tampão (10x com BSA): 1,5 μL
- Produto de PCR: 10 μL
- Enzima de restrição: 1 μL
- Volume total: 15 μL

6.1.3 PROTOCOLO UTILIZADO PARA RESTRIÇÃO SIMPLES DE PLASMÍDEO

Material necessário:

- Água ultrapura: 11,5 μL
- Tampão (10x com BSA): 1,5 μL
- Plasmídeo (4 ng/ μL): 1 μL
- Enzima de restrição: 1 μL
- Volume total: 15 μL

6.2 RESTRIÇÃO DUPLA

6.2.1 PROTOCOLO PADRÃO

Material necessário:

- Água ultrapura: 15,8 μL
- Tampão (10x): 2 μL
- BSA acetilada: 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – 0,2 μL
- DNA: entre 0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 1 μL
- Enzima I: 10 U/ μL a 0,5 μL
- Enzima II: 10 U/ μL a 0,5 μL
- Volume total: 20 μL

6.2.2 PROTOCOLO UTILIZADO PARA RESTRIÇÃO DUPLA DE PRODUTO DE PCR

Material necessário:

- Água ultrapura: 1,5 μL
- Tampão (10x com BSA): 1,5 μL
- Produto de PCR: 10 μL
- Enzima de restrição I: 1 μL
- Enzima de restrição II: 1 μL
- Volume total: 15 μL

6.2.3 PROTOCOLO UTILIZADO PARA RESTRIÇÃO DUPLA DE PLASMÍDEO

Material necessário:

- Água ultrapura: 10,5 μL
- Tampão (10x com BSA): 1,5 μL
- Plasmídeo (4 ng/ μL): 1 μL

PARTE III – RNA

O RNA ou ribonucleotídeo é a molécula que “transforma” a informação contida no DNA em uma resposta. Seus representantes principais são três: o RNA mensageiro, o RNA transportador e o RNA ribossomal. O mais comumente encontrado na célula é o RNA mensageiro, o qual contém a informação necessária para a tradução fornecendo todas as proteínas envolvidas no funcionamento da célula. O RNA é transcrito a partir do DNA, sendo uma fita complementar à leitura deste. Essa característica é importante em anotações gênicas nas quais se observam flechas em vez da sequência. Essas flechas indicam a fase de leitura do RNA no DNA, uma vez que o DNA é uma fita dupla, uma complementar à outra, e o RNA é uma fita simples, complementar a uma das fitas do DNA. O RNA é diferente do DNA em dois aspectos: (1) a base timina do DNA é substituída pela base uracil no RNA; (2) os açúcares na molécula de RNA possuem uma hidroxila no carbono 2 (2'OH), sendo assim considerados riboses. A exposição da 2'OH faz com que o RNA, quando comparado ao DNA, seja mais instável e necessite de mais precauções ao ser manipulado.

CAPÍTULO 7

MANIPULAÇÃO DO RNA

Nélson Kretzmann Filho

Trabalhar com RNA não requer o desenvolvimento de uma área específica para quem trabalha com biologia molecular; porém, requer alguns cuidados. O RNA é quimicamente e estruturalmente diferente do DNA. Algumas rotinas simples devem ser implementadas no trabalho para garantir a qualidade e a integridade do RNA. Meio alcalino, altas temperaturas e íons metálicos devem ser evitados sempre que possível, assim como as ribonucleases. Este capítulo descreverá os passos para se trabalhar com o RNA e também algumas modificações de protocolos convencionais. Esses métodos são aplicáveis ao trabalho com qualquer tipo de RNA.

As ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e ativas que, geralmente, não requerem cofatores para funcionar. As RNases são difíceis de inativar e até mesmo pequenas quantidades são suficientes para destruir o RNA. Portanto, não utilize plásticos ou vidros sem primeiro eliminar uma possível contaminação por RNases. Grande cuidado deve ser tomado para evitar a introdução inadvertida de RNases na amostra de RNA durante ou após o procedimento de isolamento. A fim de criar e manter um ambiente livre de RNases, ao se trabalhar com RNA, certas precauções devem ser tomadas durante o pré-tratamento e a utilização de tubos descartáveis e não descartáveis e de soluções.

Como já mencionamos, existem quatro circunstâncias experimentais que devem ser evitadas ao se trabalhar com RNA: pH alcalino, temperaturas elevadas, íons metálicos e presença de RNases. O pH deve ser mantido neutro ou ligeiramente ácido; isso evita a ativação de riboses 2'OH para o ataque em ligações fosfodiéster, o que resultará em clivagem e degradação do RNA. As temperaturas elevadas, da mesma forma, promovem a degradação do RNA. Assim, o trabalho com o RNA deve ser realizado entre 0 °C e 4 °C sempre que possível. Os deletérios íons metálicos podem, em alguns casos, ser removidos a partir de soluções específicas, por tratamento com uma resina de permuta iônica (por exemplo, Chelex 100, da Sigma).

Em muitos casos, 0,1 mM de EDTA é incluído em soluções de trabalho para quelar determinados íons metálicos. Obviamente, em muitos tipos de experimento, é necessário fazer uma verificação das circunstâncias experimentais para satisfazer exigências, como a presença de proteínas de ligação

ao RNA ou o desenvolvimento de um tratamento enzimático, e dos requisitos para manter o RNA em uma conformação nativa estrutural. Nesses casos, a incubação do RNA em situações não ótimas deve durar o menor período de tempo possível.

7.1 MANIPULAÇÃO GERAL

Os procedimentos técnicos de manipulação asséptica devem ser sempre utilizados quando se trabalha com RNA. Mãos e partículas de poeira podem transportar bactérias e fungos e são as fontes mais comuns de contaminação por RNases. Use sempre luvas de látex ou vinil ao manusear os reagentes e as amostras de RNA para evitar a contaminação por RNases a partir da superfície da pele ou dos equipamentos do laboratório com poeira. Mude de luvas com frequência e mantenha os tubos fechados sempre que possível. Mantenha o RNA isolado em gelo enquanto as alíquotas são pipetadas para suas aplicações.

Dica

- As luvas que tocam geladeira, maçanetas de porta, ou pipetadores não estão mais livres de RNases.

7.2 PLÁSTICOS DESCARTÁVEIS E NÃO DESCARTÁVEIS

O uso de tubos de polipropileno estéreis descartáveis é recomendado durante todo o procedimento. Esses tubos estão geralmente livres de RNases e não requerem um pré-tratamento para inativá-las. Plásticos não descartáveis devem ser tratados antes de serem usados para garantir que fiquem livres de RNases. Os plásticos devem ser cuidadosamente lavados com NaOH 0,1 M e EDTA 1 mM, seguido de água livre de RNases. Alternativamente, plásticos resistentes a clorofórmio podem ser lavados com essa substância para inativar as RNases.

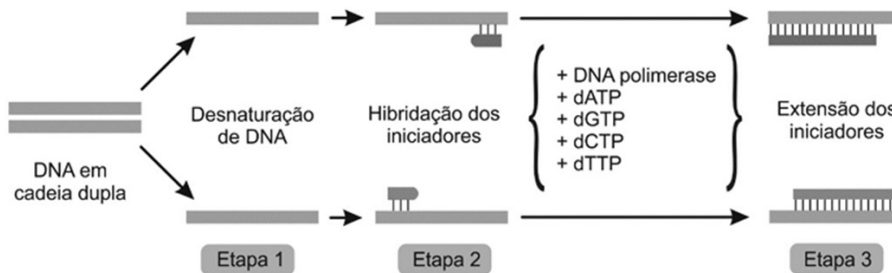
7.3 VIDRARIA

A vidraria deve ser tratada antes de ser usada para garantir que fique livre de RNases. Antes do trabalho com RNA, ela deve ser limpa com detergente neutro; depois, deve ser bem enxaguada e fornada a 240 °C por 4 h ou mais (*overnight*, se for mais conveniente) antes de ser utilizada. A autoclave por si só não será totalmente capaz de inativar muitas das RNases. Alternativamente, o vidro pode ser tratado com água DEPC (pirocarbonato etílico ou dietilpirocarbonato). Preencha o vidro com DEPC 0,1% (0,1% em água), deixe-o repousar durante a noite (*overnight*, 12 h) a 37 °C. Depois, autoclave ou submeta ao calor de 100 °C por 15 min para eliminar DEPC residual.

PARTE IV – AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

Em 1985, o pesquisador Kary Banks Mullis, juntamente com um grupo de cientistas da Cetus Corporation, desenvolveu um método revolucionário na Biologia Molecular, que resultou no prêmio Nobel de 1993: a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), técnica *in vitro* que permite a amplificação de uma região de interesse, “purificando” o DNA em relação ao restante do genoma. Os elementos envolvidos nessa reação são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre nas células vivas.

A técnica de PCR impõe a necessidade de se conhecer a sequência das regiões que delimitam o segmento de DNA a ser amplificado (figura a seguir). A extensão ocorre a partir de dois oligonucleotídeos (*primers* ou iniciadores) que hibridação com as fitas complementares de uma sequência-molde (*template* ou alvo), em ambas as extremidades (5' e 3'), de modo a permitir a atuação da DNA polimerase durante a síntese da fita complementar sem a necessidade de uma purificação prévia da amostra íntegra original. A alta sensibilidade, a especificidade, a facilidade de execução e a análise de um grande número de amostras simultaneamente fazem dessa técnica uma opção bastante atrativa para estudos genético-moleculares.



Reação em cadeia da polimerase.

Atualmente, há uma variedade de procedimentos (Quadro 8.1) que exploram o princípio da PCR, sendo esta imprescindível para a Biologia Molecular. O método é utilizado para decodificação e comparação de sequências, mapeamento genético, síntese de RNA *in vitro*, clonagem, genética forense, diagnóstico pré-natal (particularmente nas doenças herdadas), diagnóstico de doenças infecciosas (causadas por bactérias, fungos, protozoários e vírus), tipagem para transplante de órgãos e suscetibilidade para doenças autoimunes específicas.

CAPÍTULO 8

DESENHO DE INICIADORES

Fernanda Matias, Mateus Schreiner Garcez Lopes, Lizandra de Souza Cordeiro

Os iniciadores ou *primers* são pequenas sequências de DNA-molde utilizados para iniciar a amplificação do DNA. Esses iniciadores são complementares à fita de DNA-alvo. Nos dias de hoje, diversos programas são utilizados para o desenho dos iniciadores, os quais serão indicados a seguir.

Quando se faz o desenho dos iniciadores, é importante levar em consideração a temperatura de desnaturação do iniciador ou de *melting* (T_m) e a capacidade do iniciador de formar dímeros ou grampos entre si. No caso de grampos, em que um iniciador se dobra, há inibição da reação de anelamento ao DNA-molde. E quando eles formam dímeros, os iniciadores do par ligam-se um com o outro, impedindo que o anelamento ocorra nas duas vias de amplificação.

8.1 REGRAS BÁSICAS PARA DESENHAR OS *PRIMERS*

Para desenhar os iniciadores, é necessário:

1. Ter um pouco de conhecimento da sequência a ser trabalhada.
2. Gerar grande especificidade e sensibilidade.
3. Permitir amplificação de quantidade limitada de material.

Além disso, existe uma série de regras às quais você precisa ficar atento para desenhar o iniciador, como: composição de G-C, tamanho do iniciador, tamanho do fragmento a ser amplificado, temperatura de anelamento, formação de dímeros, estruturas secundárias e outras, que serão exploradas a seguir.

8.1.1 TAMANHO DOS INICIADORES

Os iniciadores devem ter de 10 a 30 pares de base (pb), sendo que o ideal é que tenham de 18 a 22 pb. Esse comprimento é grande o bastante para se adequar à especificidade da ligação iniciador-DNA e pequeno o suficiente para que os iniciadores se liguem facilmente ao DNA-molde durante a temperatura de anelamento.

8.1.2 TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO DO *PRIMER*

É a temperatura na qual ao menos metade do DNA dupla fita estará dissociada, formando uma fita simples e deixando as regiões de ligação dos iniciadores expostos. Essa temperatura indica a estabilidade da fita dupla. Os iniciadores devem ter uma temperatura de fusão entre 55 °C e 80 °C, sendo que o ideal é que tenham entre 52 °C e 60 °C. Iniciadores com T_m acima de 65 °C tendem à formação de anelamentos secundários. A quantidade de CG do DNA-molde poderá indicar a melhor T_m .

Dica

- A T_m entre os pares não pode ser muito diferente, pois isso pode acarretar a diminuição de produto amplificado ou a não amplificação do produto. O ideal é uma diferença de T_m abaixo de 5 °C para a máxima amplificação.

8.1.2.1 Cálculo básico

Os cálculos básicos consideram apenas a composição do iniciador, ou seja, apenas a quantidade de cada base que compõe o iniciador. A seguir são apresentadas duas fórmulas básicas para cálculo da T_m .

De acordo com Marmur e Doty (1962),

$$T_m = 64.9 + 41.0 \times (|G| + |C| - 16.4) / (|A| + |T| + |G| + |C|).$$

De acordo com Wallace e colaboradores (1979),

$$T_m = 2 \times (|A| + |T|) + 4 \times (|C| + |G|).$$

Sendo:

A = Adenina

C = Citosina

T = Timina

G = Guanina

As duas equações consideram que o pareamento ocorre em condições padrão de 50 nM de concentração de iniciadores, 50 mM de concentração de sal (Na^+) e pH próximo de 7,0.

CAPÍTULO 9

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

Laura Trevizan Corrêa, Camila Míryan de Oliveira Ferreira, Fernanda Matias

9.1 MATERIAL NECESSÁRIO

- Água esterilizada para os reagentes
- DNA-molde previamente extraído
- Cloreto de magnésio – $MgCl_2$ (0,5 mM a 3 mM)
- Tampão da reação (observar se o mesmo já contém $MgCl_2$)

OBSERVAÇÕES

- Se o tampão possuir $MgCl_2$, acrescente somente o volume necessário para obter a concentração final desejada.
- A grande maioria dos protocolos de PCR sugere que a concentração ideal de $MgCl_2$ é de 1,5 mM para um volume final de 100 μL . Por isso, tampões de reação que contêm $MgCl_2$ devem ser preparados de forma que a concentração final seja de 1,5 mM na proporção 1:10 de diluição. Porém, no caso de protocolos em que a concentração ótima seja diferente de 1,5 mM, é recomendável utilizar um tampão que não contenha cloreto de magnésio e adicioná-lo separadamente na concentração desejada.
- Iniciadores ou *primers* (observar a T_m)

OBSERVAÇÃO

- A T_m – do inglês *melting temperature* – do iniciador, é definida como a temperatura na qual se obtém o equilíbrio entre a formação e dissociação dos híbridos gerados pelo estabelecimento de pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos complementares. As fórmulas específicas para o cálculo da T_m variam com o tamanho e a composição de bases do iniciador:

1. Para iniciadores de até 18 bases de tamanho:

$$Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$$

2. Para iniciadores maiores que 18 bases:

$$Tm = 81,5 + 16,6 \log[\text{Na}] + 0,41\%(\text{GC}) - \left(\frac{675}{\text{n}^\circ \text{ de bases}} \right) - 0,65\%[\text{formamida}] - (\% \text{ não pareado})$$

- A formamida é um agente desnaturante que é empregado para maximizar a especificidade da reação.
- dNTPs livres em mistura na concentração de 10 mM

OBSERVAÇÃO

- Os deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) podem vir na forma de um mix, em uma concentração de 10 mM cada. Este estoque deve ser mantido no freezer. Os estoques para uso diário podem ser preparados em volumes de 800 μL . Para preparar este estoque de uso, pipeta-se 100 μL de dNTP 10 mM e adiciona-se 700 μL de água. Manter as alíquotas no freezer, usar conforme necessidade e, remover sempre estes estoques. Os dNTPs podem ainda, vir separadamente, em concentrações por exemplo, de 100 mM. Para preparar o mix, misturar partes iguais de tal forma a reduzir a concentração de cada nucleotídeo para 10 mM.
- Enzima Taq polimerase
- Master mix comercial

OBSERVAÇÃO

- O Master Mix é uma pré-mistura, pronta para o uso, contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl_2 e tampões de reação em concentrações ótimas para amplificação eficiente de moldes de DNA por PCR.
- Óleo mineral (para evitar evaporação durante a reação)
- Isopor com gelo ou *cooler*
- Ponteiros diversas (10, 100 e 1000 μL)
- Microtubos (0,2 e 1,5 mL)
- Caneta para identificação dos microtubos
- Microcentrífuga (*spin*)
- Termociclador

CAPÍTULO 10

PCR EM TEMPO REAL

Nélson Kretzmann Filho, Fernanda Matias

O PCR é nos dias atuais uma ferramenta muito utilizada e de grande importância para as atividades de pesquisa e diagnóstico clínico. O monitoramento da expressão de mRNAs fornece dados relevantes para os estudos de mecanismos celulares. Além dessa utilização, podemos salientar as monitorizações de microrganismos (vírus e bactérias). O PCR em tempo real, também chamado de PCR quantitativo ou qPCR, pode proporcionar um método simples e elegante para a determinação da quantidade de um gene ou sequência alvo, que esteja presente em uma amostra. Sua simplicidade, às vezes, pode levar a problemas envolvendo alguns dos fatores críticos de seu funcionamento.

A PCR é uma técnica de amplificação de DNA. Sendo assim, para avaliar as moléculas de RNA é necessário transformar esse RNA em uma cópia em DNA (capítulo 7 “Manipulação do RNA”). Há duas razões pelas quais pode-se querer amplificar o DNA. Em primeiro lugar, pode-se querer simplesmente criar várias cópias de uma molécula rara de DNA. Por exemplo, um cientista forense pode querer ampliar um pequeno pedaço de DNA a partir de uma cena de crime. Mais comumente, contudo, pode-se querer comparar duas amostras diferentes de DNA ou RNA (cDNA) para ver qual é a mais abundante. Como o DNA é microscópico não é possível ver se a amostra X contém a maior parte de DNA. No entanto, ao se amplificar as duas amostras na mesma taxa de amplificação (levando em conta a eficiência da reação), pode-se calcular qual era o maior conteúdo no início de cada reação para estabelecer qual era maior antes da amplificação.

Na biologia molecular, a PCR em tempo real quantitativa (*real time* PCR ou qPCR) é uma técnica laboratorial baseada na PCR para amplificar ácidos nucleicos. A qPCR combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por meio da emissão de fluorescência (Tabela 10.1), permitindo o monitoramento da reação em tempo real. Dessa forma, a cada ciclo de amplificação são gerados dados os quais podem ser analisados em tempo real, ao contrário do que ocorre com a PCR convencional, em que a análise é realizada somente ao final da reação, geralmente por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 10.1 Informações sobre o espectro dos fluoróforos repórteres e atenuadores mais usados.

Corante	Máximo de excitação (nm)	Máximo de emissão (nm)	Espectro de cor
Biosearch® Blue	352	447	Azul
FAM	494	518	Verde
TET	521	538	
JOE	520	548	Amarelo
CAL Fluor® Gold 540	522	540	
VIC	538	552	Laranja
HEX	535	553	
NED	546	575	
CAL Fluor® Orange 560	538	559	
Cy® 3	552	570	
Quasar® 570	548	566	
TAMRA	560	582	Vermelho
CAL Fluor® Red 590	569	591	
ROX	587	607	
Texas Red® dye	596	615	
CAL Fluor® Red 610	590	610	
Cy® 5	643	667	
Quasar® 670	647	667	

O uso da PCR convencional traz algumas limitações, como: baixa precisão, baixa sensibilidade, curto alcance dinâmico (< 2 logs), e baixa resolução. Além disso, ela não é automatizada e se baseia apenas no tamanho para discriminação de resultados, que não são expressos em números. Apresenta coloração com brometo de etídio, não é muito quantitativa (semiquantitativa) e mostra um mesmo ponto final (platô) de resultados com valor inicial diferente.

Por outro lado, a qPCR permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e garantindo maior precisão (Figura 10.1). Avaliações de expressão de RNAs e testes diagnósticos para identificação de microrganismos que envolvem métodos moleculares de amplificação geralmente compreendem as etapas de extração dos ácidos nucleicos de amostras biológicas, seguido da amplificação de um segmento específico e da detecção do fragmento amplificado (*amplicon*).

CAPÍTULO 11

SEQUENCIAMENTO DE DNA

Fernanda Matias, Juan Diego Rojas

O início do sequenciamento de DNA data do ano de 1970, com o surgimento das primeiras técnicas. A partir de então, foram desenvolvidos diversos métodos e técnicas para determinar a ordem dos nucleotídeos nas moléculas de DNA (A, T, C, G).

O método mais utilizado para sequenciamento é o método dideoxi de Sanger, também conhecido como o método enzimático da terminação da cadeia, o qual envolve a síntese de DNA a partir de iniciadores complementares a uma região específica de DNA. A partir dessa região, a enzima DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA. A reação é praticamente igual à uma reação de PCR, com a diferença de utilizar uma pequena concentração de nucleotídeos terminadores (mais comumente um dideoxinucleotídeo ddNTP entre A, T, C e G), além dos quatro deoxinucleotídeos (dNTPs de A, T, C e G), e de usar apenas um iniciador por reação. Os fragmentos de diferentes tamanhos gerados são injetados e separados por peso molecular por eletroforese capilar. No caso da utilização de corante terminador (*dye terminator*), os fragmentos são diferenciados por meio de fluorescência, em que cada ddNTP está marcado com um corante diferente e, portanto, todas as bases podem ser detectadas e distinguidas em uma só reação. Um leitor de laser produz a fluorescência nos ddNTPs marcados, o sinal é detectado por um dispositivo de detecção óptico ligado a um *software* que converterá o sinal fluorescente em dados digitais, os quais serão gravados em um arquivo do tipo **.ab1**.

Antes de adquirir ou utilizar equipamentos disponíveis no mercado, lembre-se de que cada um possui características próprias que devem ser observadas. Quadros comparativos de métodos e equipamentos estão dispostos nas páginas a seguir (quadros 11.1 e 11.2).

O sequenciamento se divide em três passos básicos: purificação, quantificação e reação de sequenciamento.

Quadro 11.1 Comparativo dos métodos de sequenciamento utilizados atualmente.

Método	Princípio
Método de Sanger	Método químico que utiliza ddNTPs terminadores
Pirossequenciamento	Deteção do pirofosfato liberado durante a incorporação do nucleotídeo.
Sequenciamento colônia de polimerase (<i>Polony</i>)	Combina uma biblioteca-alvo <i>in vitro</i> com PCR de emulsão, ¹ um microscópio automatizado e uma base em ligação do sequenciamento químico. ²
Sequenciamento Illumina	Moléculas de DNA são anexadas aos iniciadores em um slide e amplificadas para que colônias clonais locais se formem (amplificação-ponte) ³ . Após armazenagem dos dados, o corante e o bloqueador de 3' terminal são removidos quimicamente, permitindo o próximo ciclo.
Sequenciamento por ligação	DNA amplificado por PCR de emulsão. Mistura de todos os iniciadores possíveis de um comprimento fixo são classificados de acordo com a posição sequenciada. Os iniciadores são anelados e ligados; a ligação preferencial pela DNA ligase para combinação de sequências resulta em um sinal informativo do nucleotídeo naquela posição.
Sequenciamento iônico	Deteção de íons de hidrogênio que são liberados durante a polimerização de DNA. A microplaca contendo uma cadeia de DNA-molde a ser sequenciada é inundada com um único tipo de nucleotídeos. Se o nucleotídeo introduzido é complementar ao molde líder de nucleotídeos ele é incorporado na fita complementar crescente. Isso faz com que a liberação de um íon de hidrogênio acione um sensor de íons hipersensível, o que indica que a reação ocorreu.
Sequenciamento DNA nanoball	Utilizado para determinar a sequência genômica completa de um organismo por meio da replicação em círculo rolante para amplificar pequenos fragmentos de DNA genômico em nanobolas de DNA. As sequências liberadas pela ligação são utilizadas para determinar a sequência de nucleotídeos.
Sequenciamento por hibridação	Método não enzimático que utiliza microarranjos de DNA.

1 PCR de emulsão: isola moléculas individuais de DNA junto com contas revestidas com iniciadores em gotículas aquosas dentro de uma fase a óleo. Em seguida, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) reveste cada grânulo com cópias clonais da molécula de DNA seguida de imobilização para posterior sequenciamento.

2 Sequenciamento químico = método de Sanger.

3 Amplificação-ponte: usa fluoróforos brilhantes e excitação a laser para detectar eventos de adição de base a partir de moléculas de DNA individual fixo a uma superfície, eliminando a necessidade de amplificação molecular.

Quadro 11.2 Comparativo dos equipamentos disponíveis no mercado.

Plataforma de sequenciamento	ABI3730xl Genome Analyzer	Roche (454) FLX	Illumina Genome Analyzer	ABI SOLiD	HeliScope	Ion Personal Genome Machine (PGM)
Química do sequenciamento	Sequenciamento Sanger automatizado	Pirosequenciamento ou suporte sólido	Sequenciamento por síntese com terminadores reversíveis	Sequenciamento por ligação	Sequenciamento por síntese com terminadores virtuais	Sequenciamento iônico + Sanger
Método de amplificação	In vivo	PCR emulsão	Amplificação-ponte	PCR emulsão	Nenhum (molécula única)	In vivo
Comprimento da leitura	700-900 pb	200-300 pb	32-40 pb	35 pb	25-35 pb	200-400 pb
Rendimento	0,03-0,07 Mb/h	13 Mb/h	25 Mb/h	21-28 Mb/h	83 Mb/h	10 Mb/h – 1 Gb/h

CAPÍTULO 12

MINERAÇÃO EM BANCOS DE DADOS BIOLÓGICOS

Dinler Amaral Antunes, Gustavo Fioravanti Vieira

Bancos de dados são coleções de informações que se relacionam de forma que o acesso a essas informações adquira uma determinada lógica. Inicialmente eram mais predominantes em empresas e grandes instituições, mas com a chegada da era genômica popularizou-se o acesso a eles em diversas áreas das ciências biológicas pela crescente necessidade de se lidar com uma enorme quantidade de informação.

Dentre os diversos tipos de bancos de dados biológicos estão os de sequências biológicas (de ácidos nucleicos e de proteínas), estruturais, de moléculas biologicamente ativas, de domínios conservados de proteínas, de microarranjos etc. Considerando essa grande diversidade de bancos de dados biológicos, tornou-se necessária a criação de ferramentas que facilitassem o acesso a esse novo universo de informações que estava sendo disponibilizado. Dentre algumas que podem ser citadas, destaca-se o Entrez, desenvolvido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI).

O Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>) é uma poderosa ferramenta de busca global, um portal que permite que buscas cruzadas sejam feitas a partir de uma única palavra-chave. A partir dessa busca é possível consultar, simultaneamente, diversos bancos de dados independentes que compõem o NCBI. Assim, o Entrez pode recuperar de forma eficaz sequências relacionadas, estruturas e referências, além de fornecer imagens com representações gráficas de genes, proteínas e cromossomos, e uma infinidade de outras informações.

Considerando essas informações, pode-se vislumbrar as possibilidades de um projeto de pesquisa completo a partir de uma cuidadosa consulta em uma ferramenta com essas potencialidades. Neste capítulo, simularemos uma situação para demonstrar como é possível realizar o esboço de um projeto de pesquisa a partir das informações obtidas em um banco de informações biológicas.

12.1 O RECEPTOR DE QUIMIOCINA DO TIPO 5 (CCR5) E O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

Entre os anos de 1995 e 1997 foi publicada uma série de estudos evidenciando a resistência ao vírus do HIV de alguns indivíduos pertencentes a

grupos de risco. Esses estudos geraram uma forte repercussão internacional, destacando-se o caso que ficou conhecido como o das “prostitutas de Nairobi”, o qual se referia a um grupo de mulheres quenianas que não soroconvertiam apesar da contínua exposição sexual a indivíduos infectados. Na mesma época, começaram a surgir evidências da contribuição de fatores genéticos do hospedeiro para essa resistência, destacando-se o papel da molécula CCR5, a qual atua como correceptora para algumas variantes do vírus HIV. Um estudo publicado na revista *Cell*, em 1996, relatou que alguns dos indivíduos resistentes analisados eram homozigotos para uma deleção de 32 pb no gene desse receptor de quimiocinas (CCR5- Δ 32), de modo que a frequência na amostra desses indivíduos indicava um papel protetor da deleção. Essa deleção acarretava uma troca de fase de leitura e a consequente produção de uma proteína truncada, a qual não era expressa na superfície das células. Estudos posteriores corroboraram esses achados, descrevendo uma alta frequência do genótipo homozigoto CCR5- Δ 32 em indivíduos expostos ao HIV e que persistiam não infectados, sobretudo caucasianos europeus e norte-americanos. Apesar da euforia inicial, estudos posteriores evidenciaram tanto a ausência dessa deleção em algumas pessoas resistentes em grupos de risco (como no caso das prostitutas de Nairobi) quanto a existência de homozigotos CCR5- Δ 32 infectados pelo HIV (caso em que o vírus utiliza um correceptor alternativo, como o CXCR4).

Ainda assim, essa molécula continua despertando o interesse dos pesquisadores interessados em estudar a resistência ao HIV. Sabe-se, por exemplo, que a presença em heterozigose da deleção CCR5- Δ 32 altera o curso da infecção, prolongando o período de controle da carga viral e reduzindo o declínio de linfócitos T CD4. Qual será o atual “estado da arte” na pesquisa que relaciona CCR5 com HIV? Existem trabalhos que descrevem o efeito de outros polimorfismos nesse gene? E quanto à sua aplicação no campo da vacinologia? Essas e outras questões podem ser encontradas utilizando o Entrez, e seu modo de obtenção será exemplificado passo a passo nas seções a seguir.

12.2 ENTREZ E PUBMED

O Entrez é um sistema de busca e recuperação do NCBI, o qual integra o banco de dados de literatura biomédica (PubMed) junto com outros 36 bancos de dados com conteúdo biológico. Esse conteúdo inclui sequências de DNA e de proteína, genomas, estruturas tridimensionais e informações de expressão gênica. Além de realizar a busca em todos esses bancos de forma simultânea e extremamente rápida, o Entrez ainda fornece uma série de opções para refinar os parâmetros de busca. Dentre essas opções, destacam-se o uso de operadores lógicos ou *booleanos* (AND, OR, NOT), os quais podem ser combinados com os termos pesquisados e organizados com a utilização de parênteses e aspas.

Por exemplo:

- CCR5 **AND** HIV: busca ocorrências contendo tanto o termo “CCR5”, quanto o termo “HIV”;
- (“CCR5 gene” **AND** HIV **OR** “human immunodeficiency virus”) **NOT** CCR5- Δ 32: busca ocorrências contendo a expressão “CCR5 gene” e “HIV”;

PARTE V – PROTEÍNAS

As proteínas são uma vasta classe de biomoléculas envolvidas em diversas atividades das células. Elas são formadas pela tradução do RNA mensageiro e sua estrutura primária é constituída de uma sequência de aminoácidos. São necessários três nucleotídeos para o reconhecimento de um aminoácido, fazendo com que o código genético seja degenerado (Quadro 13.1).

Quadro 13.1 Simbologia e código genético padrão dos aminoácidos.

Símbolos		Aminoácido	Código genético padrão	Unidade básica
A	Ala	Alanina	GCU, GCC, GCA, GCG	GC_
B	Asx	Asparagina ou ácido aspártico (aspartato)	-	-
C	Cis	Cisteína	UGU, UGC*	UG_
D	Asp	Ácido aspártico (aspartato)	GAU, GAC	GA_
E	Glu	Ácido glutâmico (glutamato)	GAA, GAG	GA_
F	Fen	Fenilalanina	UUU, UUC	UU_
G	Gli	Glicina	GGU, GGC, GGA, GGG	GG_
H	His	Histidina	CAU, CAC	CA_
I	Ile	Isoleucina	AUU, AUC, AUA	AU_
K	Lis	Lisina	AAA, AAC	AA_
L	Leu	Leucina	UUA, UUG CUU, CUC, CUA, CUG	UU_ CU_
M	Met	Metionina	AUG (iniciador)	-
N	Asn	Asparagina	AAU, AAC	AA_
P	Pro	Prolina	CCU, CCC, CCA, CCG	CC_
Q	Gln	Glutamina (glutamida)	CAA, CAG	CA_
R	Arg	Arginina	CGU, CGC, CGA, CGG AGA, AGG	CG_ AG_
S	Ser	Serina	UCU, UCC, UCA, UCG AGU, AGC	UC_ AG_
T	Tre	Treonina	ACU, ACC, ACA, ACG	AC_
V	Val	Valina	GUU, GUC, GUA, GUG	GU_
W	Trp	Triptofano	UGG*	UG_
Y	Tir	Tirosina	UAU, UAC*	UA_
Z	Glx	Glutamina ou glutamato	-	-

* Códons de terminação: UAA, UAG, UGA.

CAPÍTULO 13

ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Nélson Kretzmann Filho, Fernanda Matias

13.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROFOTÔMETRO

Existe uma variedade de métodos para a determinação da concentração de proteína em uma amostra. Todos os métodos usados devem ser padronizados com uma proteína pura conhecida (por exemplo, albumina de soro bovina).

13.1.1 MÉTODO DE BRADFORD

O método de Bradford depende da união quantitativa de um corante, o Azul Brillante de Coomassie, a uma proteína desconhecida e da comparação dessa união a diferentes quantidades de uma proteína padrão. O Azul Brillante de Coomassie G250 é um pigmento do tipo trifenilmetano aniônico que se une de forma não covalente aos resíduos de lisina das proteínas, convertendo-se da cor vermelha para o azul após a ligação à proteína. O complexo é formado em aproximadamente 2 min, permanecendo disperso em solução por aproximadamente 1 h, e tem um alto coeficiente de extinção que lhe concede grande sensibilidade na dosagem das proteínas. Normalmente, o padrão é produzido a partir de albumina sérica bovina com 1 µg a 10 µg de proteína.

13.1.1.1 Reagentes

Solução A (curva padrão)

- NaCl: 0.15 M
- Solução de proteína (albumina bovina sérica ou BSA): 1 mg/mL

Solução B (adicione 100 mg de Azul Brilhante de Coomassie G-250 aos itens a seguir)

- Etanol 100%: 50 mL
- Ácido fosfórico 85%: 100 mL
- H₂O deionizada q.s.p.: 1.000 mL

13.1.1.2 Preparo da curva padrão

Adicione as quantidades em triplicata (x 3) (Branco, A1, A2... A14) em uma placa de 96 poços (Quadro 13.2).

Quadro 13.2 Como devem ser feitas as concentrações para o procedimento.

Branco	A2	A5	A8	A10	A13	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
Branco	A3	A5	A8	A11	A13	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
Branco	A3	A6	A8	A11	A14	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
A1	A3	A6	A9	A11	A14	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
A1	A4	A6	A9	A12	A14	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
A1	A4	A7	A9	A12	A15	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
A2	A4	A7	A10	A12	A15	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
A2	A5	A7	A10	A13	A15	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra

13.1.1.3 Preparo da solução B

1. Dissolva o Azul Brilhante de Coomassie em etanol 100%.
2. Após dissolução, adicione o ácido fosfórico 85%.
3. Homogeneíze por aproximadamente 5 min.
4. Acerte o volume com água deionizada.

Dica

- As amostras podem ser feitas em duplicata, e, portanto, em uma placa podem ser quantificadas 24 amostras.

13.1.1.4 Procedimento

1. Adicione a quantidade de água MilliQ segundo a tabela.
2. Construa a curva padrão utilizando a solução A (1 a 10 µg ou 10 a 100 µg de albumina em 100 µL de tampão salino).

CAPÍTULO 14

EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS

Gustavo Pelicoli Riboldi, Fernanda Matias

A expressão recombinante de genes em sistemas eucarióticos é a alternativa viável para a produção de proteínas contendo modificações pós-traducionais, e diversos sistemas fornecem possibilidades para essa expressão em diferenciados hospedeiros. Para esse fim, o pesquisador deve considerar o vetor e o sistema de expressão mais apropriados que sejam compatíveis com o resultado esperado, o que depende principalmente do tipo de proteína a ser expressa (seja ela proteína de membrana, produto de secreção, proteína intracelular etc.), bem como do seu uso. Obter dados básicos da proteína em questão, como a função, a finalidade de uso, a quantidade necessária, se ela será marcada, entre outros aspectos, facilita na escolha de ambos, vetor e hospedeiros, para o sistema de expressão. O uso de um hospedeiro diferente de *E. coli* e *S. cerevisiae* é particularmente importante na biotecnologia, campo em que o principal interesse não é o estudo de um gene em particular, mas, sim, utilizar-se de procedimentos de clonagem para uma alta e controlada produção de produtos metabólicos (de hormônios como a insulina), ou ainda modificar as propriedades de um organismo em particular (inserindo resistência a herbicidas em uma planta, por exemplo).

Primeiramente, é de extrema importância analisar bem a construção que se quer realizar antes de iniciar os trabalhos de clonagem, expressão e purificação do produto. De uma maneira geral, as seguintes questões devem ser observadas:

14.1 REGIÕES CONTROLADORAS

É importante identificar bem na sequência a sua região controladora, ou ainda considerar a hipótese da adição de uma determinada região controladora auxiliar, no caso da utilização de um hospedeiro alternativo ou de vários hospedeiros. Na falta de uma região controladora, esta deve ser adicionada ao vetor de expressão.

14.2 MARCADORES, CAUDAS E SÍTIOS DE CLIVAGEM

A adição de marcadores, caudas ou sítios de clivagem constitui uma possibilidade que pode posteriormente ajudar na identificação da proteína, ou ainda

auxiliar na etapa de sua purificação. Marcadores oferecem a possibilidade de identificação da molécula-alvo por meio de metodologias como *Western blot*, ELISA ou imunofluorescência. Diversos tipos de caudas podem ser adicionados ao vetor para a produção de uma proteína marcada, que posteriormente será facilmente purificada utilizando-se uma coluna cromatográfica de afinidade. Dentre as mais comuns, estão FLAG (DYKDDDDK), hemaglutinina do vírus influenza-HA (YPYDVPDYA), cauda de histidina-His₆ (HHHHHH) e c-myc (EQKLISEEDL). No caso da purificação de uma proteína marcada, pode ser necessário utilizar uma região de clivagem que propicie uma eliminação do marcador após a purificação da proteína. Os sítios de clivagem mais comumente utilizados compreendem aqueles reconhecidos pela trombina (VPR'GS), pelo fator Xa (IEGR'), pela protease PreScission (LEVLFQ'GR), pela enteroquinase (DDDDK'), entre outros. No entanto, deve-se tomar a precaução de analisar, primeiramente, a estrutura primária da proteína recombinante a ser produzida, para que o sítio de clivagem escolhido não esteja presente no produto a ser purificado.

14.3 SUBCLONAGEM

Se houver necessidade de subclonagem de um vetor de clonagem para um de vetor de expressão, isso pode ser realizado principalmente por meio do uso clássico de enzimas de restrição, que cortam o fragmento de DNA desejado e posteriormente religam-no no vetor de expressão, exatamente nos sítios de restrição correspondentes. Atualmente, existe a possibilidade de realização de clonagem/subclonagem sem a utilização de endonucleases, mas por meio de um sistema de transferência mediado por recombinase (ECHO e Gateway – Invitrogen; Creator – Clontech, entre outros). As recombinases realizam essencialmente as reações de clivagem e ligação em um único passo, eliminando etapas de purificação de fragmentos, que além de demorados levam à perda de material. Além disso, esses sistemas possuem uma particularidade: eles possibilitam a expressão em diferenciados hospedeiros.

14.4 SELEÇÃO DE UM HOSPEDEIRO ADEQUADO

Diversas proteínas eucarióticas necessitam modificações pós-traducionais, como fosforilação, adição de sequência sinal, glicosilação, proteólise, que podem afetar sua função, sua meia-vida e sua antigenicidade. A escolha de um hospedeiro para a expressão do vetor deve considerar essas necessidades. Células de insetos, por exemplo, não possuem determinadas vias de glicosilação para a complexação do ácido siálico, o que pode influenciar as propriedades farmacocinéticas de diversas glicoproteínas. Outro fator determinante para a escolha do hospedeiro reside na quantidade de produto recombinante que se deseja obter ao final do processo. A incapacidade de se obter uma proteína homoganeamente pura para processos de cristalização quando da utilização de hospedeiros eucariotos é devida principalmente à glicosilação do produto

CAPÍTULO 15

VETORES

Fernanda Matias, Gustavo Riboldi

Quando trabalhamos com DNA recombinante, precisamos pensar em obter muitas cópias desse DNA. Para isso, inserimos o dado gene em um elemento genético autorreplicante, que pode ser um vírus, um plasmídeo ou outro, chamado vetor. O vetor precisa ser relativamente pequeno, sendo o seu tamanho ideal inferior a 10 kb, pois as moléculas grandes tendem a degradar-se durante a purificação e são também mais difíceis de manipular. Esse vetor será utilizado para clonagem e/ou expressão genética em um microrganismo de interesse que permita a obtenção de cópias.

1. O vetor funcionará como um veículo que transporta o gene para o interior da célula hospedeira, que é normalmente uma bactéria, embora outras células vivas possam ser utilizadas.
2. Dentro da célula hospedeira o vetor irá se multiplicar, produzindo numerosas cópias idênticas não só de si próprio, mas também do gene que transporta.
3. Quando a célula hospedeira se divide, a sua descendência recebe cópias das moléculas de DNA recombinantes, continuando depois a replicação dos vetores.
4. Após um grande número de divisões celulares, é produzida uma colônia (ou um clone) de células hospedeiras idênticas. Cada célula do clone contém uma ou mais cópias da molécula de DNA recombinante. Chamamos o gene transportado pela molécula recombinante de “clonado”.

15.1 SELEÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO

Um vetor de expressão precisa apresentar determinados elementos regulatórios, necessários para a expressão do gene desejado. Dentre eles estão: uma região promotora, um códon iniciador de transcrição, um códon terminador, um sinal de poliadenilação e um marcador seletivo. Diversos elementos procarióticos são também necessários ao trânsito entre hospedeiros eucarióticos e procarióticos, como marcadores de seleção de resistência a antimicrobianos e uma origem de replicação para a manutenção do plasmídeo. Especificamente, os seguintes fatores devem ser considerados no momento da escolha de um vetor de expressão em eucariotos:

15.1.1 REGIÕES PROMOTORAS

Os promotores constituem regiões de sequência de DNA capazes de recrutar a enzima RNA polimerase e fatores de transcrição para que ocorra a ativação da transcrição de um gene. Essa região precisa apresentar um sítio de início de transcrição, uma CAAT *box* e uma TATA *box*. A força da região promotora corresponde à estabilidade de ligação do complexo RNA polimerase – fator de transcrição que inicia a produção do RNA mensageiro. O EF-1a, por exemplo, corresponde a um promotor forte que, portanto, fornece uma expressão rápida e em grande quantidade da proteína desejada.

15.1.2 REGIÃO DE POLIADENILAÇÃO

Corresponde a uma sequência consenso (AAUAAA) envolvida na estabilização do RNA mensageiro; assim como ocorre com os promotores, existem diferentes regiões de poliadenilação.

15.1.3 MARCADORES DE SELEÇÃO

Inserem genes que fornecem resistência a uma droga particular, fazendo com que somente células que contenham um plasmídeo possuidor de tal elemento consigam crescer. Dentre essas drogas destacam-se a blasticidina, o histidinol, a higromicina, a puromicina, o ácido micofenólico, a seocina, entre outras.

15.1.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO

Existe a possibilidade da utilização de promotores induzíveis e sistemas de expressão regulada para o controle de quando uma expressão deve ocorrer, bem como da quantidade de produto recombinante que deve ser obtida. Essa metodologia é particularmente interessante quando é necessária a expressão de uma proteína tóxica para a célula hospedeira. Como exemplo, destacamos os sistemas envolvendo o promotor do vírus de tumor mamário de camundongos (MMTV), induzido por dexametasona.

15.1.5 SISTEMAS DE VETORES SIMPLES E DUPLOS

Um sistema de expressão pode, ainda, envolver mais de um vetor. Nesse caso, o gene de interesse estaria inserido em um vetor, enquanto o marcador de seleção estaria disposto no segundo. Como exemplo de hospedeiro que admite esse tipo de metodologia, podemos citar as células de *Drosophila* S2.

De qualquer maneira, todo o material explanado até agora nos leva à pergunta principal: afinal, qual vetor deve ser utilizado? Isso irá depender de quanto trabalho você está disposto a despendar com o seu sistema de expressão, desde os passos de clonagem e desenho do vetor até a transfecção, e de quão rapidamente você necessita obter seu produto final.

CAPÍTULO 16

TRANSFORMAÇÃO

Fernanda Matias, Sabrina Dick

Os métodos de transformação gênica ou genética são amplamente utilizados nos laboratórios que trabalham com organismos geneticamente modificados (OGM). A transformação celular se dá pela inserção de um gene exógeno que fornece ao transformante uma característica diferenciada, e muitas vezes superior, à célula original. Em geral, se utilizam vetores (plasmídeos, cosmídeos, vírus) contendo o gene de interesse. Os vetores, assim como as linhagens, devem ser cuidadosamente selecionados de acordo com o objetivo do experimento. Bactérias gram-negativas e leveduras são mais fáceis de transformar pela própria estrutura celular que possuem, e normalmente se usa entre 10 e 50 nanogramas de DNA (vetor + inserto) para a transformação. Neste capítulo são abordados os métodos mais simples de transformação bacteriana e de leveduras.

16.1 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES PELO MÉTODO DE CLORETO DE CÁLCIO

16.1.1 MATERIAL NECESSÁRIO

- Meios de cultura líquidos pré-aquecidos a 37 °C
- Placas de Petri contendo LB Agar pré-aquecidas a 37 °C
- Isopor contendo gelo seco e álcool
- Estufa a 37 °C
- Agitador rotativo a 37 °C
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Espectrofotômetro
- Pipetas e ponteiras de 1 mL e 0,2 mL estéreis
- Tubos de microcentrífuga estéreis
- Tubos de centrífuga estéreis

16.1.2 PROCEDIMENTO

1. Semeie a linhagem de *E. coli* de interesse em uma placa de LB isolando as colônias. Verifique as especificações de cada linhagem, como necessidade de antibióticos (XL1-Blue necessita de tetraciclina, pLysS, cloranfenicol, Arctic, gentamicina...).
2. Cultive em estufa com o ágar invertido a 37°C por dez8 h.
3. Selecione uma colônia com alça de platina e cultive em LB líquido em agitador rotativo a 37 °C e a 200 rpm por dez8 h (verifique a necessidade de antibiótico).
4. Transfira cerca de 2 mL do pré-inóculo para 100 mL de meio LB líquido estéril.
5. Cultive em agitador rotativo a 37 °C e a 200 rpm por duas a 3 h, até DO_{600nm} atingir de 0,5 abs a 0,6 abs.
6. Transfira as células para tubos de centrifuga estéreis (2 falcons de 50 mL, por exemplo).
7. Centrifugue a 4.000 x g por 20 min a 4 °C.
8. Descarte o sobrenadante.
9. Ressuspenda o sedimento em 40 mL de $CaCl_2$ 0,1 M estéril gelado (volume final).
10. Incube em banho de gelo por 1 h.
11. Centrifugue a 4.000 x g por 20 min a 4 °C.
12. Descarte o sobrenadante.
13. Ressuspenda o sedimento em 1 mL de $CaCl_2$ 0,1 M estéril gelado (volume final) se o uso for imediato. Se forem congeladas alíquotas, adicione glicerol para uma concentração final de 15% (v/v), distribua o líquido em tubos de microcentrifuga (100 µL por tubo), congele em banho de gelo seco/etanol e armazene a -80 °C.

Dica

- Sempre verifique o meio de cultura de cada linhagem; linhagens contendo gene pLysS necessitam de meio 2x TY em todas as fases!
- Tudo deve ser feito em gelo seco com álcool!!!
- Esse é um bom método para quem precisa fazer muitas transformações.

16.2 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES PELO MÉTODO DE MAGNÉSIO (OU SAIS)

16.2.1 MATERIAL NECESSÁRIO

- Meios de cultura líquidos pré-aquecidos a 37 °C
- Placas de Petri contendo LB Agar pré-aquecidas a 37 °C

CAPÍTULO 17

VISUALIZAÇÃO E MANIPULAÇÃO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS TRIDIMENSIONAIS

Maurício Menegatti Rigo, Dinler Amaral Antunes, Gustavo Fioravanti Vieira

Este capítulo tem o propósito de inserir o usuário no contexto de programas de visualização de estruturas tridimensionais. Os tópicos foram abordados de maneira didática e simples, objetivando o entendimento da base de funcionamento dos programas. Sendo assim, o presente capítulo não tem por objetivo demonstrar tópicos avançados sobre os programas, mas, sim, os aspectos básicos. Dentre a enorme gama de programas de visualização de estruturas tridimensionais, escolhemos dois dos principais visualizadores que utilizamos na rotina de nosso laboratório: o Swiss-PDBViewer (SPDBv) e o Chimera.

17.1 SWISS-PDBVIEWER

O Swiss-PDBViewer (SPDBv) - também conhecido como DeepView - é o visualizador de proteínas tridimensionais desenvolvido no Swiss Institute of Bioinformatics, localizado na cidade de Basileia, na Suíça. Esse visualizador foi desenvolvido inicialmente por Nicolas Guex em 1994. Desde então, o programa vem sendo modificado e atualizado, e a versão estável mais recente é a 4.0.4.

Mas o SPDBv é muito mais do que um simples visualizador de estruturas. Ele possui ferramentas para análise de diedros, cálculos de energia global e de energia de ligações/torções entre moléculas, cálculos de potencial eletrostático, modelagem por homologia, análise da estabilidade de modelos, minimização de energia, entre outros.

Neste capítulo, abordaremos apenas algumas das funções úteis para visualização e manipulação de proteínas, dando um enfoque mais básico para a utilização do programa.

17.1.1 OBTENÇÃO E INSTALAÇÃO

O SPDBv é disponibilizado na World Wide Web (<http://spdbv.vital-it.ch/download.html>) como um *freeware*, ou seja, a sua utilização não implica pagamento de licenças ou qualquer outra taxa ao governo ou à iniciativa privada.

Atualmente, a versão estável mais recente (v. 4.0.4) pode ser executada nas plataformas Linux (por meio do aplicativo Wine), Microsoft Windows e Macintosh.

No caso do download ser feito para a plataforma Windows, o usuário recebe um conjunto de arquivos compactados. Uma vez descompactado, o programa já pode ser utilizado, sem necessidade de instalação. Basta rodar o aplicativo do SPDBv com a extensão **.exe** que se encontra entre os arquivos descompactados.

17.1.2 UTILIZAÇÃO

Ao abrir o programa, uma janela é aberta (“*Main window*” (MW)) e na guia “*File*” é possível escolher o arquivo que se deseja visualizar. O SPDBv permite a visualização de arquivos PDB (*Protein data bank*), mmCIF (*macromolecular crystallographic information file*) ou MOL/SDF, todos contendo informações sobre as coordenadas atômicas das estruturas. Além disso, é possível carregar mais de uma molécula simultaneamente.

Ao abrir a molécula no programa, as ligações covalentes são representadas automaticamente como linhas interligando os átomos (*Wireframe representation*) em uma janela de visualização (“*Display window*” (DW)). Se o arquivo contém erros em alguns aminoácidos, ou se está com alguma informação faltante (cadeias laterais, por exemplo), uma janela de texto se abrirá, informando onde ocorreu o problema. Em geral, o próprio programa corrige os erros e a molécula é carregada sem maiores problemas.

O SPDBv (Figura 17.1) possui uma opção que reúne os principais comandos básicos de visualização em um só local: o painel de controle (“*Control panel*” (CP)). Caso o CP não tenha sido aberto concomitantemente com a janela de visualização, basta escolher a opção “*Control panel*”, sob a guia “*Window*” (na parte superior da MW).

A MW apresenta alguns botões de acesso rápido, sendo os quatro primeiros os mais importantes, conforme explicado e ilustrado a seguir:



O primeiro (à esquerda, logo abaixo de “*File*”) é utilizado para “centralizar” a(s) estrutura(s) no DW.



O segundo é utilizado para “segurar” a(s) estrutura(s) e arrastá-la(s) com o auxílio do *mouse*.



O terceiro é o *zoom*, utilizado para afastar e aproximar as estruturas com o auxílio do *mouse*.



O quarto é utilizado para realizar a rotação em torno dos eixos X e Y da estrutura com o auxílio do *mouse*.

Os outros botões de acesso rápido não serão discutidos neste capítulo.

Práticas e protocolos básicos de Biologia Molecular traz facilidade para o seu dia a dia de laboratório, explicando as bases dos reagentes para a solução de problemas. Em um tempo em que tudo é feito por kits, saber o que está no kit para resolver um problema de protocolo é essencial. O principal objetivo desse livro é trazer as bases práticas de biologia molecular para auxiliar o aluno a iniciar um experimento no laboratório. Trazemos a experiência de diversos profissionais para que o aluno não perca tempo e reagente tentando descobrir o que pode estar errado no seu experimento.

ISBN 978-65-5506-316-5

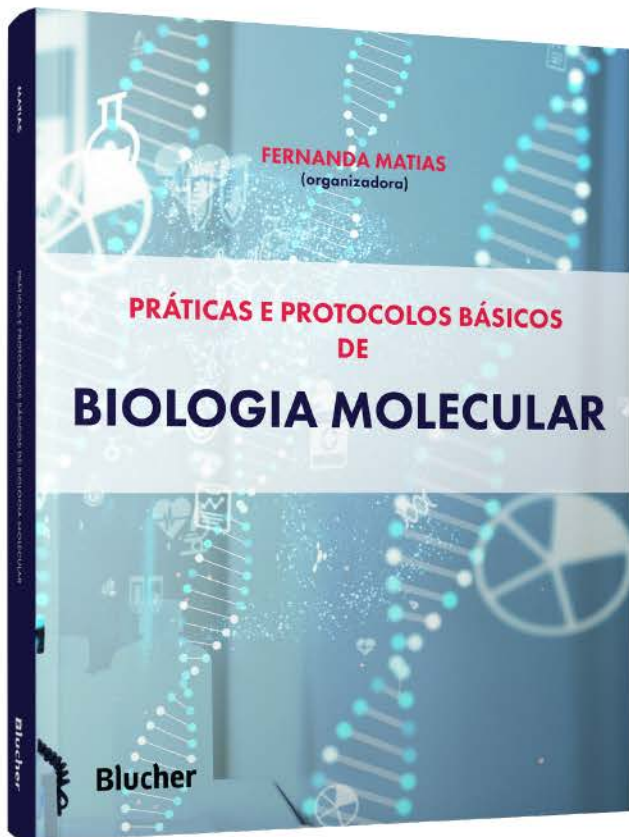


9 786555 063165



www.blucher.com.br

Blucher



Clique aqui e:

VEJA NA LOJA

Práticas e Protocolos Básicos de Biologia Molecular

Fernanda Matias

ISBN: 9786555063165

Páginas: 276

Formato: 20,5 x 25,5 cm

Ano de Publicação: 2021

Peso: 0.600 kg
