



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

BIOTECNOLOGIA ENGENHARIA GENÉTICA

Manual de apoio às
Práticas Laboratoriais

2018-2019

Carlos Sinogas



ÍNDICE

PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA	3
Vestuário e comportamentos	3
Riscos físicos	3
Riscos químicos	4
Riscos biológicos	5
Planeamento	5
Procedimentos gerais	5
REGISTOS E RELATÓRIOS	6
TÉCNICAS LABORATORIAIS BÁSICAS EM MICROBIOLOGIA	7
Meios de cultura	7
Esterilização	8
Tubos de cultura e Placas de Petri	8
Instrumentos para transferência de culturas	8
Câmaras de cultura	9
Frigorífico	9
MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO	10
A. Esterilização por calor húmido	10
B. Esterilização por calor seco	11
C. Esterilização por gases	11
D. Radiações	11
E. Filtração estéril	11
F. Desinfetantes e antissépticos	11
PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	12
1. PIPETAGENS, SOLUÇÕES E DILUIÇÕES	12
3. VERIFICAÇÃO E CALIBRAÇÃO DE PIPETAS	17
4. CULTURA DE BACTÉRIA RECOMBINANTE (<i>E.coli</i>)	20
5. PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO - Lise Alcalina	21
6. PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO - MiniPrep	22
7. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	23
8. ANÁLISE DE DNAs EM GEL DE AGAROSE	24
9. PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES	25
10. TRANSFORMAÇÃO	26
11. SELEÇÃO DE RECOMBINANTES	27
12. ANÁLISE DE PROTEÍNA RECOMBINANTE – Indução da Expressão	28
13. ANÁLISE DE PROTEÍNA RECOMBINANTE – PAGE	29
14. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	31
15. DOT BLOT (proteínas)	33
ANEXOS	34
Plasmídeo pSK+	34
Plasmídeo pCS11	35
Plasmídeo pCS62	36
Plasmídeo pCS71	37
Plasmídeo pCS84	38
Enzimas de Restrição	39
Tabela Periódica	40
TRABALHO AUTÓNOMO	41



PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA

(Adaptado de “Biotechnology Explorations”, ASM Press)

Ensinar e aprender no laboratório de Biotecnologia envolve sempre um certo nível de risco para o operador e companheiros. Novos equipamentos, reagentes e materiais biológicos são parte integrante dos trabalhos experimentais que envolvem ácidos nucleicos e proteínas. Os estudantes estão a aprender novas técnicas, usando reagentes e materiais biológicos e novos equipamentos que apresentam algum risco no contexto da sua utilização laboratorial. Não sendo possível fazer a experimentação sem usar os equipamentos, os reagentes e o material biológico, espera-se dos estudantes que adotem as atitudes adequadas para minimização dos riscos associados.

“Alerta permanente”, um conceito importado dos pilotos de avião, cria o enquadramento para a manutenção da segurança apropriada face aos riscos inerentes. Tal como o piloto deve estar alerta para a sua envolvente, com constante vigilância para a sua segurança e a dos outros, assim os estudantes de biotecnologia devem fazer no laboratório. O piloto tem sempre de saber “onde está, para onde vai e como lá chegar”. Traduzido para o ambiente laboratorial, os estudantes devem estar concentrados nas tarefas que desenvolvem, compreender o equipamento, os reagentes e os materiais biológicos que usam, devendo seguir os passos adequados à condução da experiência. Ao mesmo tempo cada estudante deve conhecer o que os seus colegas fazem e os protocolos que seguem.

Neste enquadramento são quatro as principais questões de segurança que se colocam:

- Vestuário e comportamentos
- Riscos físicos
- Riscos químicos
- Riscos Biológicos

Vestuário e comportamentos

Reduzir ao mínimo os pertences pessoais e outros materiais na bancada de trabalho. Casacos, sacos e outros pertences deverão ser depositados no bengaleiro à entrada do laboratório.

Uso de bata obrigatório (Sempre), para evitar sujar ou contaminar a roupa.

Cabelo, quando comprido, devidamente apanhado para evitar a sua ignição na chama ou a contaminação química ou biológica.

Sapatos fechados são recomendados, pois os abertos não protegem de eventuais respingos que possam cair.

Proteção dos olhos e pele nua aquando da utilização de UV

Luvas descartáveis são exigíveis quando se manipulam certos reagentes ou microrganismos.

É desaconselhado o uso de joias, em especial anéis e pulseiras que impedem o adequado uso das luvas.

Comer, beber, mascar pastilhas elásticas, aplicar cosméticos é proibido no laboratório, para que eventuais contaminações não sejam dirigidas para zonas não protegidas. Roer as unhas, lápis, canetas e dedos na boca igualmente proibido, pelas mesmas razões.

Os estudantes devem conhecer e compreender bem o trabalho a fazer. Uma boa programação é meio caminho para uma boa execução. O docente deverá ser questionado sempre que surjam dúvidas sobre os procedimentos a seguir.

As mãos devem ser sempre lavadas antes de iniciar o trabalho e depois de concluída a experimentação, para que contaminantes não sejam introduzidos nem transportados para fora do laboratório.

As bancadas de trabalho devem ser sempre limpas e sanitizadas com álcool antes do início do trabalho e depois deste concluído. Não se conhece o que outros estudantes possam ter deixado no laboratório, nem se pretende deixar contaminações para quem vier a seguir.

Riscos físicos

Fogo

Identificar a localização do chuveiro, dos extintores e dos baldes de areia.

Identificar a localização dos quadros elétricos e da torneira geral do gás.

Aquecer produtos a altas temperaturas pode provocar queimaduras.

As soluções aquecidas no micro-ondas, em especial as agaroses, podem ficar sobreaquecidas e entrar em ebulição explosiva após agitação, provocando queimaduras graves.



Bicos de gás e lamparinas

Conhecer como se deve acender o bico de gás.

Nunca abandonar um bico ou lamparina acesa. Evitar movimentá-los quando acesos.

Flamejar os instrumentos e os tubos com cuidado para evitar formação de aerossóis.

Não usar material facilmente inflamável nas proximidades da chama (atenção ao álcool).

Autoclave

Evitar exposição aos vapores da autoclave aquando da sua abertura. Podem provocar queimaduras.

Usar luvas isolantes para remover materiais da autoclave

Vidros partidos e material cortante

Os vidros partidos deverão ser removidos com auxílio de pinça ou luvas, nunca com as mãos desprotegidas.

Não colocar vidros partidos no lixo comum.

Se apropriado recolher para descontaminação.

Usar lâminas cortantes com auxílio de pinças ou luvas.

Equipamento elétrico e de eletroforese

Verificar os cabos elétricos dos equipamentos e nunca usar cabos defeituosos.

Evitar o uso de material elétrico próximo de água.

Desligar o equipamento (botão OFF) antes de o ligar à corrente. Nunca ligar ou desligar um aparelho de eletroforese sem antes cortar a corrente (botão OFF).

Nunca abrir uma tina de eletroforese sem antes desligar a corrente elétrica.

Transiluminador de UV

Ao usar o transiluminador de UV, nunca o ligue antes de baixar a tampa protetora.

Desligue a luz antes de levantar a tampa e remover o gel.

Riscos químicos

Prestar atenção às notas dos protocolos sobre os riscos associados a alguns reagentes e seguir as instruções do docente.

Nunca pipetar à boca. Usar pipetadores mecânicos.

Os restos de produtos químicos não devem ser rejeitados para o esgoto.

Localizar o chuveiro e o sistema de lavagem de olhos.

A roupa atingida por reagentes químicos deverá ser de imediato removida e a pele em contacto ser abundantemente lavada.

Não remover produtos químicos do laboratório.

Alguns reagentes químicos a usar nas experiências têm associados riscos particulares. O uso de reagentes em solução ou pré-misturados reduz o nível de exposição e o tempo da sua utilização. A quantidade manipulada é também importante. Alguns reagentes com riscos específicos a utilizar nas sessões laboratoriais:

Acrilamida e bis-acrilamida – Mutagénico, carcinogénico e neurotóxico quando inalado ou ingerido. Usar apenas soluções previamente preparadas e com luvas.

Persulfato de amónio – Oxidante potente. Manter afastado de materiais combustíveis e de fontes de calor.

Clorofórmio – Potente solvente orgânico

DTT (Ditiotreitol) - Provoca irritação nos olhos, pele, membranas das mucosas e trato respiratório.

Etanol – Inflamável.

Brometo de etídio (soluções) – Mutagénico. Usar luvas.



SDS (lauril sulfato de sódio) – Irritante dos olhos e da pele.

Ácidos e bases concentrados – Corrosivos. Provocam queimaduras ao contacto.

Riscos biológicos

Desinfetar a área de trabalho antes e depois de manipular microrganismos.

Usar lixívia diluída (10% de hipoclorito de sódio) para descontaminar áreas e instrumentos eventualmente contaminados.

Evitar as mãos na boca ou nos olhos.

Flamejar cuidadosamente instrumentos e tubos para evitar a formação de aerossóis.

Não remover microrganismos do laboratório.

Tratar todas as amostras de DNA, plasmídeos e bactérias como material contaminado.

Rejeitar as culturas e outro material contaminado no tabuleiro para autoclavar.

Não juntar material não contaminado no tabuleiro para autoclavar.

Não rejeitar no lixo comum o que quer que seja que tenha contactado bactérias.

Se bem que os microrganismos a usar na experimentação (*E. coli*) não coloquem riscos biológicos particulares deve ter-se sempre em mente que são criadas condições de crescimento dos mesmos. O risco naturalmente aumenta com a quantidade de bactérias e outros microrganismos, eventualmente patogénicos, podem contaminar as culturas e ser amplificados.

Planeamento

Não iniciar qualquer experiência sem o conveniente planeamento. O conhecimento e compreensão prévios dos procedimentos experimentais, grelhas adequadas para registo dos resultados e a efetiva disponibilidade de todos os recursos materiais necessários constituem elementos importantes para o sucesso das experiências. O tempo "perdido" num planeamento inicial é largamente compensado pelo nível da aprendizagem conseguido e pela prevenção da necessidade de repetição de experiências eventualmente bloqueadas.

Procedimentos gerais

Todos os procedimentos deverão ser efetuados tendo em mente a minimização dos riscos associados à manipulação, numa perspectiva de proteção do próprio operador e de terceiros. Mais importante que um conjunto de regras a obedecer é a utilização do bom senso do operador nos trabalhos a realizar.

É muito importante usar a cabeça antes das mãos.



REGISTOS E RELATÓRIOS

É conveniente usar um bloco ou caderno para registo de todas as ocorrências e dos resultados da experimentação. Sugere-se o uso de caderno de laboratório, de preferência com folhas não amovíveis, para que não sejam eliminadas notas ou registos considerados irrelevantes na altura, como sucede com frequência quando se passam os apontamentos "a limpo", mas de grande utilidade para consulta futura na elaboração do relatório final ou para a eventual repetição da experiência. O rigor e pormenor dos registos efetuados durante a execução do trabalho experimental facilitarão a aprendizagem e a interpretação dos resultados obtidos, em especial quando estes são inesperados.

Um qualquer relatório de uma experiência laboratorial deverá documentar de forma tão completa quanto possível o procedimento executado e os resultados obtidos. Para além disso deverá ser também objetivo do relator redigir um documento compreensível para o leitor e suscetível de apoiar a eventual repetição da mesma experiência em idênticas condições. Para a elaboração dos relatórios sugerem-se, como orientação, as seguintes secções:

Título	Identificador do conteúdo do relatório
Resumo	Pequeno texto de que constem os objetivos almejados e as conclusões obtidas
Objetivo	Razão de ser do trabalho realizado
Introdução	Dados conhecidos que justificam a realização da experiência empreendida
Palavras-chave	Termos diretamente relacionados com o trabalho
Material e reagentes	Listagem exaustiva do equipamento, reagentes e outro material usado
Protocolo experimental	Marcha geral dos procedimentos aplicados. Deverão ser relatados os procedimentos concretos executados, com referência a eventuais desvios relativamente ao procedimento recomendado / descrito
Resultados	Registo das observações efetuadas e dos dados recolhidos
Discussão	Comentário crítico aos resultados obtidos
Conclusão	Descrição do cumprimento ou incumprimento do objetivo, decorrente dos resultados obtidos
Nota crítica	Comentário à globalidade da experiência, com recomendações para a sua repetição ou outras consideradas adequadas
Bibliografia	Referências consultadas ou utilizadas para a realização do trabalho
Dependente do tipo do trabalho executado, da forma do relatório e da sensibilidade do relator, algumas das secções descritas poderão ser fundidas, como "Resultados e discussão" ou "Discussão e conclusões", por exemplo	



TÉCNICAS LABORATORIAIS BÁSICAS EM MICROBIOLOGIA

Ao desenvolvimento dos trabalhos em Biotecnologia é fundamental recorrer às técnicas próprias da Microbiologia para a manipulação, crescimento e manutenção de bactérias e outros hospedeiros de DNAs recombinantes.

Os microrganismos são ubíquos. Podem encontrar-se no solo, no ar, na água, na comida, nos esgotos e nas superfícies corporais, entre outros locais. Ou seja, existem por todo o lado à nossa volta, o nosso ambiente está repleto de microrganismos. Para estudar qualquer tipo de microrganismo é necessário separar estas populações mistas, de forma a manipular no laboratório as chamadas culturas puras, culturas de uma única estirpe. Apesar do fornecimento de estirpes bacterianas puras para a realização dos trabalhos, as culturas podem vir a ser contaminadas.

Para isolar e estudar os microrganismos em cultura pura, o experimentador necessita de alguns equipamentos laboratoriais básicos e da aplicação de técnicas específicas usando materiais particulares. Nas práticas que aplicaremos no decurso desta disciplina, ter-se-á de recorrer às técnicas base de microbiologia/bacteriologia com utilização dos equipamentos e materiais específicos que se indicam:

Equipamento	Autoclave e dispositivos de filtração estéril Ansas e agulhas. Pipetas e micropipetas Banhos de água e estufas Frigorífico Fluxo laminar (conveniente)
Materiais	Água destilada de qualidade Meios de cultura (bactérias) Líquido Semissólido Sólido Tubos para cultura Placas de Petri

Meios de cultura

A sobrevivência e o suporte de vida dos microrganismos dependem do fornecimento adequado de nutrientes e convenientes condições para o seu crescimento. Quanto aos nutrientes, grande parte dos microrganismos apenas necessitam de substância solúveis de baixo peso molecular, usualmente originadas pela degradação enzimática de outros nutrientes mais complexos. Uma solução contendo estes nutrientes é designada como meio de cultura. Em geral, os meios de cultura são líquidos, semissólidos ou sólidos. Um meio líquido sem agente solidificante é designado por caldo nutritivo. Um caldo nutritivo suplementado com um agente solidificante, usualmente o agar, origina um meio sólido ou semissólido. O agar é um extrato de algas marinhas, um carboidrato complexo que contém maioritariamente galactose e possui muito pouco valor nutritivo. O agar é muito adequado como agente solidificante porque se liquefaz a cerca de 100°C e solidifica a 40°C. Devido a estas propriedades, os microrganismos, em especial os patogénicos, podem ser cultivados a temperaturas da ordem dos 37°C sem receios de liquefação do meio solidificado. Um meio de cultura bem solidificado exige uma concentração de agar da ordem dos 1,5 a 1,8%. Uma concentração inferior a 1% resulta num meio semissólido.

Para além das necessidades nutritivas, vários outros fatores ambientais precisam de ser controlados para o sucesso da cultura dos microrganismos, como sejam o pH, a temperatura, o ambiente gasoso ou a pressão osmótica.



Esterilização

A esterilização é um dos pontos-chave para o sucesso do trabalho em microbiologia. Para trabalhar em condições de esterilidade é fundamental o uso de material estéril e a aplicação de técnicas adequadas. A esterilização é processo pelo qual são eliminadas todas as formas de vida de qualquer meio ou material. As principais técnicas para a esterilização de rotina em laboratório são as seguintes:

Calor	Calor seco (ar quente) 160°C a 180°C durante 1/2 hora a 3 horas Material de vidro em vazio Calor húmido (vapor) Circulação de vapor a 100°C. Esterilização intermitente (soluções termolábeis) Autoclave. Vapor sob pressão, temperaturas acima dos 100°C (meios de cultura, soluções termo-estáveis)
Filtração	Membranas filtrantes com poros de 0,05 µm a 0,8 µm Remoção de microrganismos de soluções termolábeis por filtração
Produtos químicos	Óxido de etileno Material de plástico Beta-propiolactona Tecidos vivos, materiais biológicos

Tubos de cultura e Placas de Petri

Tubos de ensaio em vidro e placas de Petri em vidro e plástico constituem os principais suportes para o desenvolvimento das culturas de microrganismos. Um meio nutritivo adequado na forma de caldo nutritivo ou de agar é usado em tubos de ensaio, enquanto nas placas de Petri apenas se usa meio sólido. Um ambiente estéril é preservado nos tubos de cultura por vários tipos de tampas. Historicamente é o rolhão de algodão, desenvolvido por Schroeder e von Dusch no século dezanove. Hoje em dia, a maior parte dos laboratórios usam tampas em forma de manga, em metal ou plástico resistente ao calor. A vantagem destas tampas reside no facto de não exigirem tanto trabalho na sua preparação e serem mais facilmente removidas e reintroduzidas nos tubos durante a manipulação. Mantem-se, contudo, a prática de proteger uma das extremidades das pipetas com rolhão de algodão cardado (hidrófobo).

As placas de Petri disponibilizam uma maior superfície para cultura e crescimento dos microrganismos. São compostas por uma base circular inferior, onde é colocado o meio e por uma tampa do mesmo formato e ligeiramente maior que se encaixa na base. Existem placas de Petri de várias dimensões para diferentes exigências laboratoriais. Na rotina são usadas placas de cerca de 10 cm de diâmetro. O meio nutritivo estéril, contendo agar, num volume de 15 a 20 mL é vertido nas placas quando ainda quente após fusão do agar e deixado arrefecer a temperatura inferior a 40°C. Depois de inoculadas com os microrganismos as placas são incubadas em posição invertida para evitar que as gotas de condensação, formadas na tampa durante o arrefecimento do agar, tombem sobre a superfície do agar.

Instrumentos para transferência de culturas

Existe a necessidade de transferir os microrganismos de um meio de cultura para outros, desde culturas de armazenamento a manutenção para culturas de análise. É o processo de subcultura que tem de necessariamente ser efetuado com técnica estéril para evitar potenciais contaminações das subculturas.

As ansas e agulhas, usualmente fabricadas com metais inertes como a platina e inseridas em cabos próprios para a manipulação, são instrumentos muito duráveis de fácil utilização. São facilmente esterilizáveis no momento da sua utilização por incineração à chama, numa posição quase vertical até o metal ficar ao rubro. Importará depois deixar arrefecer entre 10 a 20 segundos, fora da chama, mas na sua proximidade, onde a carga de microrganismos ambientais viáveis é inferior. Depois de arrefecidos, para não inativar os microrganismos a transferir, podem ser usadas para "picar" uma cultura sólida ou líquida e inocular outro meio. Uma vez esterilizada, a ansa deverá ser de imediato utilizada antes de ser de novo colocada na bancada.

As pipetas são outros dos instrumentos de transferência de culturas de uso muito generalizado. São calibradas e permitem a transferência de quantidades de culturas líquidas preestabelecidas. São de vidro ou plástico, com uma extremidade afilada e outra para a aspiração e expulsão do líquido que contenham. Podem ser esterilizadas por calor seco ou húmido, conforme o tipo de material de que são constituídas. Apesar de tradicionalmente serem instrumentos para "pipetar à boca" é proibido usar a boca para aspirar microrganismos. Existem auxiliares mecânicos disponíveis para o efeito, como peras de borracha ou corpos de seringa que se adaptam na extremidade larga da pipeta.

As pipetas Pasteur, tubos de vidro não graduados com uma das extremidades afiladas são também de uso muito frequente em trabalhos de microbiologia, também pela sua facilidade de esterilização extemporânea.



Câmaras de cultura

Das condições para crescimento dos microrganismos, uma das mais relevantes é a sua temperatura ótima de crescimento. As estufas são usadas para a manutenção da temperatura ótima dos microrganismos em crescimento durante o período de cultura. São câmaras em que a temperatura ambiente interior é controlada por termóstato, para que a mesma seja mantida dentro de limites apropriados para o crescimento celular. Usam em geral um sistema de circulação de ar aquecido e, para evitar a desidratação dos meios em incubação, deverão conter também uma fonte de vapor de água (um recipiente com água no seu interior, quando não venham preparadas para o efeito de origem).

Os banhos de água (banho-maria) com água a temperatura controlada por termóstato constituem outro dos instrumentos frequentemente empregues para a criação das condições de temperatura ótima de crescimento dos microrganismos. O íntimo contacto da água a temperatura controlada com o recipiente onde crescem os microrganismos apresenta a vantagem de permitir uma mais rápida e eficaz transferência do calor. Além disso, os banhos com agitação facilitam também o arejamento das culturas, de grande importância para o crescimento dos microrganismos aeróbios. A desvantagem do banho de água reside no facto de só poder ser usado para as culturas em meio líquido, ao contrário das estufas de ar, que servem tanto para culturas em meio líquido como em meio sólido.

Frigorífico

O frigorífico é outra das peças fundamentais em laboratório de microbiologia. O ambiente de baixa temperatura que disponibiliza é da maior relevância para a manutenção e armazenamento das culturas celulares em fase de não crescimento entre os períodos de subcultura e para a conservação dos meios esterilizados e outros reagentes. Também as soluções e compostos termolábeis têm períodos de conservação mais alargados quando armazenados a baixas temperaturas.



MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Esterilização é um processo que elimina todos os organismos vivos que se encontrem à superfície ou no interior de um material, podendo ser alcançado pela exposição do material a agentes letais físicos ou químicos ou, no caso dos líquidos, pela separação mecânica dos organismos através de filtrações. Existem muitas formas de esterilizar materiais e meios, e a sua escolha depende da natureza dos materiais a serem esterilizados bem como da disponibilidade de meios de trabalho.

A noção de esterilidade (estéril = infecundo) encontra-se frequentemente associada a duas outras: a de assepsia (ausência de sepsis = putrefação) e a de desinfecção (livrar da infeção). Estes significados literais correspondem, de facto, às noções técnicas destas terminologias. Em microbiologia referimo-nos a esterilização quando se pretende impedir a propagação de microrganismos; a assepsia quando se pretende trabalhar em ambiente desprovido de microrganismos e a desinfecção quando se aplicam técnicas destinadas a eliminar microrganismos potencialmente patogénicos para o operador.

Destas noções, a aprofundar no exercício da experimentação que se desenvolverá na disciplina, importa considerar em particular as técnicas que se utilizam em microbiologia para a eliminação de microrganismos viáveis: a esterilização.

A. Esterilização por calor húmido

O aparelho mais usado para esterilizar materiais e meios de cultura é a autoclave, com um princípio de funcionamento idêntico às panelas de pressão domésticas. As autoclaves de laboratório operam normalmente sob uma pressão de 1,02 Bar a uma temperatura de 121°C. A autoclave esteriliza a maioria dos materiais em 15-30 minutos, sendo a variação do tempo de esterilização devida à relação superfície/volume dos materiais a serem esterilizados.

Temperatura

Os endósporos das bactérias são as formas de vida mais resistentes ao calor, e a sua destruição pode ser conseguida se for aplicado vapor sobre pressão. Uma temperatura de 121°C oferece uma boa margem de segurança se for mantida durante um espaço de tempo apropriado.

Humidade

A coagulação do protoplasma bacteriano em temperaturas moderadas requer humidade e há medida que esta é removida a temperatura necessária para haver coagulação aumenta rapidamente. Se o vapor for sobreaquecido ficará mais "seco" o que ocasiona um aumento da temperatura e do tempo de exposição para a esterilização, que na situação extrema de esterilização em calor seco será de 170°C durante uma hora. Em conclusão, vapor excessivamente quente perde alguma da sua eficácia como agente letal para além de poder ser lesivo para os materiais a serem tratados.

Pressão

A pressão, nos valores usados na autoclave, por si só não exerce qualquer efeito na esterilização, sendo útil apenas para elevar a temperatura do vapor acima dos 100°C.

Tempo

O tempo é necessário para que o vapor tenha a oportunidade de penetrar e aquecer os materiais a serem esterilizados. Mesmo quando as temperaturas de esterilização são atingidas, os agentes virais ou microbianos não são todos inativados de uma vez. A velocidade de morte é uma constante a uma dada temperatura e por cada unidade de tempo de exposição ao agente letal, uma proporção que é constante para uma dada população. Normalmente demora 11 a 12 minutos a 121°C (calor húmido) para eliminar os endósporos das bactérias termofílicas, os agentes mais resistentes nas manipulações do dia-a-dia.

Purga

O ar relativamente frio na câmara de esterilização é muito mais pesado que o vapor à temperatura de esterilização. Se não for permitida a saída do ar cria-se uma estratificação na autoclave que conduz a uma falta de uniformização das temperaturas desenvolvidas. Uma vez que o ar e o vapor são lentos a misturar-se, as diferenças de temperatura entre camadas pode ser muito grande, por isso a necessidade de se substituir todo o ar por vapor de água (purga).

Natureza do carregamento

Geralmente, os materiais mais volumosos requerem mais tempo de esterilização, sendo preferível esterilizar pequenos volumes de cada vez (é mais eficaz esterilizar 5 balões de um litro que um balão de cinco litros). Os frascos devem ser tapados com algodão ou papel. Se for necessário usar tampas roscadas, estas devem ir pouco apertadas



para a autoclave de modo a permitirem a saída de ar e entrada de vapor e a não criação de grandes diferenciais de pressão que podem levar ao rebentamento dos frascos na autoclave.

B. Esterilização por calor seco

O calor seco é usado para esterilizar material de vidro, outros materiais sólidos termo-estáveis e alguns componentes de meios ou alimentos que ficariam impróprios se expostos ao vapor. Trata-se também de um dos métodos de esterilização mais usados e de muito fácil aplicação. O equipamento indispensável é apenas uma estufa de alta temperatura (160 - 200°C). Para além de ter de ser tida em conta a resistência térmica dos materiais a esterilizar por esta técnica, a outra precaução a considerar prende-se com a minimização da possibilidade de contaminar esses materiais depois da esterilização.

C. Esterilização por gases

O incremento do uso de material de plástico de utilização única como seringas, caixas de Petri, tubos de cultura, filtros, etc., levou ao desenvolvimento de uma nova forma de esterilização que usa gases tóxicos para a eliminação dos microrganismos de materiais termo sensíveis. A aplicação desta técnica requer a utilização de equipamentos próprios que forcem a circulação do gás tóxico através de todas as superfícies dos materiais, o que a torna de difícil utilização em laboratórios de tipo não industrial.

O óxido de etileno é o gás usado com maior frequência neste tipo de esterilizações. Este gás, ao contrário de muitos produtos químicos tóxicos, é pouco corrosivo e não altera os materiais a serem esterilizados, sendo facilmente removido por arejamento. As suas desvantagens incluem a necessidade de longos períodos de exposição para se obter a esterilização (várias horas), a reatividade com componentes dos meios e certos tipos de plásticos e a necessidade de equipamentos próprios e disponibilidade do gás.

D. Radiações

Alguns processos comerciais usam as radiações para a esterilização a frio de certos materiais como produtos farmacêuticos, por exemplo. Radiações ionizantes de alta energia que incluem raios gama produzidos a partir de cobalto-60 ou célio-139 e de raios catódicos produzidos em geradores e aceleradores de elétrons são as mais utilizadas.

A irradiação com luz ultravioleta não é uma forma muito satisfatória de esterilização dada a sua fraca capacidade de penetração nos materiais e produtos a esterilizar. É, contudo, de utilização frequente na diminuição do nível de contaminação de espaços confinados, como salas estéreis ou pequenos ambientes, sendo particularmente úteis também para a redução da infecciosidade viral devido às alterações induzidas no material genético das partículas virais expostas.

E. Filtração estéril

O principal método para a esterilização de líquidos que contenham componentes termo sensíveis como vitaminas, proteínas e antibióticos, por exemplo, é a filtração. Tradicionalmente os microbiologistas esterilizavam estes produtos recorrendo a filtros feitos a partir de terra de diatomáceas e fibras de asbesto, previamente esterilizados em autoclave. Presentemente estes filtros foram substituídos por filtros de acetato de celulose ou policarbonatos nos quais os tipos de poros desenvolvidos permitem filtrações com elevados graus de precisão. Existem atualmente disponíveis no mercado filtros de vários poros e capacidades filtrantes. Os mais frequentes e, por isso, mais acessíveis são filtros de poros de 0,45 µm ou 0,2 µm de diâmetro, que retêm os microrganismos presentes nas soluções.

Para esterilizar uma solução por filtração, não há mais que passar essa solução através de um destes filtros pela aplicação de uma pressão positiva no líquido a filtrar (filtros de seringa, por exemplo) ou na rarefação do ar no contentor que recebe o filtrado. Em qualquer dos casos esta técnica requer a recolha do filtrado em condições de assepsia para impedir a contaminação do líquido esterilizado.

Salvo raras exceções, a filtração estéril não retém as partículas virais. Não podendo ser considerado como método de "esterilização de vírus". A filtração estéril é mesmo uma técnica frequentemente usada em virologia para a purificação de suspensões virais por eliminação de bactérias potencialmente contaminantes.

F. Desinfetantes e antissépticos

Múltiplos reagentes químicos são diariamente utilizados para controlo da disseminação de microrganismos. Os produtos usados na "limpeza" de utensílios diversos, frequentemente demasiado tóxicos para ser usados diretamente no Homem, são chamados de desinfetantes. Os produtos que aplicamos na pele, com o mesmo objetivo de eliminar eventuais microrganismos, são antissépticos. Particularmente eficaz e muito útil no laboratório, para eliminação de vírus e microrganismos é a solução de hipoclorito de sódio (lixívia) com que se tratam os materiais de laboratório após exposição a agentes infecciosos.



PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

1. PIPETAGENS, SOLUÇÕES E DILUIÇÕES

Introdução

O rigor nas diluições a efetuar com alguns materiais biológicos e reagentes, no contexto de vários dos trabalhos experimentais que aqui se incluem, é crítico e fundamental para o sucesso e para a fiabilidade dos resultados.

Porque se observa com frequência alguma inabilidade dos estudantes para a manipulação adequada das micropipetas e para um raciocínio operacional tanto das diluições expressas como potências de 10 como na forma de preparar soluções tituladas, introduz-se este trabalho preliminar.

Material e reagentes

- Solução concentrada de azul-de-metileno
- Soro fisiológico (salino)
- Micropipetas diversas
- Tubos de ensaio
- Espectrofotómetro

Procedimento (por grupo)

Diluições decimais

1. Marque microtubos (de 1 a 10)
2. A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solvente (mL)		1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Corante (µL)	1500	150								
Solução precedente (µL)			150	150	150	150	150	150	150	
Diluição (10 ^x)										

3. Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
4. Registe as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos
5. Determine a absorvência das soluções a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, usando a mesma cuvete).
6. Elabore um gráfico com os resultados obtidos

Diluições centesimais

7. Marque 8 microtubos (de 1 a 8)
8. A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Solvente (mL)		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Corante (µL)	5000	50						
Solução precedente (µL)			50	50	50	50	50	-
Diluição (10 ^x)								



9. Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
10. Registe as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos
11. Determine a absorvência das soluções a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, usando a mesma cuvete).
12. Elabore um gráfico com os resultados obtidos

Diluições de três em três

1. Marque 12 tubos de ensaio (de 1 a 12)
2. A partir da solução concentrada de azul-de-metileno proceda, às seguintes diluições sequenciais:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Solvente (mL)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Corante (mL)	5,0	2,5										
Solução precedente (mL)			2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
Diluição (10 ^x)												

3. Completar o preenchimento da tabela acima com as diluições em cada tubo.
4. Registe as intensidades de cor observáveis nos diferentes tubos
5. Determine a absorvência das soluções preparadas a 600-660 nm (ler da mais diluída para a mais concentrada, usando a mesma cuvete).
6. Elabore um gráfico com os resultados obtidos.

TPC

Diluições milésimas

Estabeleça o protocolo para a realização de um exercício idêntico aos anteriores, mas com diluições milésimas.

Diluição única

A partir da solução concentrada de azul-de-metileno como procederá para a preparação de 5 mL de cada uma das seguintes diluições:

- Diluição de 5×10^2
- Diluição de 5×10^{-2}

Preparação de soluções

Pretendendo-se obter 100 mL de cada uma das soluções que se listam, indique as quantidades de produtos a misturar para a sua preparação no laboratório:

- NaOH 0,1 N
- SO_4H_2 0,1 N
- NaCl 0,1 M
- NaCl 100 mM
- Glicerol 10% (fórmula $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)
- Glucose 10% (fórmula $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
- Etanol 70% (fórmula $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$)



Registo de observações e Resultados

PIPETAGENS E DILUIÇÕES

Operador: _____ Data: ____/____/____

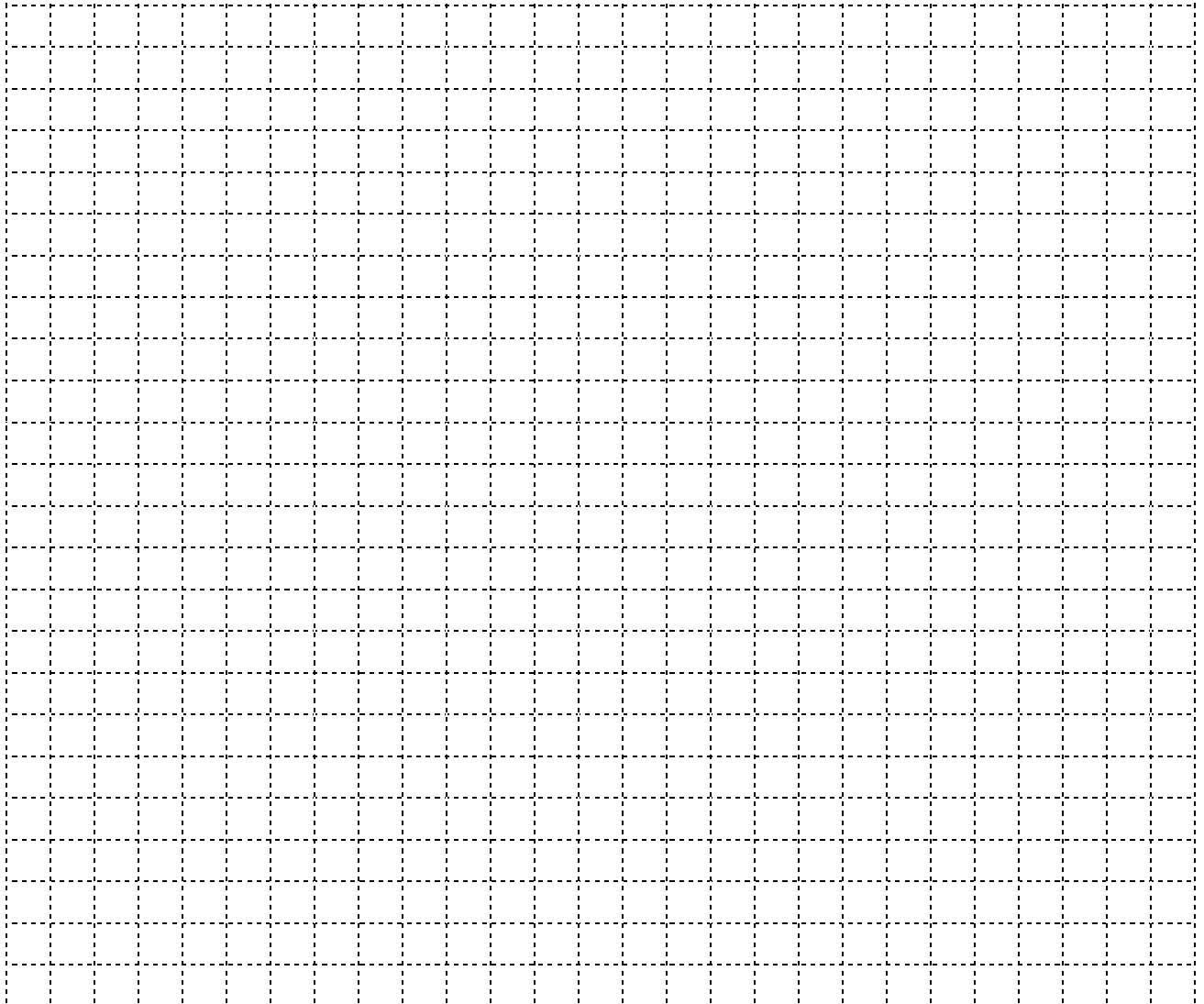
Diluições decimais	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				
	7				
	8				

Diluições centesimais	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				
	7				
	8				

Diluições de três em três	Tubo	Amostra	DO _{600nm} / mL	Concentração calculada	Observações
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				
	7				
	8				
	9				



Gráficos



Notas:



SOLUÇÕES

Operador: _____ Data: ____/____/____

	Componentes	Peso / volume
Diluição 5 X 10 ²		
Diluição 5 X 10 ⁻²		
NaOH 0,1 N (100 mL)		
SO ₄ H ₂ 0,1 N (100 mL)		
NaCl 0,1 M (100 mL)		
NaCl 100 mM (100 mL)		
Glicerol 10% (100 mL)		
Glucose 10% (100 mL)		
Etanol 70% (100 mL)		

Notas:



3. VERIFICAÇÃO E CALIBRAÇÃO DE PIPETAS

Introdução

O rigor nas diluições a efetuar com alguns materiais biológicos e reagentes, no contexto de vários dos trabalhos experimentais que aqui se incluem, é crítico e fundamental para o sucesso e para a fiabilidade dos resultados.

A utilização frequente das pipetas disponíveis no laboratório por estudantes sem experiência leva a utilizações incorretas donde resulta que alguns dos volumes indicados nos visores não coincidam com as quantidades medidas. Neste contexto é importante conhecer a forma de calibrar as pipetas a usar.

Material e reagentes

- Água destilada
- Micropipetas diversas
- Microtubos, copos de boémia
- Balança de precisão

Procedimento (por grupo)

Ajuste de volume (5 μ L)

1. Utilize uma pipeta de 20 μ L
2. Ajuste o indicador de volume aos 5 μ L
3. Pipete, na balança, para tubo calibrado 5 μ L
4. Observe o peso indicado
5. Se superior aos 5 mg, reduza o volume indicado na pipeta e repita 3. e 4.
6. Se inferior aos 5 mg, aumente o volume indicado na pipeta e repita 3. e 4.
7. Quando a quantidade de água destilada pesada for de 5 mg, anote a indicação de volume que, na pipeta, corresponde aos 5 μ L.

Ajuste de volume (50 μ L)

1. Utilize uma pipeta de 200 μ L
2. Repita os passos do procedimento anterior (de 1. a 7.) para a massa de 50 mg (correspondente a 50 μ L)

Ajuste de volume (500 μ L)

1. Utilize uma pipeta de 1000 μ L
2. Repita os passos do procedimento inicial (de 1. a 7.) para a massa de 500 mg (correspondente a 500 μ L)

Calibração de pipeta (200 μ L)

1. Meça, na balança, um volume de 10 μ L para copo tarado. Anote o peso
2. Repita mais duas vezes esta determinação
3. Repita os pontos 1 e 2 para os volumes de 20 μ L; 50 μ L; 100 μ L; 150 μ L e 200 μ L
4. Faça médias de cada conjunto de três pesagens homólogas
5. Desenhe o gráfico de calibração da pipeta, fazendo corresponder os volumes indicados no visor com os pesos avaliados.

NB

Os procedimentos para outros volumes ou outras pipetas são idênticos.



REGISTO DE OBSERVAÇÕES E RESULTADOS

CALIBRAÇÃO DE PIPETAS

Operador: _____ Data: ____/____/____

Calibração de pipeta 20 μL	Volume	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Média	Observações
	1 μL					
	2 μL					
	5 μL					
	10 μL					
	15 μL					
	20 μL					

Calibração de pipeta 200 μL	Volume	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Média	Observações
	10 μL					
	20 μL					
	50 μL					
	100 μL					
	150 μL					
	200 μL					

Calibração de pipeta 1000 μL	Volume	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Média	Observações
	50 μL					
	100 μL					
	200 μL					
	500 μL					
	750 μL					
	1000 μL					



4. CULTURA DE BACTÉRIA RECOMBINANTE (*E.COLI*)

Material e Reagentes

- Bactéria recombinante
- LB 10X:
 - Bacto-triptona 100 g
 - Extrato de levedura 50 g
 - NaCl 100 g
 - H2O destilada até 1000 mL
pH 7,5.
- Autoclavar. Conservar estéril a 4°C.
- Diluir extemporânea e esterilmente a 1:10 com água estéril.
- Ampicilina 1000X
50 mg/mL em água.
- Esterilizar por filtração, conservar a -20°C

Protocolo Experimental

1. Preparar 50 mL de meio LB 1X contendo ampicilina (50 µg/mL).
2. Inocular com bactéria contendo o plasmídeo a preparar.
3. Incubar 37°C durante uma noite sob agitação.
4. Registrar o crescimento da bactéria



5. PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO - LISE ALCALINA

Material e Reagentes

— Bactéria recombinante	— RNase mix:
— LB 1X com ampicilina.	RNase A 40 µl
— Lisozima (pó)	TE pH 8,0 10 mL
— Isopropanol	— Solução I:
— 5 M NaCl	25 mM Tris-HCl pH 8,0
— Etanol puro e 70 %	50 mM Glucose
— TE pH 8,0	10 mM EDTA
10 mM Tris-HCl pH 8,0	— Solução II:
1 mM EDTA)	0,2 N NaOH
— Pronase 20 mg/mL em água	1 % SDS
Auto-digerida durante 2 horas a 37°C.	— Solução III:
Conservar a -20°C	5 M KOAc 60 mL
— Pronase Mix:	Ac. acético glacial 11,5 mL
Pronase 50 µL	H ₂ O destilada 28,5 mL
10 % SDS 86 µl	pH 4,8
H ₂ O 860 µl	— Fenol:clorofórmio:
— RNase A 10 mg/mL em:	Fenol destilado 50 mL
10 mM Tris-HCl pH 7,5	Clorofórmio 50 mL
15 mM NaCl	Alcool isoamílico 1 mL
Incubada por 15 minutos a 100°C e	8-hidroxiquinoleína 0,1 g
arrefecimento lento. Conservar a -20°C	TE pH 8,0 15 mL
	(usar apenas a fase orgânica, de cor amarela, não agitar)

Protocolo Experimental

1. Usar 20 mL de cultura saturada de bactéria recombinante.
2. Centrifugar 4.000 X G durante 15 minutos a 4°C.
3. Lavar o sedimento de bactérias com 5 mL de LB.
4. Decantar e escorrer o sobrenadante.
5. Ressuspender o sedimento com 2 mL de Solução I.
6. Adicionar 10 mg de lisozima. Misturar.
7. Repousar 10 minutos à temperatura ambiente.
8. Adicionar 4 mL de Solução II.
9. Misturar por inversão.
10. Repousar 10 minutos no gelo.
11. Adicionar 3 mL de Solução III.
12. Misturar. Repousar 10 minutos no gelo.
13. Centrifugar 7.000 X G durante 30 minutos a 4°C.
14. Filtrar o sobrenadante por gaze hidrófila.
15. Adicionar 0,6 volumes de isopropanol.
16. Repousar 10 minutos à temperatura ambiente.
17. Centrifugar 7.000 X G durante 30 minutos.
18. Decantar.
19. Lavar o precipitado com etanol a 70%.
20. Lavar o precipitado com etanol a 96%.
21. Secar o precipitado.
22. Dissolver com 500 µL de RNase-mix.
23. Incubar a 37°C durante 60 minutos.
24. Adicionar 100 µL de Pronase-mix.
25. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
26. Extrair 2 vezes com fenol:clorofórmio (igual volume).
27. Tomar a fase aquosa, sem interfase.
28. Adicionar 0,04 vol. de 5 M NaCl (24 µL) e 2 vol. de etanol puro (1,2 mL).
29. Precipitar durante uma noite a -20°C.
30. Recuperar DNA plasmídico por centrifugação (7.000 X G durante 30 minutos).
31. Dissolver com 50 µL de TE pH 8,0.
32. Avaliar a concentração de uma alíquota por leitura da DO a 260 nm (50 µg/mL = 1 UDO)



6. PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO - MINIPREP

Material e Reagentes

(mesmos da técnica da Lise Alcalina)

Protocolo Experimental

1. Inocular 5 mL de LB com cada colónia a analisar.
2. Incubar a 37°C durante uma noite com agitação.
3. Pipetar 2 x 1,5 mL de suspensão para dois microtubos, da mesma cultura
4. Centrifugar 1 minuto na microcentrífuga. (sobrenadante transparente)
5. Decantar e escorrer completamente o sobrenadante.
6. Ressuspender o sedimento do primeiro tubo com 100 µL de Solução I, homogeneizando com a micropipeta
7. Transferir a suspensão para o segundo tubo e ressuspender o sedimento, homogeneizando com a micropipeta
8. Adicionar 200 µL de Solução II
9. Misturar por inversão.
10. Adicionar 150 µL de Solução III
11. Misturar por inversão
12. Agitar fortemente à mão para partir DNA cromossomal.
13. Centrifugar 5 minutos na microcentrífuga.
14. Pipetar 400 µL de sobrenadante límpido (sem interface nem precipitado sobrenadante).
15. Adicionar 250 µL de isopropanol.
16. Repousar 10 minutos à temperatura ambiente.
17. Centrifugar 20 minutos na microcentrífuga.
18. Decantar.
19. Lavar o precipitado com etanol puro.
20. Centrifugar 5 minutos na microcentrífuga, se o sedimento tiver sido descolado do tubo ou não for visível.
21. Decantar, escorrer e secar.
22. Dissolver com 50 µL de RNase-mix ou TE
23. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
24. Usar 10 µL para digestão com enzima de restrição
25. Conservar remanescente congelado a -20°C em tubo devidamente marcado



7. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Material e Reagentes

- Solução de DNA a analisar
- Enzimas de restrição:
 - Bam HI (10 U / μ L)
 - Eco RI (20 U / μ L)
 - Sal I (20 U / μ L)
- Fenol:clorofórmio
- Tampão de enzima 10X (do fabricante)
 - Exemplo de tampão:
 - 1M KOAc
 - 250 mM Tris/Acetato, pH 7,6
 - 100 mM MgOAc
 - 5 mM β -Mercaptoetanol
 - 100 μ g/mL BSA

Protocolo Experimental

1. Em microtubo, adicionar sequencialmente:
 - a. H₂O estéril 20,5 μ L (ad. 25 μ L final)¹
 - b. Solução de DNA 1 μ L (1 μ g)
 - c. T. enzima 10X 2,5 μ L (1 X final)
 - d. Solução de enzima 1 μ L (10 Unidades)
2. Misturar no vortex.
3. Centrifugar brevemente para levar tudo para o fundo do tubo.
4. Incubar a 37°C durante 1 hora.
5. Desproteínizar pelo fenol:clorofórmio:
 - a. Adicionar 25 μ L de fenol:clorofórmio.
 - b. Misturar bem.
 - c. Centrifugar 1 minuto na microcentrífuga.
 - d. Pipetar fase aquosa para novo tubo.
6. Tomar 10 μ L para análise em gel.

¹ A quantidade de água a adicionar dependerá do volume de solução de DNA e será a necessária para completar os 25 μ L



8. ANÁLISE DE DNAs EM GEL DE AGAROSE

Material e Reagentes

- Solução de DNA a analisar
- DNA marcador: lambda X Bst EII
- TBE 10X
 - 890 mM Tris
 - 890 mM Ácido bórico
 - 20 mM EDTA
 - pH 8,0
- Agarose média ou baixa EEO (Sigma Tipo II ou V)
- Brometo de etídio 10 mg/mL
- Dye-DNAs (Indicador de Migração):
 - 25 % Ficoll 400
 - 0,25 % Orange G

Protocolo Experimental

1. Preparação do gel
 - a. Preparar o molde para o gel (com o pente inserido)
 - b. Pesar a agarose necessária para balão apropriado ao volume final (marcar no balão o volume final pretendido)
 - c. Fundir a agarose (0,7%) em cerca de 90 % volume final, com água destilada
 - d. Arrefecer a cerca de 50°C.
 - e. Adicionar 5 % de TBE 10X (0,5 X final).
 - f. Adicionar 0,005 % Brometo de etídio (0,5 µg/mL final)
 - g. Completar o volume final com água destilada
 - h. Misturar e verter no molde
 - i. Deixar solidificar
2. Colocar o gel no aparelho, “apenas” submerso em TBE 0,5X.
3. Aplicar as amostras de DNA contendo 10 a 20% de Dye-DNAs.
4. Aplicar uma amostra de DNA marcador (0,5 a 1 µg)
5. Proceder à separação eletroforética (75 V), até conveniente migração.
6. Visualizar no transiluminador sob luz UV (300 a 320 nm).
7. Observar o gel
8. Registrar as bandas (desenhar)
9. Fotografar o gel com filtro vermelho de gelatina.



9. PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

Material e Reagentes

- E. Coli XL1B
- LB 10X
- Tetraciclina 1000X:
12,5 mg/mL em 50 % etanol. Conservar a -20°C.
- 100 mM CaCl₂ (filtração estéril)
- Glicerol 50 % (v/v) (filtração estéril)

Protocolo Experimental

1. Inocular 10 mL de LB 1X (Tetraciclina opcional) com colônia de E.coli XL1B (ou equivalente).
2. Incubar a 37°C sob forte agitação, durante uma noite.
3. Usar 2 mL da cultura saturada para inocular 10 mL de LB pré-aquecido a 37°C.
4. Incubar a 37°C sob forte agitação até 0,2 UDO a 600 nm (cerca de 2×10^7 bactérias/mL) - 2 a 4 horas.²
5. Arrefecer os 10 mL da cultura durante 20 minutos, em banho de gelo.
6. Centrifugar 3.000 X G durante 15 minutos a 4°C.
7. Decantar.
8. Ressuspender o sedimento de bactérias em 5 mL de 100 mM CaCl₂.
9. Repousar 20 minutos no gelo.
10. Centrifugar 3.000 X G durante 10 minutos a 4°C.
11. Decantar.
12. Ressuspender o sedimento de bactérias com 2 mL de 100 mM CaCl₂.
13. Adicionar 20% de glicerol a 50% (10% final)
14. Repartir alíquotas de 500 µL por microtubos
15. Repousar durante 1 hora a 4°C
16. Conservar congelado a -80°C
17. Testar a eficácia de transformação com 50 µL de bactérias competentes³

² Dadas as limitações de tempo, dever-se-á utilizar a suspensão bacteriana fornecida e iniciar o processo a partir do ponto 5) do protocolo.

³ As bactérias competentes poderão ser usadas, sem congelação, imediatamente antes da adição do glicerol.



10. TRANSFORMAÇÃO

Material e Reagentes

- Bactérias competentes
- Solução de DNAs plasmídico (pDNA)

- LB 10X
- Ampicilina 1000 X
- Placas de Agar/LB/Amp:
 - Bacto-Agar 7.5 g
 - LB 10X 50 mL
 - H₂O até 500 mL

Autoclavar, Deixar arrefecer a 50°C. Adicionar 500 µL de Ampicilina 1000X. Repartir de imediato pelas placas de petri.

Protocolo Experimental

1. Pipetar para um microtubo 5 µL de solução de pDNA.
2. Pipetar para outro microtubo 5 µL de solução de pDNA diluída a 1:100.
3. Adicionar 50 µL de bactérias competentes a cada tubo.
4. Homogeneizar no vortex.
5. Repousar 10 minutos no gelo.
6. Incubar a 37°C durante 5 minutos.
7. Adicionar 1 mL de meio LB pré-aquecido (sem antibiótico).
8. Incubar a 37°C durante 1 hora.
9. Centrifugar 1 minuto na microcentrífuga (sobrenadante límpido).
10. Decantar.
11. Ressuspender as bactérias em 200 µL de meio LB.
12. Espalhar uniformemente sobre placa de petri com Agar/LB/Amp até secar.
13. Incubar a 37°C em estufa durante uma noite.
14. Observar crescimento.



11. SELEÇÃO DE RECOMBINANTES

Depois de efetuado uma transformação, vários tipos de bactérias podem surgir na placa de petri. Sendo apenas interessantes as bactérias transformadas com o DNA pretendido, é necessário eliminar eventuais contaminantes não relacionados, bactérias não transformadas ou transformadas com outros DNAs

Material e Reagentes

- Placas de petri com colónias transformadas isoladas
- Tubos de ensaio com 5 mL de LB/Amp
- Palitos esterilizados

Protocolo Experimental

1. Identificar uma dúzia de colónias na placa com as bactérias transformadas
2. Marcar os tubos de ensaio para identificação das bactérias a analisar
3. Picar cada colónia individualmente com um palito (Não remover a totalidade da colónia)
4. Mergulhar o palito no respetivo tubo de ensaio
5. Incubar a 37°C em estufa durante uma noite, sob agitação.

6. Observar a turvação da suspensão bacteriana.
7. Tomar de cada cultura 1,5 mL para tubo eppendorf
8. Extrair o DNA plasmídico pela técnica da MINIPREP
9. Analisar pelo processo adequado



12. ANÁLISE DE PROTEÍNA RECOMBINANTE – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO

A partir de colônia de bactéria transformada, que exprima uma proteína recombinante, extrair e analisar em gel de eletroforese os perfis proteicos da bactéria induzida e não induzida.

O subclone pCS938.15 é um sistema de expressão em E.coli que contem a sequência do gene B646L inserida a jusante do promotor Lac Z e alinhada com o codão de iniciação ATG. Este sistema induzido com um análogo da lactose, o IPTG, sintetiza uma proteína com peso molecular correspondente à p73 fundida com a enzima Galactosidase (170 KDa).

Material e Reagentes

- Bactéria recombinante (pCS938.15)
- LB/Amp
- IPTG 100 mM

Protocolo experimental

1. Ressuscitar cultura de bactéria recombinante em meio de cultura LB/Amp/Agar (sólido)
2. Expandir uma colônia em 10 mL de meio LB/Amp (líquido)
3. Incubar 37°C, sob agitação, durante uma noite
4. Adicionar 4 mL de LB/AMP pré-aquecido a 2 erlenmeyers esterilizados
5. Inocular 1 mL de cultura bacteriana a cada erlenmeyer
6. Adicionar a um dos tubos (INDUZIDO) 50 µL de IPTG 100 mM
7. Incubar as duas culturas a 37°C durante 30 minutos, sob agitação
8. Tomar, de cada cultura, para 2 microtubos, 1 mL de suspensão (4 tubos)
 - a. Centrifugar 2 minutos
 - b. Decantar e rejeitar sobrenadantes
 - c. Congelar -20°C um tubo de bactéria induzida e outro de bactéria não induzida
9. Ressuspender os sedimentos dos outros tubos com 1,5 mL de salino
 - a. Avaliar e registrar a DO a 550 nm



13. ANÁLISE DE PROTEÍNA RECOMBINANTE – PAGE

Material e Reagentes

- Extratos de bactéria recombinante (pCS938.15) com expressão induzida e não induzida
 - Acrilamida a 50% (esterilizada por filtração)
 - Bisacrilamida a 1,25%
 - Tris 1,5M pH 8.8
 - Tris 1,5M pH 6.8
 - SDS 10%
 - TEMED 10%
 - Persulfato de amônio 10% (extemporâneo)
 - Tampão Laemmli 10X:
 - Tris 250 mM
 - Glicina 1,92 M
 - SDS 1%
 - pH 8.3
 - Tampão de eléctrodos:
 - T. Laemmli 1X
 - Tampão de amostra (2X):
 - Tris 125 mM pH 6.8
 - SDS 4%
 - Glicerol 20%
 - BME 10%
 - Azul de bromofenol 0,2%
 - Solução de coloração:
 - Azul de Coomassie 0,2%
 - Metanol 50%
 - Ácido acético glacial 10%
 - Solução de diferenciação:
 - Metanol 10%
 - Ácido acético glacial 10%

Protocolo Experimental

Preparação do gel

1. Montar o molde para o gel
2. Preparar gel de separação – 10% acrilamida (em erlenmeyer):
 - a. Acrilamida 50% 12 mL⁴
 - b. Bisacrilamida 1,25% 9 mL
 - c. Tris 1,5M pH 8.8 15 mL
 - d. SDS 10% 600 µL
 - e. H₂O 22,8 mL
 - f. TEMED 10% 300 µL
 - g. Persulfato de amônio a 10% 300 µL
3. Homogeneizar sem introduzir muito ar. Verter no molde.
4. Adicionar pequeno volume de água na superfície do gel (sem misturar)
5. Deixar polimerizar (20 a 30 min)
6. Preparar gel de “stacking” (em erlenmeyer):
 - a. Acrilamida 50% 750 µL
 - b. Bisacrilamida 1,25% 800 µL
 - c. Tris 1,5M pH 6.8 625 µL
 - d. SDS 10% 75 µL
 - e. H₂O 5,1 mL
 - f. TEMED 10% 75 µL
 - g. Persulfato de amônio a 10% 75 µL
7. Remover a água sobrenadante do gel de separação
8. Colocar o pente. Verter o gel de stacking no molde
9. Deixar polimerizar (10 a 20 minutos)

⁴ Se as soluções disponíveis de acrilamida e bisacrilamida não tiverem as concentrações que se indicam, as quantidades a usar deverão ser calculadas por forma a que seja usada a mesma quantidade relativa da substância. A compensação do volume final dever-se-á fazer na quantidade de água a usar.



Electroforese

1. Montar o gel na tina de eletroforese
2. Encher as câmaras dos elétrodos com o tampão de eletroforese
3. Preparar as amostras de proteínas:
4. Medir, para microtubo, 50 μ L de solução de proteína
5. Adicionar 50 μ L de tampão de amostra
6. Homogeneizar
7. Incubar em banho de água fervente durante 10 minutos
8. Aplicar 50 μ L de amostra por poço do gel, registrando a localização de cada amostra
9. Ligar a corrente elétrica (70 volts) até ao indicador de migração se posicionar no fim do gel (5 horas)
10. Desmontar o sistema recuperando o gel

Coloração das proteínas

1. Mergulhar o gel em abundante solução de coloração
2. Corar durante 30 minutos com agitação
3. Passar o gel para solução de diferenciação.
4. Mergulhar em abundante solução de diferenciação
5. Diferenciar com agitação até contraste conveniente (mudar solução quando necessário)
6. Observar em transiluminador do visível
7. Registrar os resultados (desenhar as bandas). Fotografar



14. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Material e Reagentes

- Amostra de proteína a testar (1 mg/mL)
- Coluna de cromatografia de 30 cm X 1 cm
- Agar lavado
- Soro fisiológico (SF)
- Microtubos eppendorf
- Azida de sódio 10 %

Procedimento experimental

1. Preparar a coluna:
 - a. Homogeneizar a suspensão de agar lavado com SF
 - b. Com pipeta invertida encher a coluna (~20 cm), sem deixar secar a superfície
2. Lavar a coluna com três volumes de SF
3. Deixar escoar a quase totalidade do SF sobrenadante (não deixar secar)
4. Aplicar 2 mL de amostra de proteína
5. Deixar escoar a quase totalidade da amostra (não deixar secar)
6. Carregar a coluna com SF permanente
7. Armazenar, se necessário, sob SF contendo azida de sódio a 0,02%
8. Recolher amostras de 1,5 mL (20 tubos). Marcar microtubos
9. Revelar a presença da proteína nas frações recolhidas pela técnica de “Dot-Blot”
10. Ler a DO de todas as amostras recolhidas a 280 nm. Registrar
11. Avaliar a concentração proteica de cada amostra
12. Estabelecer em gráfico a curva da eluição da proteína

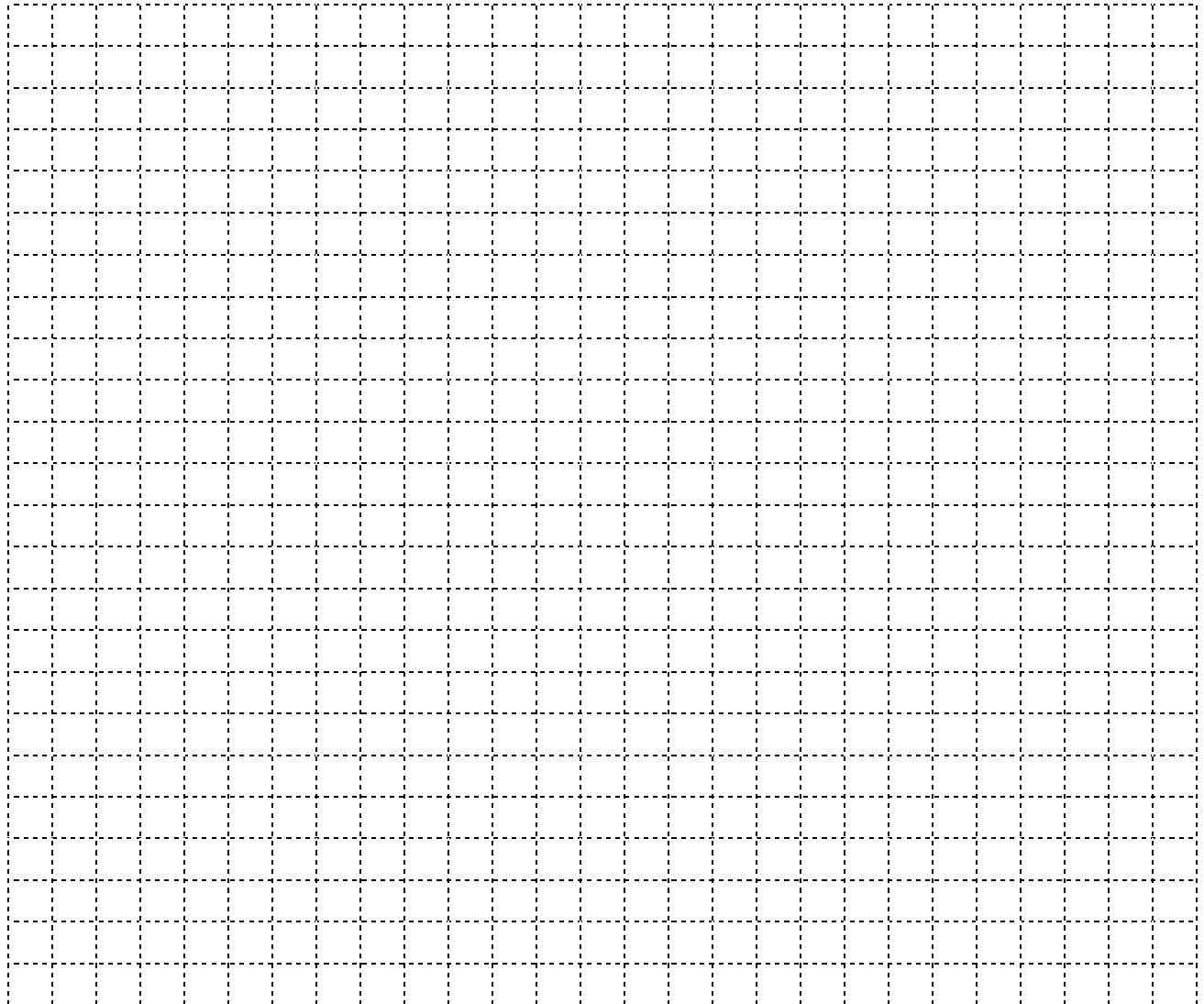


Registo de observações e Resultados

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Operador: _____ Data: ____/____/____

Gráficos



Notas:



15. DOT BLOT (PROTEÍNAS)

Material e Reagentes

- Amostra de proteína a testar
 - Lisozima 10 mg/ml
- Papel de filtro 3MM
- Solução corante de proteínas
 - Azul de Coomassie 0,2%
 - Metanol 50%
 - Ácido acético glacial 10%
- Solução diferenciadora
 - Metanol 50%
 - Ácido acético 10%

Procedimento experimental

1. Preparar diluições da amostra

	1	2	3	4	5	6
Solução de proteína	30 µl					
Diluição anterior	-	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	
SF	-	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Concentração proteica (mg/ml)						
RESULTADO (+/-)						

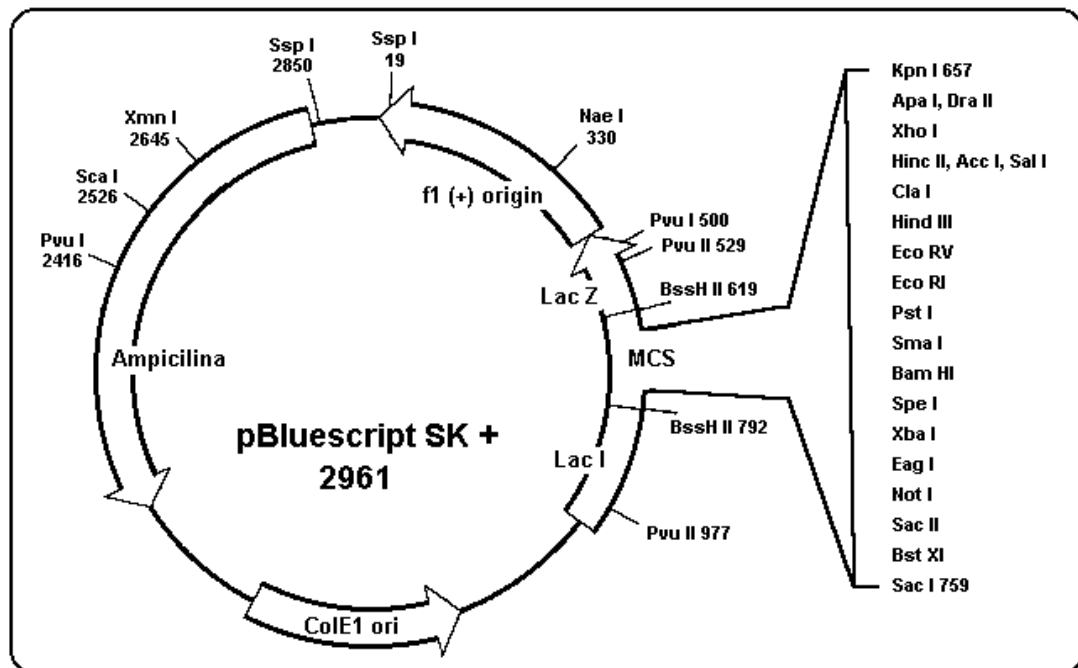
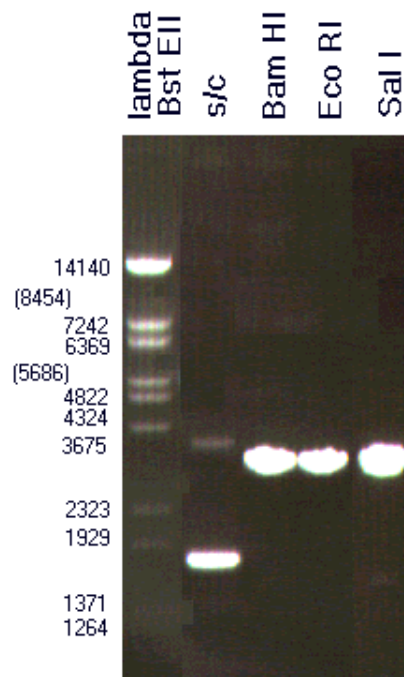
2. Cortar fragmento de papel 3MM 2 X 5 cm
3. Marcar posições da amostra com lápis de carvão (distâncias de 0,5 cm)
4. Aplicar 2 µl de cada diluição de amostra, em sequência
5. Deixar secar ao ar
6. Preparar corante e diferenciador
 - a. 10 ml de corante em placa de petri
 - b. 2 X 10 ml de diferenciador em 2 placas de petri
7. Colocar o papel na solução corante
8. Corar durante 5 minutos com agitação intermitente
9. Descorar durante 2 X 5 minutos com agitação intermitente
10. Analisar e registrar os resultados

Observações

ANEXOS

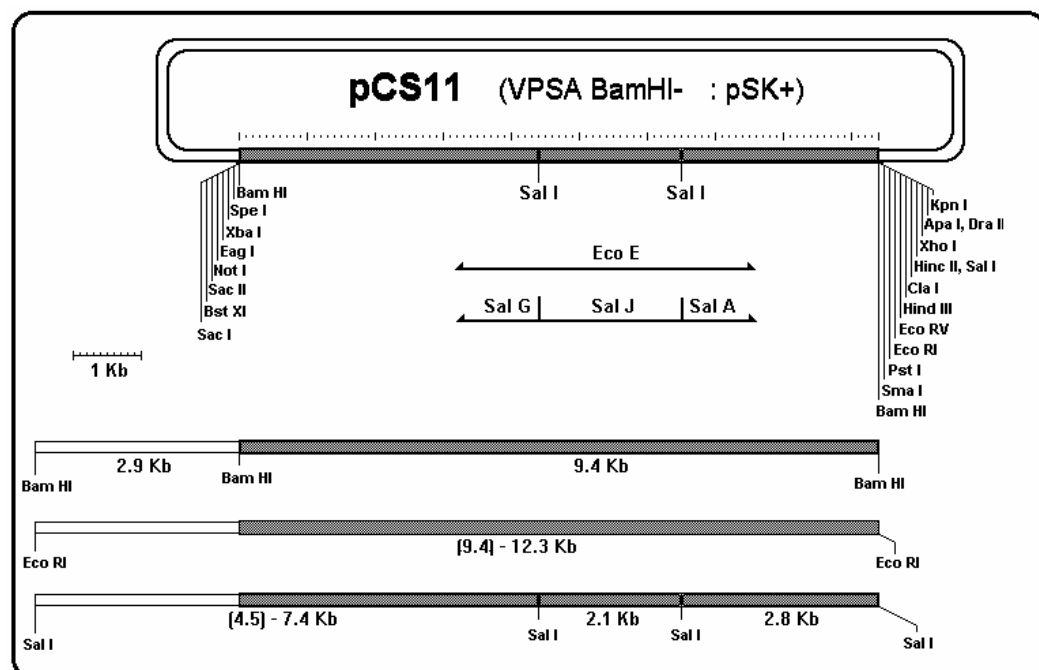
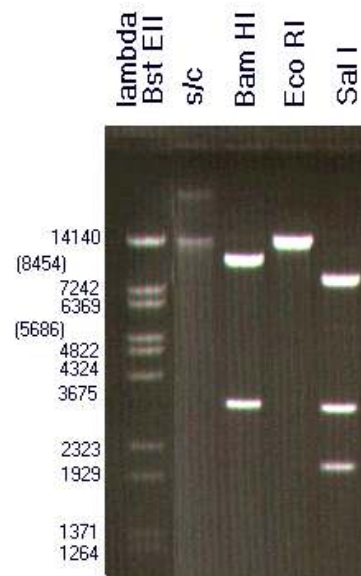
Plasmídios susceptíveis de ser usados nos trabalhos laboratoriais.

Plasmídio pSK+



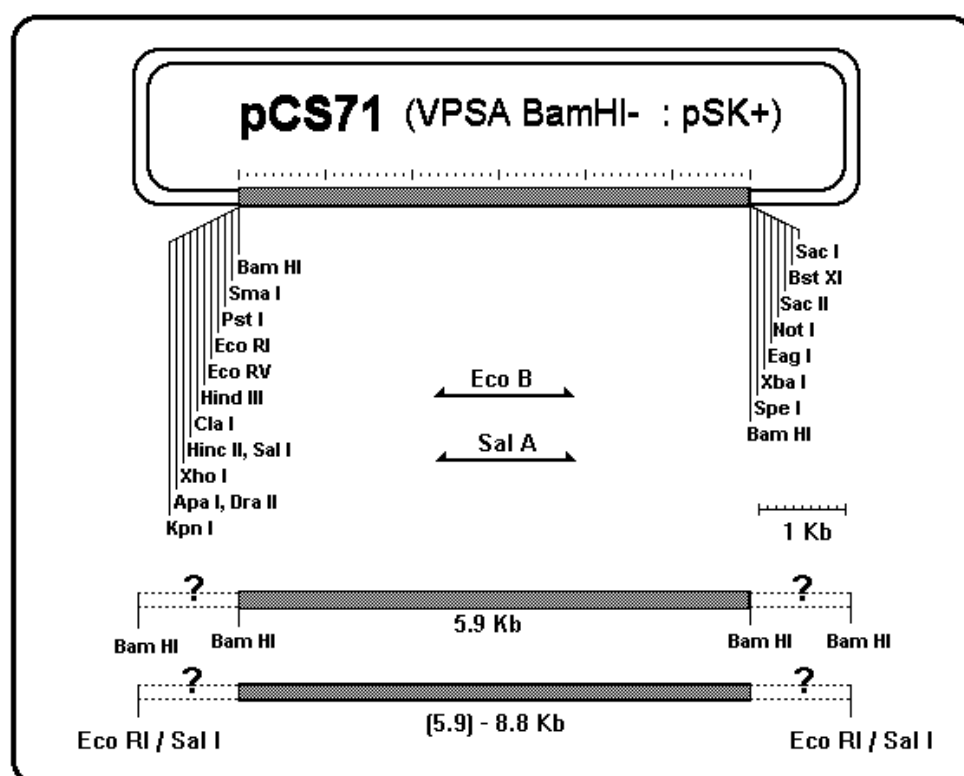
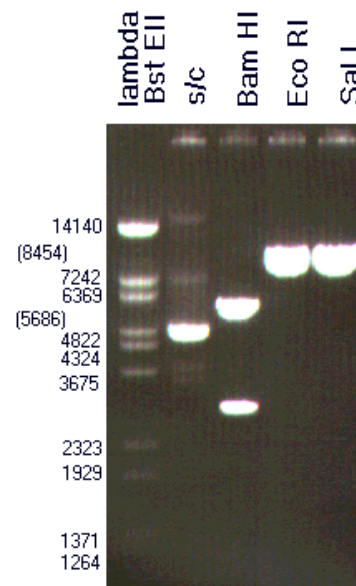


Plasmídio pCS11



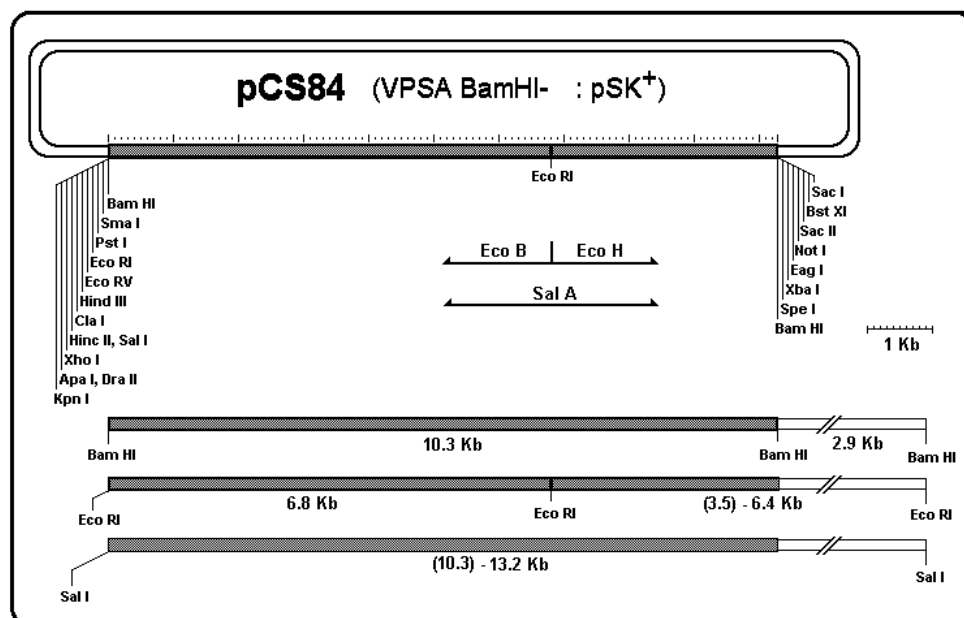
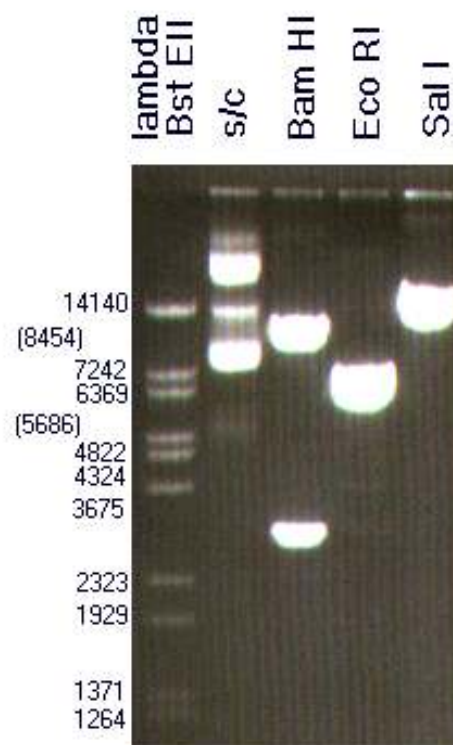


Plasmídio pCS71





Plasmídio pCS84





Enzimas de Restrição

Características das enzimas de restrição disponíveis para a realização dos trabalhos laboratoriais.

BamH I

5' ... G^AG A T C C ... 3'
3' ... C C T A G^AG ... 5'

Origem: *Bacillus amyloliquefaciens* H

Reação Enzimática:

- 150 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM dithiothreitol
- 100 µg/mL BSA.
- pH 7.9
- Incubação a 37°C.

Inativação pelo calor: Não

Eco RI

5' ... G^AA A T T C ... 3'
3' ... C T T A A^AG ... 5'

Origem: *E. coli* RY 13

Reação Enzimática:

- 50 mM NaCl
- 100 mM Tris-HCl
- 10 mM MgCl₂
- 0.025% Triton X-100
- pH 7.5
- Incubação a 37°C

Inativação pelo calor: 65°C X 20 minutos

Sal I

5' ... G^AT C G A C ... 3'
3' ... C A G C T^AG ... 5'

Origem: *Streptomyces albus* G

Reação Enzimática:

- 150 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM dithiothreitol
- 100 µg/mL BSA
- pH 7.9
- Incubação a 37°C.

Inativação pelo calor: 65°C X 20 minutos

