



Universidade
Católica de Brasília

MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ESPAÇO DE APRENDIZAGENS PRÁTICAS-PROFISSIONAIS – EAP’ S

Brasília - DF
2022

APRESENTAÇÃO

O laboratório está preparado para desenvolver projetos nas áreas de Biologia Celular e Molecular ou como multidisciplinar. Este espaço é utilizado para aulas práticas que atendem aos cursos de Biologia, Biotecnologia, Agronomia, Nutrição, Odontologia, Enfermagem, Biomedicina, Farmácia, Fisioterapia, Medicina, Medicina Veterinária e semipresenciais. A estrutura do laboratório permite:

- Crescimento de microrganismos;
- Extração, purificação e caracterização de proteínas;
- Extração de DNA e PCR (reação em cadeia da polimerase);
- Eletroforese de DNA e proteínas;
- Choque térmico bacteriano;
- Atividade enzimáticas;
- Detecção de biomoléculas;
- Titulação e determinação de pKa;
- Outros.

O Laboratório de Biologia Celular e Molecular está situado no campus I da Universidade Católica de Brasília no Bloco São Gaspar Bertolli (bloco M), sala 326/327. Sua área total é de 114 m² (com bancadas, pias, tanques, armários e mobiliário) e interlab (com bancada e armários e material de uso mais restrito - material bibliográfico, equipamentos de projetos de pesquisa). É um Laboratório de uso comum atendendo a aulas práticas de diversos cursos, monitorias e projetos de pesquisa em geral.

ÍNDICE

1 – OBJETIVO	4
2 – RESPONSABILIDADE	4
✓ 2.1 CURSOS QUE UTILIZAM O LABORATÓRIO:	4
✓ 2.2 PESSOAS ENVOLVIDAS DIRETAMENTE COM O LABORATÓRIO:	5
3 – NORMAS DO LABORATÓRIO	5
4 – NORMAS DEVIDO A PANDEMIA COVID-19	5
5 - PROCEDIMENTOS	6
✓ 5.1 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL - EPI.....	6
✓ 5.2 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA - EPC	6
✓ 5.3 HIGIENIZAÇÃO/DESINFECÇÃO	8
✓ 5.4 OPERAÇÕES DOS EQUIPAMENTOS	9
✓ 5.5 TÉCNICAS REALIZADAS NO LABORATÓRIO	25
✓ 5.6 COLETAS, ACONDICIONAMENTO E RECOLHIMENTO DOS RESÍDUOS.	25
6 - CONDUTAS A SEREM ADOTADAS EM CASOS DE ACIDENTES	26
✓ 6.1 CONTATOS DE EMERGÊNCIA.....	26
7- PLANOS DE AÇÕES	27
✓ 7.1 PLANO DE AVALIAÇÃO PERÍODICA DOS ESPAÇOS	27
✓ 7.2 PLANO DE MANUTENÇÃO E GUARDA PATRIMONIAL	27
✓ 7.3 PLANO DE LIMPEZA E ORGANIZAÇÃO	27
✓ 7.4 PLANO DE ATUALIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS.....	28
✓ 7.5 AGENDAMENTO	28
8 – AULAS PRÁTICAS DESENVOLVIDAS	30
9 - ANEXOS	35
✓ 9.1 BIOLOGIA CELULAR.....	30
✓ 9.2 BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE/BIOQUÍMICA GERAL	39
✓ 9.3 BIOQUÍMICA PRÁTICA E EXPERIMENTAL	57
✓ 9.4 ENZIMOLOGIA	74
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 4 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Elaboração: Thalyta Railine Cesar Palmeira	Assinatura ou Rubrica	Data: 16/12/2022
Revisão: Thalita Tormin Almeida Calvacanti	Assinatura ou Rubrica	Data: Dez/2022
Aprovação: Thalita Tormin Almeida Calvacanti	Assinatura ou Rubrica	Data:

1 – OBJETIVO

Descrever de forma simples e objetiva as técnicas, atividades e operações realizadas no laboratório.

2 – RESPONSABILIDADE

2.1 Cursos que utilizam o laboratório:

Regular

- Ciências Biológicas
- Biotecnologia
- Farmácia
- Biomedicina
- Formação Geral
- Medicina veterinária

Eventual

- Medicina
- Nutrição
- Odontologia
- Fisioterapia

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 5 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

2.2 Pessoas envolvidas diretamente com o laboratório:

- Técnicos:

- Thalyta Railine Cesar Palmeira

3 – NORMAS DO LABORATÓRIO

- Não é permitida a presença de pessoas não autorizadas no laboratório.
- A chave do laboratório está na responsabilidade do técnico do laboratório e somente será liberada aos alunos e pesquisadores que tiverem autorização.
- É obrigatório o uso de EPI – *Equipamento de Proteção Individual* (jaleco, sapato fechado, e luvas sempre durante a realização de qualquer procedimento além de gorro e máscara caso se faça necessário) dentro do laboratório (Portaria da Reitoria nº 143 NR06).
- Todos os alunos que utilizarem o laboratório devem ser orientados pelo professor e técnico quanto ao seu funcionamento antes do início das atividades no laboratório.
- É proibida a entrada e o consumo de qualquer tipo de alimento ou bebida.
- Após os procedimentos realizados no laboratório o aluno deverá deixá-lo limpo e organizado, e verificar se desligou todos os equipamentos que utilizou.
- Questões de biossegurança é indispensável nesta área de trabalho, visando em zelar os equipamentos dos materiais e equipamentos, como também, a segurança de alunos, auxiliares de limpeza, professores e técnicos.
- Todo e qualquer utensílios que seja descartável e estiver contaminado com resíduos biológicos ou reagentes químicos, devem ser jogados no lixo branco (exemplo: luvas, jalecos descartáveis, toucas descartável, propés, papel toalha sujo de resíduos químicos e/ou biológicos).

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 6 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

4 – NORMAS DEVIDO A PANDEMIA COVID-19

- Sempre utilizar máscara de proteção, de preferência com face shield;
- Mantenha as portas e janela sempre abertas;
- Respeite as demarcações de pisos e/ou bancadas;
- Mantenha o distanciamento social;
- Higienize sua estação de trabalho e de aula prática antes e depois do uso;
- Não compartilhe materiais com os outros;
- Higienize suas mãos sempre que possível, caso não tenha uma pia, utilize álcool em gel;
- Ande com seu álcool em gel;
- Prenda o cabelo de forma que não contamine nas bancadas e atrapalhe na execução de suas tarefas.

5 - PROCEDIMENTOS

5.1 Equipamentos de Proteção Individual - EPI

- Para manipulação de reagentes: Jaleco, óculos, luvas e máscara.
- Para manipulação de corantes: Jaleco e luvas.
- Para preparo de soluções: Jaleco, luvas e máscara.
- Para limpeza de vidraria e material: Jaleco e luvas.

5.2 Equipamentos de Proteção Coletiva - EPC

Os Chuveiros e Lava-olhos de emergência são equipamentos de proteção coletiva que devem ser localizados próximos às áreas onde haja armazenagem e/ou, manipulação de produtos químicos considerados de risco para a saúde humana.

O corpo humano consiste de 70% de água, e os ácidos em geral só reagem com água, provocando assim queimaduras de até 3º Grau. Quando ocorre um acidente com ácidos,

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 7 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

o funcionário que foi atingido irá se utilizar do chuveiro lava-olhos de emergência por 15 minutos, para que o ácido venha a reagir com a água do chuveiro ao invés de reagir com a água do corpo do funcionário acidentado.

OBS: Os produtos químicos não são necessariamente líquidos, podem ser pó ou fuligem. E para estes, o chuveiro lava-olhos também é indicado.

O chuveiro pode ser acionado por uma alavanca tipo triângulo, conectada a uma válvula de acionamento rápido. E o lava-olhos também pode ser acionado por meio de uma plaqueta tipo “Empurre” conectada a uma válvula de acionamento rápido. Para os equipamentos automáticos o acionamento se dá quando a pessoa se posiciona em cima da plataforma localizada no nível do chão em frente ao lava-olhos.

- **Operação do Chuveiro de Emergência:** posicionar-se embaixo do crivo e acionar a haste tipo triângulo de acionamento. Tomar uma ducha por 15 minutos. Despir-se caso a roupa estiver contaminada. Procurar assistência médica imediatamente.
- **Operação do Lava-olhos:** acionar a placa “Empurre”, segurar as pálpebras bem abertas com os dedos. Utilizar o equipamento por 15 minutos. Procurar assistência médica imediatamente.

Manual de Manutenção do Chuveiro e Lava-olhos de Emergência

- **Verificação:** O equipamento deverá ser testado 1 vez por semana. Acione o lava-olhos e observe a altura do jato que deverá ter no mínimo 20 cm e no máximo 35 cm de altura. O chuveiro deverá fornecer a vazão mínima de 75,6 litros de água por minuto e os lava-olhos, 1,5 litro de água por minuto. A água deverá ter a coloração transparente, caso contrário deixe o equipamento funcionando até que a água fique com a cor adequada. Se o equipamento não estiver funcionando relate o ocorrido à manutenção.

Observe abaixo as instruções sobre a manutenção dos chuveiros lava-olhos de emergência:

LISTA DE VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO MÍNIMO

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 8 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

A estação de descontaminação (chuveiro e lava-olhos de emergência) deve ser acessível num prazo de 10 segundos correndo a partir da ocorrência do acidente.

A localização do equipamento de emergência deverá ser identificada mediante sinalização bem visível.

No caso do Lava-olhos, deverá estar provida de dispositivos para controlar o fluxo de água para ambos os olhos.

O equipamento lava-olhos deverá fornecer uma vazão mínima de 0,4 galões (1,5 litro) de água por minuto, durante 15 minutos.

A água fornecida pelo equipamento deve estar em temperatura ambiente ou morna (no máximo 38°C) e deve ser potável.

Todos os funcionários expostos ao contato com materiais perigosos devem ser treinados no uso de equipamentos de emergência.

Os componentes da unidade combinada (chuveiro e lava-olhos) deverão poder operar simultaneamente e serão arranjados de forma tal que possam ser usados simultaneamente pelo mesmo usuário.

O equipamento de emergência deve ser testado semanalmente.

A ducha deve fornecer uma vazão mínima de 20 galões (75,6 litros) de água por minuto e proporcionar uma coluna de água de 20 polegadas (508 mm) de largura a 60 polegadas (1.524 mm) acima da superfície do piso do usuário.

A válvula deverá permanecer aberta, após acionada, sem que o usuário tenha de usar as mãos. A válvula deve ser de fácil operação e poder passar da posição “fechada” à posição “aberta” no tempo de um segundo ou menos.

As saídas devem ser protegidas de contaminantes arrastados e ou em suspensão no ar.

5.3 Higienização/Desinfecção

- O piso é limpo uma vez ao dia pelos servidores do serviço de limpeza e conservação e, havendo a utilização em mais períodos do dia, solicita-se limpeza e desinfecção duas a três vezes no dia.
- As bancadas são limpas com sabão e álcool 70° ao término de todas as aulas.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 9 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Equipamentos e materiais são lavados ao término de cada aula, e se estiverem contaminados por fungos e/ou bactérias, são autoclavados.
- Materiais contaminados com Brometo de Etídio são lavados em ambiente separado e exclusivo para tal fim, e descontaminados seguindo normas específicas.

5.4 Operações dos equipamentos

Mesa agitadora orbital

Instalação/ condições de funcionamento:

- Verificar a tensão da rede elétrica que o equipamento será ligado é compatível, bem como sua potência.
- Manter uma distância segura nas laterais e no fundo do equipamento.
- Promover o perfeito nivelamento do equipamento para a garantia do funcionamento correto nas condições adequadas.

Instrução para, programação, operação e uso:

- Acoplar adequadamente os recipientes nas garras.
- Ajustar a velocidade de agitação que fica a critério do usuário

NOTA: (Velocidade depende do volume, das técnicas e dos recipientes)

Programação/ ajuste de agitação

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 10 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Selecionar a velocidade fazendo uso das teclas ▲ e ▼ do controlador de rotação como segue: O display mostrará a indicação em Hz, para a obtenção em rpm será necessário multiplicar o número por 5,6.
- Para alterar a velocidade, aperte a tecla ▲ e ▼, aumentando ou diminuindo o rpm a ser programado.

NOTA: (A tecla PROG usada para a configuração de parâmetros diversos, está somente habilitada aos comandos de fábrica, devido a sua complexidade, aconselha-se manter na indicação P002, caso necessite de ajustes será apropriado instruções do fabricante, já as teclas JOG, e LOC/REM, estão bloqueadas e protegidas a toques involuntários)

Banho maria TE 054

- Verifique a voltagem do equipamento
- Verifique o correto nivelamento do equipamento
- O nível de água na cuba deverá ficar a uma altura de pelo menos dois centímetros acima da grade de proteção
- Fazer a drenagem quando necessário, utilizando-se o bico dreno
- Manter uma distância segura ao redor do equipamento
- Ligar o equipamento na chave legal Onde indica D ou L, sendo, D para Desligar e L para Ligar.
- Pressione a tecla PGM para programar a temperatura desejada.
- Utilize as teclas ▼ ou ▲ para ajustar o valor desejado visualizando no display
- Para confirmar a programação, pressione a tecla PGM novamente.

NOTA: (Quando o banho maria for programado para uma temperatura muito alta, deve-se checar o nível de água na cuba para evitar a total evaporação e possível queima da resistência).

Hnju9

6652

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 11 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Espectrofotômetro 1100 visível

- Verifique a voltagem do equipamento
- Verificar a tensão da rede elétrica que o equipamento será ligado é compatível, bem como sua potência.
- Verifique o correto nivelamento do equipamento
- Ligar o equipamento na chave localizada atrás do mesmo
- Escolher o modo Absorbância na função MODE: letra A
- Escolher o comprimento de onda ao qual se quer fazer a leitura no botão WAVELENGTH.
- Limpar a cuveta ou o tubo de ensaio que for usado para calibrar o equipamento com lenço de papel.
- Colocar água destilada na cuveta ou tubo de ensaio
- Colocar a cuveta ou tubo de ensaio no compartimento de cuveta
- Apertar o botão 0A/100% ^
- Espere até piscar e ficar a numeração 0,00
- Retirar a cuveta ou tubo e fazer a leitura da amostra

Mini cuba horizontal para eletroforese de DNA BioAgency

Precauções de segurança:

- Certifique-se de que a fonte de força esteja desligada antes de remover a tampa da cuba de eletroforese
- Nunca exceda a voltagem ou corrente de operação máxima
- Nunca utilize a cuba de eletroforese em superfícies metálicas

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 12 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Brometo de etídeo é um agente mutagênico, Manipule-o com cuidado e com luvas de proteção apropriadas. Descartar os materiais contaminados por este em locais apropriados.
- Luz ultravioleta pode causar danos permanentes na retina e na pele. Use óculos de proteção ao UV
- Nunca encher a cuba com tampão de corrida acima do limite indicado
- Nunca mover a cuba quando ela estiver em operação
- Para remover a tampa aperte com os polegares os dois pinos plásticos, levantando a tampa verticalmente com os demais dedos

Preparação do gel:

- Certifique-se de que as borrachas de vedação da bandeja UV estejam corretamente posicionadas, pressionando-as uniformemente por toda a ranhura da bandeja UV.
- Coloque cuidadosamente a bandeja UV na cuba de eletroforese, com as borrachas de vedação voltadas para as paredes acrílicas, de modo que esta vede os lados da cuba. Empurre cuidadosamente a bandeja UV até que a base deste encoste na plataforma da cuba.
- Coloque a cuba de eletroforese sobre uma superfície plana
- Posicione os devidos pentes nas fendas da bandeja UV
- Após a gelificação, remova cuidadosamente a bandeja UV da cuba de eletroforese e remova as borrachas de vedação da bandeja UV
- Posicione a bandeja UV na posição de corrida de maneira que a região dos poços fiquem próximos ao eletrodo preto
- Encha o tanque com tampão de corrida até submergir completamente o gel.
- Remova cuidadosamente o pente

Correndo as amostras:

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 13 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Coloque as amostras nos poços do gel tomando cuidado para não danificar os lados e o fundo dos poços. Coloque a tampa corrente ANTES de conectar os cabos, com as indicações dos pólos, à fonte de força
- Selecione a voltagem e a corrente adequada para o tipo de aplicação eletroforética.
- A voltagem e corrente recomendada é: Voltagem 100V e corrente 75mA

Finalizando a corrida:

- Ajuste a seleção da corrente para zero, desligue a fonte de força e desconecte os cabos
- Retire o gel de agarose e visualize-o em um transiluminador UV
- Após a corrida, lave a cuba apenas com água livre de Dnases
- Assegure-se de que os cabos e conectores estejam limpos e secos antes e após o uso.

Fonte para eletroforese

Medidas de segurança:

- A frente de alimentação deve ser manuseada com muita precaução, visto que pode desenvolver uma tensão e amperagem suficiente para produzir descargas que podem levar a morte.
- Não utilizar o equipamento em condições extremas de umidade (mais de 95%).
- As aberturas laterais devem ser mantidas destampadas para permitir uma ventilação suficiente.
- Manter o equipamento seco e limpo quando possível, limpar regularmente com um pano suave e úmido.
- Utilizar somente cabos elétricos intactos e especificados com a tensão a usar.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 14 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Instalação:

- Selecionar a tensão apropriada: 100-120 ó 220 240 V.
- Selecionar o cabo de rede adequado. Conectar uma de sua extremidades da tomada na fonte de alimentação e o outro a uma tomada de corrente alternada conectado a terra.
- Cada vez que se conecta o equipamento se executa um teste de diagnóstico automático e, se for detectado um erro, se visualiza uma mensagem no visor e soa um alarme
- Conectar os cabos da unidade (roxo com roxo e azul ou preto com azul). O cabo roxo é o positivo e o azul ou preto, o negativo.

Teclado:

- SET/ENTER: Pondo o equipamento em modalidade SET: Modo de programação e arranque. Pulsando a tecla SET/ENTER nesta modalidade, entra em um valor (se é válido) o programa entra para o parâmetro seguinte. Pulsando a modalidade RUN, pode modificar o programa durante o processo.
- Os valores válidos são: tensão: 5-300V; Amperagem: 10-400 mA; Tempo: 0:01 – 23:59 h.
- (↑/↓) mudança para cima/ mudança para baixo: Troca o valor, parâmetro e outras variáveis no campo intermitente. Os valores se trocam de forma acelerada mantendo apertada a tecla ↓↑, os valores são mostrados no display.
- RUN: inicia o processo e coloca o programa em modalidade RUN(funcionamento). Acende a luz RUN.
- VIEW: Na modalidade de funcionamento, esta tecla muda entre os valores de tensão, amperagem e tempo transcorrido. Apertando durante mais de 3 segundos, se inicia a troca automática entre os valores mencionados. A troca automática se para pulsando a tecla VIEW ou RUN.
- STOP: Interrompe o funcionamento e coloca o aparelho em modalidade END.

Operação:

- Conectar a rede elétrica

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 15 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Pulsar a tecla ↑↓ do número do programa atual e selecionar o número do programa desejado com as teclas SET/ ENTER. Pulsar.
- Quando a programação for finalizada, conectar a unidade de eletroforese na tomada e pulsar a tecla RUN.
- Pulsar a tecla VIEW para visyualizar atensão, amperagem e tempo atual. Para iniciar a troca automática entre os valores, apertar a tecla VIEW durante 3 segundos.
- Durante o funcionamento, pulsar a tecla SET/ENTER para controlar os parâmetros programados e trocar os valores com a teclas ↑↓. Confirmar com SET/ENTER.
- O programa para automaticamente ao concluir ou pulsando a tecla STOP.
- Desligue a fonte, desconecte os cabos e limpe-a com pano úmido antes de guarda-la.

Câmara de fluxo laminar

- Verifique a voltagem do equipamento
- Verificar a tensão da rede elétrica que o equipamento será ligado é compatível, bem como sua potência.
- Verifique o correto nivelamento do equipamento

Controles:

- O controle LIGA/DESLIGA localiza-se no painel frontal, do lado direito.
- Botão verde: liga o sistema : lâmpada acesa
- Botão vermelho: desliga o sistema: lâmpada apagada
- Para a luz ultra-violeta, o botão de LIGA/DESLIGA localiza-se em cima do equipamento com uma seta indicando a posição.

Operação:

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 16 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Faça a limpeza de toda a parte interna do fluxo laminar com álcool 70% e com o equipamento ligado.
- Coloque o material a ser esterilizado no fluxo antes do manuseio e ligue a luz ultravioleta.
- Quando ligar a luz ultravioleta, deve-se sair de perto do equipamento para evitar qualquer exposição, pois a luz pode causar danos permanentes na visão e na pele.
- Manter a luz ultravioleta ligada por 15 minutos.
- Desligar a luz ultravioleta e ligar a luz branca.
- Com o término do uso, limpe o fluxo laminar com álcool 70% em toda a parte interna.
- Coloque todo o material que deve ser esterilizado no fluxo.
- Ligue a luz ultravioleta por 15 minutos.
- Desligue a luz ultravioleta.
- Retire quaisquer materiais que não sejam de uso permanente no fluxo.
- Desligue o equipamento.

Agitador magnético NT 101

Instalação:

- O local deve ter bom nivelamento, ser arejado e possuir rede elétrica próxima, compatível com o equipamento e que suporte uma corrente elétrica pelo menos 5A (para 110V) e 2,5A (para 220V).
- Mantenha uma distância mínima de 15 cm da parede, para uma perfeita ventilação.

Operação:

- Conectar o *plug* de alimentação na rede elétrica.
- Colocar o recipiente com o material a ser agitado, juntamente com a barra magnética em seu interior. Obs: o material a ser agitado deverá ser de baixa viscosidade.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 17 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Girar lentamente o botão de ajuste de rotação, até a velocidade desejada.
- Caso a barra magnética desintonize do campo magnético, desligar a agitação e recomeçar o processo.
- Caso ocorra quebra do recipiente sobre a placa, esta poderá ser enxaguada ainda quente.

Limpeza:

- Na limpeza não poderão ser usado solventes, apenas sabão neutro e pano úmido.
- Após a limpeza, deve-se proceder a secagem do mesmo com um pano seco e macio.
- O gabinete externo poderá ser limpo periodicamente com cera automotiva, aplicada e removida com pano macio.

Medidor de pH NT PHM

Observação: O eletrodo é uma peça importante na medição do pH, portanto iniciaremos com alguns cuidados que devem ser tomados.

Cuidados com o eletrodo:

- Retire o eletrodo da embalagem de proteção
- Retire a “chupeta” protetora da ponta sensora do eletrodo, e lave-o com água destilada para limpar o KCl cristalizado.
- Verifique se existe alguma bolha de ar na ponta sensível do eletrodo. Se houver, agite-o com cuidado para que ela suba.
- Retire agora a tampa de borracha do respiro. Este respiro é muito importante, pois a solução de KCl existente dentro do eletrodo flui pelo diafragma durante as medições, baixando o seu nível. Isso ocorre através de uma pressão criada pela diferença de altura entre o nível de KCl e a solução objeto da medição do pH. Caso o respiro esteja fechado, a solução de KCl não fluirá.
- Instale agora o eletrodo no aparelho através da junção do plug BNC deste no conector de entrada do instrumento.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 18 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Instale também o sensor de temperatura, caso deseje compensação automática, colocando-o no suporte e plugando-o no aparelho.
- Coloque o eletrodo no suporte, e posicione o limitador de curso de tal forma que o eletrodo não bata na base metálica.
- Não é aconselhável fazer medidas imediatamente após a retirada do eletrodo da embalagem; deixe-o mergulhado em KCl 3M durante algumas horas, isto ativa o seu funcionamento. Quando não estiver fazendo leituras é aconselhável que se deixe o eletrodo mergulhado em KCl 3M.
- Conecte a fonte de alimentação na rede e ligue o aparelho, através de sua chave liga-desliga.
- O instrumento está pronto para se iniciar a calibração.

Observação: Com o passar do tempo, o nível da solução de KCl 3 molar saturado com AgCl vai baixar. Quando isso ocorrer, complete o nível até quase a abertura do respiro. Nunca deixe o meio no qual você está fazendo a medição ficar acima do nível da solução KCl do eletrodo. Isso pode ser evitado mediante a verificação do nível do eletrodo da solução de KCl antes de se fazer a inserção no meio a ser medido o valor de pH. Caso isso não seja observado, poderá ocorrer a contaminação da solução de KCl pelo meio onde se está realizando a medição de pH e desta forma ter seu funcionamento comprometido.

Calibrando e colocando em operação:

- Quando você liga o aparelho aparece o seguinte Menu:

Escolha a opção COFG DESL. MED

IMPORTANTE: Note que as teclas “A”, “B” e “C”, quando pressionadas, correspondem a função que está sendo indicada naquele momento pela linha debaixo do display.

O equipamento vem com uma configuração “default” de fábrica, que é:

- Medir pH
- 1º tampão = pH 7,00
- 2º tampão = pH 4,00
- Compensação de temperatura automática

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 19 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Se você escolher MED você irá para a situação de medição e a configuração a de fábrica.

- Escolhendo COFG você poderá configurar o equipamento para as suas necessidades, como medir mV, por exemplo, ou escolher os tampões a serem utilizados.
- Uma vez escolhida a configuração ela só se perderá caso você desconecte o equipamento da energia elétrica (NT-PHM) ou retire a pilha (NT-PHP).
- Pressione agora o botão A e vamos à medição.
- Se você optou por ler pH aparecerá a tela da próxima página :
- **IMPORTANTE:** Quando desconectado de rede elétrica ou da pilha (NT-PHP), o equipamento perde a calibração, devendo ser recalibrado.
- Pressione CAL (é a tecla “C”) e vamos a calibração.
- Lave o eletrodo com a água destilada ou deionizada e enxugue-o com um papel macio e absorvente, suavemente sem friccionar;
- Agora o equipamento deve estar pedindo a solução tampão escolhida na configuração para iniciar a calibração. Mergulhe o eletrodo e o sensor de temperatura no tampão e pressione OK (é a tecla “C”).
- Caso algum problema ocorra durante a calibração, seja como o eletrodo ou com a solução tampão, o aparelho aborta o processo de calibração e informa o defeito ocorrido.
- O equipamento vai tentar calibrar neste primeiro tampão uma série de 16 vezes. Caso tenha sucesso, o aparelho estará calibrado neste tampão.
- Agora o equipamento deve estar pedindo o outro tampão. Retire o eletrodo do primeiro tampão, lavando-o com água destilada e enxugando-o em seguida.
- Mergulhe agora o eletrodo e o sensor de temperatura no segundo tampão escolhido na configuração (é mostrado no display), pressione a tecla correspondente ao OK (é a tecla “C”).

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 20 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- O equipamento vai tentar calibrar neste segundo tampão uma série de 16 vezes. Caso tenha sucesso, o aparelho estará calibrado neste tampão.
- Se tudo ocorreu bem, o display indica, por alguns segundos, a sensibilidade do eletrodo, retornando ao display de medição.
- Lave e enxugue o eletrodo novamente.
- “O aparelho está agora calibrado e pronto para o uso.”
- Lave o eletrodo, enxugue-o e mergulhe-o dentro da solução a ser medida, observe antes a temperatura desta solução, caso você esteja utilizando a compensação manual, e ajuste esta temperatura através do botão “B” mudando para a posição de repouso. Nesta condição, as teclas “A” e “C” aumentam e diminuem a temperatura.
- QUANDO EM REPOUSO → TEMPERATURA MANUAL PARA RETORNAR À MEDIÇÃO, BASTA PRESSIONAR A TECLA “B”.
- Para uma nova leitura, basta que você enxugue o eletrodo, verifique a temperatura da amostra, quando em compensação manual. Estando em compensação automática de temperatura você não precisa se preocupar com a temperatura, apenas mergulhe o eletrodo no meio a ser determinado o valor de pH e faça a leitura.
- Quando a leitura atinge sua estabilidade máxima a terceira casa do equipamento é mostrada.
- Caso o sensor da temperatura não seja conectado, o equipamento muda automaticamente para compensação manual.
- Para retornar à compensação automática deve-se voltar ao menu de configuração e escolher comp./ temp./ auto.
- - Usando a escala mV
- Para utilizar a escala de mV basta ir ao menu inicial usando Esc no display da medição, escolher COFG e selecionar mV, voltando para a tela de medição os milivolts são lidos, inclusive com indicação de estabilidade.
- Na escala mV a temperatura não influencia na leitura.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 21 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- - Trocando a bateria
- No NT-PHP a bateria está alojada na tampa inferior. Para soltá-la, basta pressionar os dois botões de plástico que estão ao lado da tampa inferior e você terá acesso ao compartimento da bateria.

Agitador magnético modelo MA 085

Instalação:

- Verificar a tensão da rede elétrica que o equipamento será ligado é compatível, bem como a sua potência
- Manter uma distancia segura nas laterais e no fundo do equipamento.
- Promover o perfeito nivelamento do equipamento para a garantia do funcionamento correto nas condições adequadas.

Programação, operação e uso:

- Antes de ligar n rede, verifique a tensão
- Desligar os dois comandos frontais
- Girar os dois potenciômetros para o mínimo
- Ligar o interruptor desejado (agitação ou temperatura)
- Posicionar o frasco em cima da chapa do aparelho
- Girar o potenciometro para o acionamento do bastão magnético e regular o RPM
- Aplicar o mesmo para a temperatura quando exigida.

OBS: Se o bastão sair fora da RPM, voltar o potenciômetro e começar novamente.
Se algo for derramado na placa de aquecimento, limpar assim que possível.

Agitador magnético modelo TE – 0852

Instalação:

- Verificar a voltagem: 220V

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 22 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Manter uma distancia segura ao redor do equipamento.

Operação e uso:

- Após escolher o tipo de recipiente, colocá-lo em cima da plataforma e em seguida, introduzir o bastão magnético com revestimento de teflon.
- Este procedimento deverá ser executado com os controles de aquecimento e velocidade desligados
- Através do controle, ajustar a velocidade e temperatura desejada.
- Após o uso, desligar o equipamento e retirar o cabo da tomada.
- Se o equipamento estiver com a chapa quente, deve-se identifica-lo e isola-lo para evitar acidentes
- Limpar o equipamento antes de guardá-lo.

Balança analítica tecnal umark 1000

Operação: teclas

- ON/OFF: Coloca a balança em funcionamento ou em modo de espera ‘ stand by’
- TARE: executa uma operação de tara levando o display a zero
- CAL: inicia o processo automático de calibração (necessário massa padrão)
- MENU: Acessa as funções de configuração da balança
- ENTER/PRINT: Confirma uma alteração no menu e aciona a impressão

Pesagem normal

- Antes da pesagem, verifique o correto nivelamento da balança.
- Pressione a tecla TARE para que o display zere com o recipiente para pesagem já no prato de pesagem
- Coloque o material a ser pesado sobre o recipiente de pesagem e leia o valor do peso no mostrador
- Limpe a balança com um pincel após a pesagem e antes de tampá-la

Destilador de água

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 23 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Antes de ligar o destilador, verifique se tem água na rede;
- Primeiro, liga-se a torneira de água deixando vazar por alguns minutos. A vazão tem que ser suficiente para cobrir a resistência do destilador de água, evitando queima-la.
- Liga-se a chave do destilador e espera até que a água descartada saia quente.
- Controle a vazão de água evitando o desperdício.
- Quando for desligar o destilador, deve-se primeiro desligar a chave de energia, depois, deve-se esperar alguns minutos para fechar a torneira de água.

Autoclave (USO RESTRITO AOS TÉCNICOS, PROFESSORES E ESTAGIÁRIOS TREINADOS)

- Antes de ligar a autoclave, deve primeiro fazer a sua limpeza para evitar qualquer tipo de contaminação.
- Com água limpa e uma esponja, lave a autoclave
- Feche a torneira de descarte e complete o nível de água até acima da resistência
- Coloque o material a ser autoclavado nas bandejas dentro da autoclave
- Feche a autoclave apertando as borboletas opostas
- Abrir a válvula de escape de vapor
- Ligar a autoclave no botão localizado na parte inferior do equipamento acionando o botão no número 2
- Quando estiver saindo na válvula de escape um condensado de água, fechar a válvula
- Esperar a temperatura chegar até 120°C e gire o botão para o número 1 (deve-se estar atento para não deixar que a temperatura ultrapasse 120°C, pois, é RISCO DE VIDA para as pessoas que estiverem no Laboratório devido a alta pressão da autoclave).

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 24 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Marque 20 minutos de funcionamento e após, gire o botão para o número Zero. Desligue o interruptor da autoclave.
- Espere que a autoclave resfrie automaticamente e, só após, abra a autoclave desaperando as borboletas opostas.
- Nunca descarte a água da autoclave quando esta estiver quente, pois pode danificar toda a tubulação de água.

Espectrofotômetro

- 1- Ligue o aparelho;
- 2- Deixe aquecer por 20 minutos;
- 3- Ajuste o comprimento de ondas desejado usando **▲** as teclas **▼** ou
- 4- Utilizando a tecla **MODE**, selecione o modo de operação desejado para TRANSMITÂNCIA, ABSORBÂNCIA OU CONCENTRAÇÃO;
- 5- Escolha as cubetas adequadas para o método analítico;
- 6- Preencha a cubeta com solução “branco” e posicione no suporte para cubeta, coloque as outras com “amostras” na posição que serão lidas;
- 7- Feche a tampa e puxe a alavanca do carrinho de amostras, assim terá posicionado a solução “branco” no feixe de luz, aguarde alguns segundos e ajuste 100%T ou 0Abs, aparecerá 0.000A;
- 8- Puxe a alavanca do carrinho **mais duas vezes** para que a cubeta da amostra seja posicionada no feixe de luz;
- 9- Para as próximas amostras puxe a alavanca somente uma vez;

Para fazer as visualizações de concentração/transmitância/absorbância, basta pressionar o botão MODE e automaticamente durante a exposição da amostra ao feixe de leitura o display alterará os valores lidos.

5.5 Técnicas realizadas no laboratório

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 25 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Técnica de Extração de DNA: A extração de DNA é necessária para várias aplicações na biologia molecular, como PCR, digestão com enzimas de restrição, southern blot, *etc.*, assim como análises de amostras forenses, amostras clínicas, amostras de solo e ambientais. A técnica consiste em deixar o DNA acessível para outras técnicas. Existem vários roteiros para a extração, de acordo com o material do qual se deseja extrair o DNA.

Técnica de PCR: A técnica de biologia molecular por PCR promove, *in vitro* e por meio de artifícios de variação de temperatura, o que o organismo realiza naturalmente em condições fisiológicas: a duplicação de cadeias de DNA, envolvendo nucleotídeos, sequências iniciadoras e enzima polimerases. Por meio deste processo, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucléico a partir de uma fita molde.

Técnica de purificação de proteínas: Esta técnica consiste na passagem da proteína através de uma coluna (fase estacionária) que é desenhada para reter ou diminuir a velocidade da passagem da fase móvel onde estão as macromoléculas (proteínas) e a técnica baseia-se numa propriedade particular, como o tamanho, carga ou afinidade química.

Técnica de eletroforese em gel de agarose: A electroforese é uma técnica de separação de moléculas que consiste na migração de moléculas com carga, numa solução, em função da aplicação de um campo eléctrico.

5.6 Coletas, Acondicionamento e Recolhimento dos resíduos.

Todos os resíduos gerados no laboratório são segregados e devidamente acondicionados, conforme legislação vigente e da seguinte maneira:

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 26 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Resíduos infectantes (Material contaminado com fungos e/ou bactérias e outros resíduos provenientes de vegetais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microorganismos) – Sacos Brancos Leitosos identificados;
- Resíduos perfuro-cortantes / cortantes – Coletor de materiais perfuro-cortantes;
- Demais resíduos – Lixeira comum (ao final do expediente segregados conforme classificação de recicláveis).
- Diariamente, um agente responsável recolhe os resíduos corretamente acondicionados e os transporta até o expurgo da Universidade. O recolhimento se dá em horário pré-estabelecido e, quando necessário, imediatamente após a sua geração.

6 - CONDUTAS A SEREM ADOTADAS EM CASOS DE ACIDENTES

É fundamental informar a Brigada de Incêndio, ao Serviço Especializado de Segurança e Medicina do Trabalho (SESMT), a Coordenação do EAP's e aos Responsáveis pelo laboratório a ocorrência de qualquer acidente no laboratório.

Em caso de acidentes com ácido: lavar as partes afetadas com bastante água. Se os olhos forem atingidos, lavá-los com bastante água e pingar gotas de uma solução diluída de ácido bórico a 2%.

Em caso de acidentes com acetona P.A.: em caso de respingo nos olhos, lave-os com água em abundância durante vários minutos, vítimas de inalação de vapores devem ser retiradas para ambientes arejados.

Choques elétricos: interromper a descarga, com desligamento da chave imediato.

6.1 Contatos de emergência

- Brigada de Incêndio – 3356-9439 / 8319-2204
- Serviço Especializado de Segurança e Medicina do Trabalho (SESMT) – 3356-9100 / 3356-9287
- Coordenação dos EAPs – 3356-9050 / 9436
- Bombeiro/Defesa Civil - 193/199

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 27 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

7 – PLANOS DE AÇÕES

7.1 – Plano de Avaliação periódica dos espaços

As verificações dos laboratórios são feitas diariamente ou semanalmente (dependendo das demandas de aulas e/ou aulas práticas) pelos técnicos responsáveis dos espaços. Qualquer problema de infraestrutura é aberto um chamado via sistema SISPREL, na qual a equipe de manutenção providencie os reparos necessários, dando maior importância para casos de emergência.

7.2 - Plano de manutenção e guarda patrimonial

Os técnicos de cada espaço fazem as verificações dos equipamentos e material patrimonial. Se necessário, é feita uma calibração e limpeza externa preventiva dos equipamentos específicos, sempre no início e fim dos semestres, afim de preparar os equipamentos para os inícios das aulas práticas.

Equipamentos defeituosos são abertos requisições de manutenção enviados para a equipe do almoxarifado. Se for aprovado, o equipamento será levado por uma empresa externa e especialista no equipamento defeituoso.

Observação: Alguns equipamentos só podem ser limpos internamente e calibrados por uma empresa especializada, pois caso seja feita por qualquer outra pessoa, pode danificar, descalibrar e/ou estragar.

7.3 - Plano de Limpeza e organização

Em cada andar dos blocos da Universidade, há uma equipe de higienização que ajuda nas lavagens e limpeza dos laboratórios. Esta equipe vai ao laboratório de acordo com as demandas dos espaços, com aulas práticas e monitorias. Montagem e desmontagem de aulas práticas e as limpezas de bancadas são feitas pelos técnicos responsáveis, visando melhor qualidade no conteúdo que será ministrado dentro do espaço.

7.4 - Plano de atualização dos equipamentos

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 28 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Os equipamentos são catalogados em planilhas como o POP (Procedimento Operacional Padrão). Ao final de cada semestre os técnicos responsáveis anexam em planilhas a Previsão orçamentária de equipamentos que precisam ser comprados para aulas práticas.

7.5 – Agendamento para aulas práticas

Os agendamentos de aulas práticas é feito com antecedência, sendo ideal ser agendando no início do semestre para que não haja choque nos horários. A reserva é feita exclusivamente por e-mail: reservasala@ucb.br com cópia para o técnico responsável por aquele espaço. É IMPRESCINDÍVEL QUE ENVIE A RESERVA TAMBÉM PARA O TÉCNICO DO LOCAL, POIS ELE QUE IRÁ ARRUMAR E ORGANIZAR O LABORATÓRIO.

No e-mail precisa constar algumas informações, como: Nome do professor; nome da disciplina; código da disciplina; data; horário; número do laboratório ou nome do laboratório; quantidade de alunos; e em anexo o roteiro de aula prática contendo materiais de interesse. Sem estas informações não será possível a realização da reserva.

8 – ROTEIROS DE AULA PRÁTICA

BIOLOGIA CELULAR

Aula 1 – Materiais de laboratório e preparo de solução

Aula 2 – Uso do microscópio de luz.

Aula 3 - Comparação entre células procarióticas e eucarióticas

Aula 4 – Observação de osmose em hemácias

Aula 5 - Separação de organelas e macromoléculas das células por centrifugação

BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 29 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Aula 1** – Preparação de soluções e cálculos de concentração
- Aula 2** – Extração de DNA de tecido foliar
- Aula 3** – Extração de DNA de morango
- Aula 4** – Eletroforese em gel de agarose
- Aula 5** – Extração de DNA bacteriano
- Aula 6** – Extração de DNA humano – Método Salting Out
- Aula 7** – Nanodrop e Qubit (cálculos e processos)
- Aula 8** – Reação de PCR (Reação de cadeia Polimerase)
- Aula 9** – Transformação bacteriana por choque térmico/preparação de placas
- Aula 10** – Plaqueamento de células transformadas e inóculo de colônias selecionadas
- Aula 11** – Miniprep (Extração de DNA plasmidial)
- Aula 12** – Ensaio de Restrição e eletroforese

BIOQUÍMICA BÁSICA E EXPERIMENTAL

- Aula 1** – Determinação da concentração de soluções (Titulação).
- Aula 2** – Curva padrão de BSA para Bradford.
- Aula 3** – Extração proteica.
- Aula 4** – SDS-PAGE (Protein Acrylamide Gel Electrophoresis)
- Aula 5** – Atividade Enzimática.
- Aula 6** – Atividade enzimática com alfa-amilase
- Aula 7** – Cromatografia de troca Iônica
- Aula 8** – Detecção de biomoléculas

ENZIMOLOGIA/ BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

- Aula 1** – Inibição enzimática
- Aula 2** - Fermentação Alcoólica

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 30 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

*Todos os roteiros das aulas práticas encontram-se em anexo.

9 – ANEXOS

Biologia Celular

Prática 1 - Biologia Celular

Materiais de laboratório e preparo de soluções

1 - ALMOFARIZ COM PISTILO: Usado na trituração e pulverização de sólidos.

2 - BÉQUER: É de uso geral em laboratório. Serve para fazer reações entre soluções, dissolver substâncias sólidas, efetuar reações de precipitação e aquecer líquidos. Pode ser aquecido sobre a **TELA DE AMIANTO**.

3 - ERLLENMEYER: Utilizado em titulações, aquecimento de líquidos e para dissolver substâncias e proceder reações entre soluções.

4 - KITASSATO: Utilizado em conjunto com o **FUNIL DE BUCHNER** em **FILTRAÇÕES** a vácuo.

5 - PIPETA GRADUADA: Utilizada para medir pequenos volumes. Mede volumes variáveis. Não pode ser aquecida.

6 - PROVETA OU CILINDRO GRADUADO: Serve para medir e transferir volumes de líquidos. Não pode ser aquecida.

7 - TUBO DE ENSAIO: Empregado para fazer reações em pequena escala, principalmente em testes de reação em geral. Pode ser aquecido com movimentos circulares e com cuidado diretamente sob a chama do **BICO DE BÜNSEN**.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 31 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

8 - BICO DE BÜNSEN: É a fonte de aquecimento mais utilizada em laboratório. Mas contemporaneamente tem sido substituído pelas **MANTAS E CHAPAS DE AQUECIMENTO**.

9 - ESTANTE PARA TUBO DE ENSAIO: É usada para suporte de os **TUBOS DE ENSAIO**.

10 - PISSETA OU FRASCO LAVADOR: Usada para lavagens de materiais ou recipientes através de jatos de água, álcool ou outros solventes.

11 - BALANÇA ANALÍTICA: Usada para a medida de massa de sólidos e líquidos não voláteis com grande precisão.

12 - BALÃO VOLUMÉTRICO: Possui volume definido e é utilizado para o preparo de soluções em laboratório.

13 – BURETA: Aparelho utilizado em análises volumétricas.

14 - FUNIL DE BUCHNER: Utilizado em filtrações a vácuo. Pode ser usado com a função de **FILTRO** em conjunto com o **KITASSATO**.

Preparo de soluções:

Utilizando as vidrarias apresentadas, preparar as seguintes soluções:

- 5 mL de azul de metileno, q.s.p. 100 mL com água destilada – solução nº 1 - (utilizar proveta);
- 50 mL da solução anterior, q.s.p. 500 mL com água destilada – solução nº 2 - (utilizar balão volumétrico);

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 32 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Colocar em 4 tubos de ensaio 2,7 mL de água destilada. Ao primeiro tubo, adicionar 0,3 mL da solução 1. Homogeneizar e transferir 0,3 mL para o segundo tubo e assim por diante.

Triturar 8,9g de NaCl (utilizar balança analítica e almofariz com pistilo), q.s.p. 1L com água destilada.

Prática 2 - Biologia Celular

Uso do microscópio de luz

Material necessário

- Lâminas mostrando letras do alfabeto
- Lâminas e lamínulas limpas
- Água de lagoa contendo sedimento
- Pipetas Pasteur
- Microscópio óptico

A. PROCEDIMENTO CORRETO PARA A FOCALIZAÇÃO.

1. Verifique se a objetiva de menor aumento (10X) está encaixada.
2. Pegue a lâmina a ser observada, segurando-a apenas pelas bordas. Verifique se a lamínula está voltada para cima.
3. Abra a presilha e coloque a lâmina sobre a platina, encaixando-a perfeitamente. Solte a presilha e verifique se a lâmina está bem encaixada. Centralize o material no orifício da platina, utilizando os controles dos eixos X e Y.
4. Verifique se o controle de intensidade da luz encontra-se no mínimo.
5. Certifique se o condensador encontra-se em sua posição mais elevada.

 <p>Universidade Católica de Brasília</p>	<p>UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR</p>	
<p>Revisão 00</p>	<p>Emissão: 16/12/2022</p>	<p>Página 33 de 80</p>
<p>MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</p>		

6. Acenda a lâmpada do microscópio e ajuste a intensidade da luz.

7. Ajuste a abertura do diafragma de acordo com a abertura numérica da objetiva de 10X.

8. Levante a platina movimentando o controle macrométrico até o seu ponto máximo.

9. Ajuste a distância interpupilar movimentando com cuidado os tubos no cabeçote, abrindo ou fechando conforme a necessidade.

10. Agora, observando através das oculares e utilizando o **controle macrométrico**, abaixe lentamente a platina, até que o material a ser observado seja visto. Assim que isto ocorrer, corrija a focalização utilizando o controle micrométrico.

11. Caso seja necessário ajuste as diferenças que podem ocorrer entre o olho esquerdo e direito (dioptrias) através do anel de correção de dioptrias no tulo esquerdo.

12. Explore o material, movimentando os controles dos eixos X e Y com a mão direita e o controle micrométrico com a mão esquerda. **Coloque sempre o material a ser analisado no centro do campo de observação, antes de passar para a objetiva de aumento imediatamente superior.**

13. Encaixe a objetiva de 20X e faça o ajuste da focalização, **utilizando apenas o controle micrométrico**. Ajuste a abertura do diafragma de acordo com a abertura numérica da objetiva (0,40). Observe o campo atentamente.

14. Selecione uma determinada área do material, centralize-a e encaixe a objetiva de 40X. Faça o ajuste da focalização **utilizando apenas o controle micrométrico**. Ajuste a abertura do diafragma de acordo com a abertura numérica da objetiva (0,65).

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 34 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

15. Terminada a observação, reduza a intensidade da luz ao mínimo, desligue a lâmpada, gire o revólver para encaixar a **objetiva de menor aumento** e retire a lâmina.

Prática 3 - Biologia Celular

Comparação entre células procarióticas e eucarióticas

Material necessário

- Lâminas e lamínulas
- Palitos de fósforo
- Placas de Petri com colônias de bactérias e fungos (prática anterior)
- Alça de Platina
- Lamparina
- Corante azul de metileno 0,5%
- Papel higiênico
- Papel-filtro (2x2 cm)
- Béquer com água destilada
- Béquer com solução de hipoclorito para descarte de lâminas e lamínulas
- Microscópio

Procedimento

A) Células da mucosa oral

1. Coloque uma gota de solução salina 0,9% no centro de uma lâmina.
2. Com um palito de fósforo, raspe suavemente a parte interna da bochecha e, depois, transfira o material para a gota de solução salina.
3. Cubra o material com lamínula e observe ao microscópio. Comece com a objetiva de menor aumento e vá até a objetiva de 40X.
4. Inicie a focalização do material com o diafragma fechado, porém, regulando a sua abertura a cada mudança de objetiva.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 35 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

5. Após a observação com a lente objetiva de 40X, volte à lente objetiva de 10X e retire a lâmina do microscópio e coloque-a sobre a bancada.

6. Coloque uma gota do corante azul de metileno em uma das bordas da lamínula.

7. Encoste um pedaço de papel de filtro no lado oposto ao da gota de corante. O papel absorverá a solução salina, permitindo que o corante passe por capilaridade para o espaço entre a lâmina e a lamínula.

8. Aguarde alguns minutos e observe o material ao microscópio.

9. Inicie a focalização regulando abertura do diafragma a cada mudança de lente objetiva. Responda as questões 1 e 2 na última folha.

B) Bactérias e fungos

1. Observação a olho nu: podemos diferenciar as colônias de bactérias, leveduras das de fungos filamentosos. As colônias de bactérias e leveduras geralmente são redondas e brilhosas e a coloração irá depender da espécie de bactéria ou levedura que estiver crescendo. Já os fungos filamentosos têm aspectos de um chumaço de algodão e também podem ser diferentes cores.

2. Com uma alça de platina (ou mesmo um palito de dente ou de fósforo), encoste levemente em uma colônia de bactérias.

3. Esfregue a alça numa lâmina de microscópio até espalhar bem a amostra coletada.

4. Fixe as bactérias pelo calor, passando a lâmina na chama de uma lamparina, com as bactérias voltadas para cima (cuide para a lâmina não aquecer demais).

5. Coloque uma gota de corante (azul de metileno 0,5%) sobre o material e aguarde 1 minuto.

6. Remova o excesso de corante mergulhando a lâmina num béquer com água.

7. Cubra com uma lamínula (tenha o cuidado de manter água entre a lâmina e lamínula) e seque o resto da lâmina com papel higiênico. Observe ao microscópio. Comece com a objetiva de menor aumento e vá até a objetiva de 40X.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 36 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Prática 4 - Biologia Celular

Observação da osmose em hemácias

Material necessário

- Lâmina e lamínula
- Lancetas descartáveis estéreis
- Água destilada
- Soro fisiológico (NaCl 0,9%)
- Solução hipertônica (NaCl 2%)
- Papel filtro (2x2 cm)
- Luvas descartáveis
- Microscópio óptico
- Desinfetante com cloro
- Algodão
- Conta-gotas

Procedimento

1. Coloque uma gota de soro fisiológico (NaCl 0,9%) em duas lâminas limpas.
2. Faça um pequeno furo na ponta de um dedo com uma lanceta descartável estéril e coloque uma gota de sangue sobre cada lâmina (descartar as lancetas em solução desinfetante).
3. Cubra com lamínula e observe ao microscópio. Inicie com a objetiva de menor aumento e vá até a objetiva de 40X.
4. Em uma das lâminas, com um conta-gotas coloque uma gota de solução hipertônica (NaCl 2%) em um dos lados da lamínula e encoste um papel-filtro do outro lado para substituir o soro fisiológico da lâmina.
5. Observe ao microscópio principalmente a região da lâmina onde as hemácias entraram em contato com a solução hipertônica.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 37 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

6. Na outra lâmina, repita o mesmo procedimento anterior, só que em vez de solução hipertônica use água destilada. Observe a região da lâmina onde as hemácias entraram em contato com a solução hipotônica.

7. Terminada a observação, as lâminas devem ser mergulhadas em solução desinfetante a base de cloro (20%).

8. Cada aluno deve passar um algodão com álcool na mesa do microscópio e demais partes manuseadas do aparelho.

Osmose em Células Vegetais

A epiderme da folha de *Tradescantia* apresenta células aclorofiladas, muitas delas com coloração rosada de aspecto homogêneo, devido à presença do pigmento antocianina no interior do vacúolo destas células, o qual ocupa grande parte do citoplasma.

Procedimento

- Monte uma lâmina, colocando uma gota de água em uma de suas extremidades e uma gota de solução salina (NaCl a 2%) na outra extremidade.

- Retire, com auxílio de uma pinça, alguns fragmentos da epiderme inferior de uma folha de *Tradescantia*.

- Coloque um destes fragmentos em cada uma das gotas e cubra o material com lamínulas. São duas lamínulas (uma em cada extremidade da lâmina).

- Inicie a observação com o material montado em água. Observe ao microscópio, utilizando a lente objetiva de 10X.

- Observe o material montado em solução hipertônica utilizando a lente objetiva de 10X.

Prática 5 - Biologia Celular

Separação de organelas e macromoléculas das células por centrifugação

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 38 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Material necessário

- Folhas de *Tradescantia purpurea*.
- Gral e pistilo.
- Tubos de microcentrífuga.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de 5 mL e pipetadores.
- Micropipetas de 1 mL e ponteiras.
- Centrífuga.
- Detergente caseiro (líquido).
- Água acidulada (2 a 3 gotas de vinagre - ou ácido acético - em mais ou menos 100 mL de água).
- NaOH diluído (0,1 - 0,2 M).

Procedimento

1. Coloque 3 mL de água acidulada em um gral ou almofariz. A razão para usar água acidulada é porque o pigmento antocianina que iremos separar dos cloroplastos é rosa ou roxo em pH ácido, mas verde em pH alcalino. Como iremos separar a antocianina da clorofila, que também é verde, ficaria difícil de notar a diferença dos dois pigmentos em pH alcalino.

2. Esmague 2 a 3 folhas de *Tradescantia* nessa solução com um pistilo.

3. Transfira com uma pipeta Pasteur a parte líquida do homogenato para dois tubos de microcentrífuga (1 mL em cada tubo).

4. Centrifugue a 12.000 rpm por 5 min. Pode-se ver claramente, após a centrifugação, que o sobrenadante é um líquido roxo, pela presença do pigmento hidrossolúvel antocianina. No fundo do tubo fica um precipitado verde, pela presença dos cloroplastos, que são organelas grandes e mais densas e por isso vão para o fundo do tubo.

5. Transfira os sobrenadantes dois novos tubos enumerados 1 ou 2.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 39 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

6. Com uma pipeta Pasteur, ressuspenda os precipitados (cloroplastos) em água acidulada (2 x 300 µL).

7. Acrescente duas gotas de detergente no tubo 1 contendo a solução "verde" e agite o tubo por mais ou menos um minuto. No tubo 2, adicione apenas duas gotas de água acidulada (não agite).

8. Centrifugue a 12.000 rpm por 5 minutos os dois tubos contendo a "solução verde".

9. Observe o que aconteceu com o material contido nos dois tubos.

10. Adicione 2 ou 3 gotas de solução básica (NaOH diluído) nos tubos com “solução roxa”, agite e veja observe a cor da solução.

Biotecnologia e Biodiversidade/ Bioquímica geral

Prática 1 – Biotecnologia e Biodiversidade

Preparação de soluções e cálculos de concentração

- Molaridade: $M = m / mm.v$
- Concentração: $C1.V1 = C2.V2$
- Regra de três para Titulação
- Ng - mg –g- kg
- Diluição seriada:
Volume transferido = Volume do diluente / (Fator de diluição -1);
Volume total misturado = Volume do diluente + Volume transferido;
- Relação entre normalidade e concentração em mol/L

CTAB 2x – NaCl 1,4 M; EDTA 20mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; sds ou metabissulfito de sódio 2%) – volume 100mL

1,214g Tris-HCl

2g CTAV (Brometo de Cetiltrimetilamônio)

8,18g NaCl

0,5844g EDTA

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 40 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

2g SDS

Prática 2 – Biotecnologia e Biodiversidade/ Bioquímica geral

Extração de DNA de tecido foliar

1º Etapa: Lise Celular

1. Corte a folha em pedaços pequenos.
2. Coloque-os em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
3. Adicione 1mL do tampão de extração CTAB (CTAB 1%, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM pH 8,0, metabissulfito de sódio 1%)
4. Macerar o tecido utilizando os palitos (de churrasco).
5. Misturar bem e levar ao banho-maria previamente aquecido a 65 °C, por 30 minutos (agitar os tubos a cada 10 minutos). Ao final, retirar os tubos do banho-maria.

2º Etapa: Extração do DNA

1. Enquanto o material está no banho-maria, adicionar 500 µL de clorofórmio a um tubo novo.
2. Transferir a parte líquida (sem as folhas) da lise celular para o tubo contendo o clorofórmio.
3. Tampar e agitar bem.
4. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos (separação em duas fases: orgânica e aquosa).
5. Retirar cuidadosamente a fase aquosa (superior) e colocar em outro tubo de microcentrífuga. Descartar o tubo contendo a fase inferior (orgânica).

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 41 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Importante: Não deixar que as fases se misturem e não encostar a ponteira na fase inferior (orgânica). Caso isso aconteça, fechar o tubo, agitar bem e centrifugar novamente.

3º Etapa: Precipitação do DNA

1. Adicionar ao sobrenadante 1mL de etanol absoluto gelado. Fechar o tubo e agitar bem.
2. Levar ao congelador (-20 °C) durante 30 minutos
3. Retirar os tubos do freezer e centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos (precipitação do *pellet* de DNA).
4. Descartar o sobrenadante (fica somente o *pellet* de DNA no fundo dos tubos).

Importante: Muito cuidado para não descartar o *pellet* de DNA.

4º Etapa: Lavagem e ressuspensão do DNA

1. Adicionar 1 mL de etanol 70% e centrifugar por 5 minutos. Descartar o etanol (cuidado para não perder o *pellet* de DNA!).
2. Retirar todo o excesso de líquido do tubo utilizando uma micropipeta
3. Deixar os tubos abertos invertidos em um papel toalha secando durante 10-15 minutos.
4. Adicionar 100 µL do tampão TE (10mM Tris e 1mM EDTA pH 8,0) ao *pellet* de DNA.

Prática 3 – Biotecnologia e Biodiversidade/ Bioquímica geral

Extração de DNA de morango

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 42 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Soluções:

Tampão CTAB (CTAB 2% p/v; NaCl 2%; Tris-HCl 120 mM; EDTA 20mM e SDS 0,1% (p/v)

CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio: É um detergente catiônico que solubiliza as membranas celulares, e dependendo da concentração de NaCl no tampão, ele forma um complexo com o DNA, precipitando o DNA.

Álcool isopropílico: Precita a molécula de DNA. Na presença de NaCl residual do tampão de lise, esse efeito é aumentado.

Clorofórmio puro (na capela) - **400 uL**: O clorofórmio ajuda a desnaturar proteínas e removê-las da solução onde está o DNA.

Materiais:

-Morango - Palito de mascarar – Rack de eppendorf- Eppendorf – Ponteira P1000 – Pipeta automática P1000 – Estante – Descarte – Papel Toalha – Caneta de retroprojektor

Equipamentos utilizados:

Banho-Maria 65°C (ligar com antecedência para que chegue na temperatura informada), Centrífuga, Vórtex (homogenizador de tubos) e Capela de Exaustão (já deixar o clorofórmio P.A, um Becker, ponteira e uma pipeta de 1000, ligar quando for abrir o clorofórmio).

Procedimento:

1. Identifique com seu nome ou número, na tampa do tubo eppendorf vazio e do eppendorf com amostra;
2. Macere com um palito;
3. Pipete 400 uL do tampão CTAB 2x;

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 43 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

5. Coloque no vórtex para homogenizar a amostra (5 a 10 segundos);
6. Colocar em banho-Maria a 65°C por 5 minutos;
7. Na capela de exaustão, pipetar 400 uL de clorofórmio (professor ou técnico para não ocorrer acidente)
8. Vortexar
8. Centrifugar a amostra por 13.400 RPM por 5 minutos;
9. Transferir o sobrenadante aquoso para um novo tubo. Pipetar o máximo possível, sem encostar na interfase;
10. Adicionar 400 uL de álcool isopropílico/isopropanol. Não agitar.
11. Observar a presença de DNA precipitado (um anel mais fosco entre as duas fases)

Prática 4 – Biotecnologia e Biodiversidade/Bioquímica geral

Eletroforese em gel de agarose



CUIDADO! Praticamente todo o material a ser utilizado está contaminado com brometo de etídeo. **O uso de luvas é indispensável!** Se você não estiver usando luvas, **não toque** no sistema de corrida de gel.

1. Montar o sistema de corrida de gel de agarose e determinar o volume do gel. Colocar o pente de acordo com o número e volume das amostras a serem aplicadas.
2. Pesar a quantidade de agarose correspondente a 1% (p/v) do volume do gel a ser preparado.
3. Misturar a agarose com o volume de tampão de corrida TBE 1x (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM).
4. Derreter a agarose em micro-ondas, com cuidado para não ferver e derramar.
5. Adicionar brometo de etídeo para uma concentração final de 0,5µg/mL ao gel (estoque 1mg/mL)

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 44 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

6. Esperar esfriar (mas sem deixar gelificar) e verter cuidadosamente no sistema de corrida.
7. Esperar gelificar, adicionar o tampão de corrida 1x e remover o pente.
8. Aplicar cuidadosamente as amostras em cada poço (não esquecer o marcador de tamanho).

As amostras correspondem ao DNA foliar que o seu grupo extraiu na Aula Prática 1.

9. Correr o gel a 5V/cm (distância, em centímetros, entre os eletrodos).

Prática 5 – Biotecnologia e Biodiversidade/Bioquímica geral

Extração de DNA bacteriano

Referências:

Casañas, et al. (2011) Specificity of a Polymerase Chain Reaction Assay of a Target Sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* Antigen DNA Used to Diagnose Human Brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20 :127–131.

Miller et al. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215.

Soluções:

Solução de lise: NH₄Cl 375 mM e EDTA 120 mM

SDS 10%

Proteinase K (10 mg/mL)

Acetato de amônio 7,5M

Etanol gelado

Etanol 70% gelado

Opcionais:

Lisozima (20mg/mL)

RNase A (1 mg/mL)

Material:

Tubos eppendorf de 1,5 ml

Micropipetas e ponteiras

Banho a 55°C

Centrífuga

Procedimento:

1. Centrifugar a cultura bacteriana (2 a 10 mL) por 5 min a 10.000 rpm (centrífuga MiniSpin).
2. Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 80 µL de tampão de lise e 225 µL de água.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 45 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

3. Adicionar 40 µL de SDS 10%,
* para Gram positivas adicionar 100 µL de lisozima e incubar por pelo menos 1 h.
4. Adicionar 40 µL de sol. Proteinase K, agitar com cuidado e incubar de 30 min a 1 h a 55 °C .
5. Adicionar 100 µL de sol. Acetato de amônio (temperatura ambiente), homogeneizar por inversão e centrifugar a 13.000 rpm por 10 min.
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo (aproximadamente 400 uL)
7. Adicionar 2x Vol. de etanol gelado (aprox.. 800 uL), homogeneizar por inversão.
8. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min.
9. Descartar o sobrenadante e adicionar 200 µL de etanol 70%, repetir a etapa 8.
10. Retirar todo o etanol 70% com pipeta.
11. Deixar secar na bancada, invertendo o tubo.
12. Ressuspender o DNA em 50 µL de TE. (caso queira retirar o RNA, acrescentar RNase)

Soluções:

Todas as soluções usadas em Biologia Molecular devem ser preparadas em água ultrapura (Milli-Q) e autoclavadas, a não ser quando indicado. Qualquer dúvida, procurar o Livro: Sambrook, J & Russel, DW (2000) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

A. Tampão TE (Tris-EDTA, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, pH 8,0)

Fazer uma diluição das soluções estoques de Tris-HCl 1M e EDTA 0,5 M, em H₂O.

Ex: Para 50 mL: 0,5 mL de Tris-HCl 1M+ 0,1 mL de EDTA 0,5M + H₂O q.s.p. 50 mL

B. Solução SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)

Dissolver 10g de SDS em 100 mL de H₂O. A solução obtida deve ser armazenada à temperatura ambiente, não há necessidade de autoclavar.

C. Solução de NH₄Ac 7,5M (PM do NH₄Ac = 77,8)

Calcular a quantidade necessária para 7,5M (77,8g/L = 1M → x 7,5 = 583,5 g por L)

 <p>Universidade Católica de Brasília</p>	<p>UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR</p>	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 46 de 80
<p>MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</p>		

no volume desejado. Esterilizar por filtração! Não autoclavar!

Ex. para 100 mL: dissolver 58,35g de NH₄Ac em H₂O.

D. Solução de Proteinase K (10 mg/mL)

Para cada mL, dissolver 10 mg. Não autoclavar!

E. Solução de Lisozima (20 mg/mL)

Para cada mL dissolver 20 mg em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Não autoclavar!

Prática 6 - Biotecnologia e Biodiversidade/Bioquímica geral

Extração de DNA humano – método Salting Out

- 1- Volume Inicial de sangue 600 ul em 600 ul de Buffer A
- 2- Misturar e manter em gelo por 2 minutos
- 3- Centrifugar a 5000 RPM, durante 15 minutos (**ou 6000 rpm por 5 minutos**)
- 4- Descarte o sobrenadante **com CUIDADO para NÃO perder o pellet**
- 5- Ressuspender o pellet em 600 ul de Buffer A
- 6- Centrifugue a 5000 RPM, durante 15 minutos (**ou 6000 rpm por 5 minutos**)
- 7- Descartar o sobrenadante **com CUIDADO para NÃO perder o pellet**
- 8- Ressuspender o pellet em 350 ul de Buffer B
- 9- Adicione 35 ul de SDS 10% e 5,5 ul de Proteinase K (10mg/ml estoque)
- 10- Incubar a 37 °C over night (**ou 55 °C durante 60 minutos**)
- 11- Adicione 100 ul de NaCl Saturado (Aproximadamente 6M). Agite por 15 segundos
- 12- Centrifugue a 2500 RPM por 15 minutos (**ou 4000 rpm por 8 minutos**)
- 13- Transferir sobrenadante para outro tubo de 1,5ml (cerca de 450 ul)
- 14- Adicionar 2x volume de etanol - 900 ul (gelado – 95%)

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 47 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- 15- Inverte o tubo até precipitar o DNA
- 16- Centrifugue a 2500 RPM durante 2 minutos (**ou 4000 rpm por 2 minutos**)
- 17- Descartar o etanol 95% com cuidado para não perder o pellet e acrescentar 900 ul de etanol 70%
- 18- Centrifugar a 2500 rpm por 2 minutos (**ou 4000 rpm por 2 minutos**)
- 19- Descartar o etanol e deixar o restante evaporar
- 20- Adicionar 40 ul do Tampão TE
- 21- Incubar durante 1 hora em banho-maria à 37 °C
- 22- Centrifugar (spin) durante 30seg
- 23- Aplicar no Gel de Agarose à 1%, previamente preparado
- 24- Usar 5 ul da amostra de DNA para 5 ul do Tampão Corante
- 25- Deixar correr durante 20 à 25 minutos
- 26- Verificar a formação de bandas de DNA no transluminador (luz - UV) e quantificar as amostras.

Reagentes

Buffer A (pH=7,6)

0,32 M Sacoarose	109.5 g de Sacarose
10 mM ou 0,01M de Tris HCl pH 7.6	10 ml de Tris-HCL 1 M pH 7,6
5 mM ou 0,005M MgCl ₂	5 ml de MgCl ₂ 1 M
1% de Triton X 100	

BUFFER B (PH=8,0)

25 mM ou 0,025 M EDTA pH 8,0	50 ml EDTA pH 8,0
75 mM ou 0,075M NaCl	40 ml NaCl 5 M

Complete volume para 1 litro
Autoclave a solução
Adicione 10 ml de Triton X 100

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 48 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

SOLUÇÃO SATURADA DE NaCl

Dissolver 35 gramas de NaCl em 100 ml (6M) de água deionizada. Se a solução não saturar, adicione 2 gramas de NaCl e misture. Repita procedimento até saturar solução.

SDS 10% (DODECILSULFATO DE SÓDIO)

10 gramas de SDS
água deionizada qsp 100 ml

PROTEINASE K

Estoque de 10 mg/ml

Prática 7– Biodiversidade e Biotecnologia/Bioquímica geral

Nanodrop e Qubit (cálculos e processos)

Qubit lite ThermoFisher

1) Qual kit usar?

- DNA BR – para amostras de DNA mais concentradas (100 pg/ul a 1 ug/ul).
- DNA HS – para amostras de DNA menos concentradas (10 pg/ul a 100 ng/ul).
- RNA – para amostras de RNA com 250 pg/ul a 100 ng/ul.

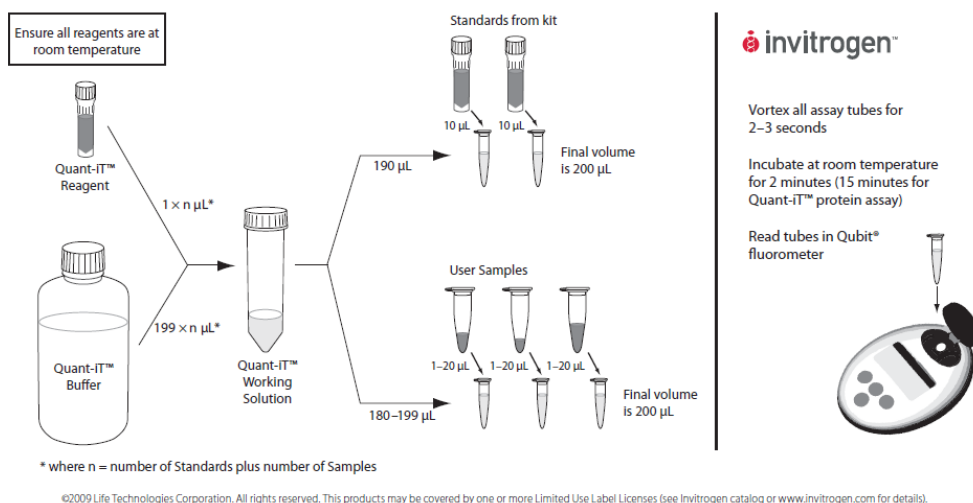
2) Preciso sempre preparar os standards?

- Não, se a última calibração tiver sido feita há menos de 1 semana (ver ficha).
 - Sim, se a calibração for antiga ou se você quiser garantir muuuita precisão na quantificação.
- Nesse caso, anote na ficha que foi feita a calibração nessa data e para esse kit.

3) Para quantas amostras faço os cálculos?

- O número de amostras + os standards (se for o caso) + 0,2 (se forem mais de 15 amostras pode aumentar esse número para 0,3-0,5)

Ex: 8 amostras + 2 standards + 0,2 = cálculos para 10,2 amostras



4) Usar sempre os tubos próprios para o Qubit. Colocar sempre as amostras primeiro, com bastante atenção, reparando se o volume pipetado foi todo deixado no fundo do tubo.

5) Na hora da leitura, selecionar o kit correto antes.

6) O primeiro número mostrado NÃO É a concentração final. Tem que “calculate sample concentration” para corrigir o valor de acordo com o volume de amostra usado.

7) O resultado é dado em ug/ml, que é a mesma coisa que ng/ul.

Nanodrop

Making a Measurement

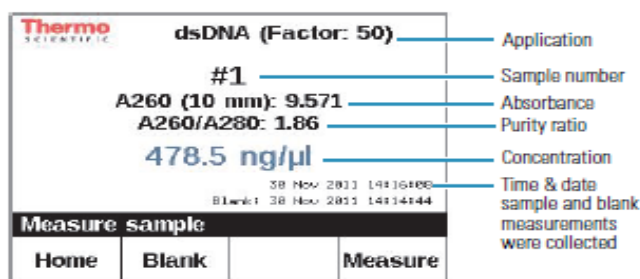
1. Select the appropriate application from the Home screen (DNA or RNA).
For DNA measurements, select either the dsDNA or ssDNA assay.
2. Following the on-screen instructions, establish a blank by pipetting 1-2 µl of the blanking buffer onto the bottom pedestal, lower arm and press Blank.
3. When measurement is complete, raise the arm and wipe the buffer from both the upper and lower pedestals using a dry laboratory wipe.

4. Confirm Blank by pipetting a fresh aliquot of blanking buffer onto the bottom pedestal, lower the arm and press **Blank**.
5. When measurement is complete, raise the arm and wipe the buffer from both the upper and lower pedestals using a dry laboratory wipe.
6. Measure sample by pipetting 1-2 μl of sample onto the bottom pedestal, lower arm and press **Measure**.
7. Wipe the upper and lower pedestals using a dry laboratory wipe and the instrument is ready to measure the next sample.

Note Use a fresh aliquot of sample for each measurement.

Nucleic Acid Measurement Screen

Figure 7. Sample measurement screen



Prática 8 – Biodiversidade e Biotecnologia/Bioquímica geral

Reação de PCR (Reação de cadeia Polimerase)

Amplificação de ECA por PCR

Método de Amplificação de DNA por PCR:

- Montando a reação

Reagentes	VOLUME PARA 1 REAÇÃO	Volume para ____ reações	CONCENTRAÇÃO FINAL
Tampão da Taq- 10x (contendo 15 mM de MgCl ₂)	2,0 μL		1x
dNTPs (2,0mM)	2,0 μL		0,2mM
Primer ECA-F1 (5,0 μM)	1,0 μL		0,25 μM
Primer ECA-R1 (5,0 μM)	1,0 μL		0,25 μM
Taq polimerase 5U/ μL	0,2 μL		1 U
Dna da amostra	1,0 μL		\approx 20 – 300 ng
H ₂ O qsp VF	12,8 μL		
Volume final	20 μl		

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 51 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Aconselha-se o preparo de um mix de reagentes. PRESTE ATENÇÃO EM TODOS OS PASSOS ANTES DE EXECUTÁ-LOS

1) calcule o volume de cada reagente que será necessário (tampão, dNTPs, primers, Taq e água), acrescentando cerca de 5 a 10% de TODOS os reagentes.

Imagine que se queira amplificar 4 amostras e incluir 1 controle negativo.
 ⇒ multiplique o volume unitário de cada reagente por 6

2) adicione os volumes de reagente a um tubo comum, na seguinte ordem

água → tampão → dNTPs → 1º primer → 2º primer → Taq

3) agite bem o tubo e dê um spin na centrífuga ou balance fortemente com a mão

4) distribua 19,0 µL em tubos de 0,2 µL (tubos de PCR)

6) adicione 1 µL do DNA

7) dê um spin na centrífuga ou balance fortemente com a mão e leve ao termociclador

Programa no termociclador:

1. Desnaturação inicial: 95°C por 5 minutos;

2. Temperatura de desnaturação: 95°C por 45 segundo;

3. Temperatura de anelamento: 60°C por 45 segundos;

4. Temperatura de extensão: 72°C por 45 segundos;

}

Repetir por 36 vezes os passos 2 a 4.

5. Extensão final: 72°C por 5 minutos

6. Resfriamento até 12°C para retirada dos tubos

Análise dos produtos de PCR em gel de agarose 1,6%

Preparo do Gel:

Para 40 ml de gel:

Em um erlenmeyer de 100 ml, colocar 40 ml de TAE ou TBE 1x e 0,64 g de agarose (1,6% de 40).

Misturar e levar ao microondas até ferver, formando um gel sem partículas em suspensão.

Esperar esfriar, sem começar a solidificar (temperatura de toque) para acrescentar o brometo de etídeo (1,5 ul da solução a 10mg/ml).

Verter e colocar o pente. Esperar solidificar.

Carregamento do gel:

- Em um outro tubo de 0,2 ml colocar 2 ul de tampão de carregamento e 5 ul da reação de PCR.
 - Colocar o gel na cuba de eletroforese e colocar TBE 1x (o mesmo tampão usado para fazer o gel) até cobri-lo.
 - No primeiro pocinho aplicar 10 ul de ladder
 - Aplicar as amostras nos pocinhos seguintes
- Correr a 90 Volts.

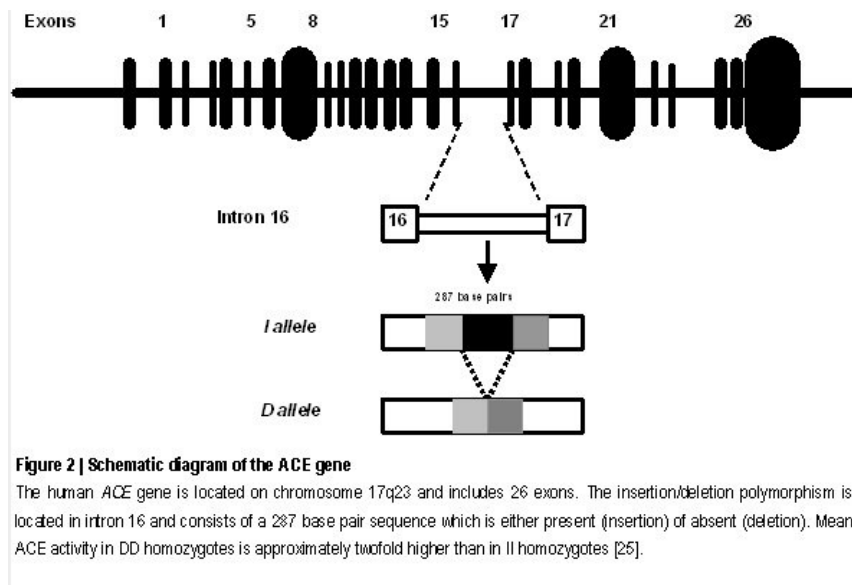


Figure 2 | Schematic diagram of the ACE gene

The human *ACE* gene is located on chromosome 17q23 and includes 26 exons. The insertion/deletion polymorphism is located in intron 16 and consists of a 287 base pair sequence which is either present (insertion) or absent (deletion). Mean ACE activity in DD homozygotes is approximately twofold higher than in II homozygotes [25].

by Dr. A. Titia Lely

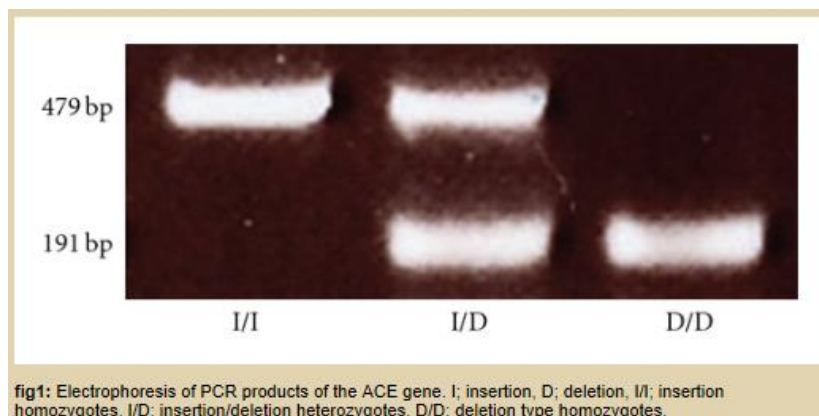


fig1: Electrophoresis of PCR products of the ACE gene. I; insertion, D; deletion, I/I; insertion homozygotes, I/D; insertion/deletion heterozygotes, D/D; deletion type homozygotes.

Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011: 498138

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 53 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Prática 9 – Biotecnologia e Biodiversidade/Bioquímica geral

Transformação bacteriana por choque térmico/preparação de placas

Referência

Technical Manual

pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1360, A1380,
A3600 AND A3610.

Soluções: Placas de meio LB contendo 100 ul/mL de ampicilina/IPTG/X-Gal. Meio LB ou SOC líquido.
Procedimento

1. Centrifugar rapidamente a reação de clonagem para retirar o líquido na superfície do tubo
2. Adicionar 2 ul da reação de ligação a um tubo Eppendorf de 1,5 mL (como controle repita o processo com 1 ul de vetor apenas)
3. Remover as células competentes do ultrafreezer e descongelar gentilmente.
4. Transferir 50 ul de células par o tubo contendo DNA misture levemente com um “flick” no tubo e incube por 20 minutos no gele
5. Aplique o choque térmico adicionando o tubo em um banho maria a 42 oC Por 45 a 50 segundos.
6. Imediatamente coloque o tubo de volta no gelo por 2 minutos
7. Adicione 950 mL de meio SOC (ou LB) e incube a 37 oC por 1,5 horas
8. Após esse período inocule 100 μ l da cultura nas placas previamente preparadas utilizando a técnica do espalhamento em placa.
9. Incube as placas a 37 oC por 16 a 24 horas

Prática 10 – Biotecnologia e Biodiversidade/ Bioquímica geral

Plaques de células transformadas e inóculo de colônias selecionadas

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 54 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Preparação da placa de Petri

20mL de meio de cultura sólido liquefeito em micro-ondas

40 uL de ampicilina (50mg/ml)

40ul de X-gal (20mg/ml)

7ul de IPTG (20mg/ml)

Colocar IPTG por cima do Xgal. Espalhar com a alça de drigalski. Deixar secar sob estufa 60°C entre 3-8 minutos.

Colocar o plasmídeo na placa e espalhe muito bem.

Incubar a placa “overnight” à 37°C e observar os transformantes.

Fazer a seleção das colônias que contém o inserto (recombinantes).

Prática 11 – Biotecnologia e Biodiversidade/Bioquímica geral

Miniprep (Extração de DNA plasmidial)

Referências:

Sambrook, J & Russel, DW (2000) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Material: Soluções:

A. Meio LB + Ampc

B. STE

C. Solução I

D. RNase [10mg/mL]

E. Solução II

F. Solução III

G. Acetato de Sódio NaOAc pH 5,2

H. Isopropanol (gelado)

I. Etanol 70%

Outros

Tubos Falcon

Tubos Eppendorf de 1,5mL

Centrífuga

Vortex

Procedimento:

1. Inocular bactérias em 2mL de meio LB+Ampc líquido (preparar LB sem ágar) em tubos falcon.

pREPA

OBS.: Preparar um recipiente com lisofórmio para descarte durante a miniprep.

 <p>Universidade Católica de Brasília</p>	<p>UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR</p>	
<p>Revisão 00</p>	<p>Emissão: 16/12/2022</p>	<p>Página 55 de 80</p>
<p>MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</p>		

2. Após o crescimento *overnight* das amostras, centrifugar a 4000 rpm por 3 min.
 3. Descartar o meio em lisofórmio.
 4. Lavar o pellet centrifugado com 250 µL de STE e transferir para um eppendorf.
 5. Centrifugar a velocidade máxima (13000 rpm) por um minuto e retirar sobrenadante.
 6. Ressuspender o pellet centrifugado em 100 µL de Solução I, adicionar 1 µL de RNase, vortex para homogeneizar.
 7. Adicionar 100 µL de Solução II. Inverter os tubos por 4-6 vezes para misturar, a amostra deve clarear.
- OBS.: não deixar a reação de lise por mais de 5 minutos.
8. Adicionar 240 µL de Solução III. Inverter 4-6 vezes, a amostra deve ter um precipitado branco.
 9. Adicionar 50 µL de clorofórmio (fazer na capela de exaustão). Inverter 4-6 vezes para misturar.
 10. Deixar no gelo por 5-10 minutos. Essa etapa é para que o clorofórmio não aqueça muito na centrifuga e saia dos tubos.
- OBS.: Os passos 9 e 10 podem ser pulados.
11. Centrifugar a velocidade máxima (13000 rpm) por 10 minutos.
 12. Pipetar todo o sobrenadante (~ 750 µL) em eppendorf novo.
 13. Adicionar 30 µL de Acetato de Sódio (NaOAc) pH 5,2. Vortex para misturar.
 14. Adicionar 240 µL de Isopropanol gelado. Vortex para misturar,

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 56 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

15. Deixar no gelo de 10-30 minutos. Pode-se deixar precipitando *overnight* a 4°C

OBS.: Se tiver pressa pode ir diretamente para o próximo passo.

16. Centrifugar a velocidade máxima por 25 minutos.

OBS.: Alguns protocolos dizem para centrifugar a 4°C, mas não se notou diferenças a temperatura ambiente

17. Remover e descartar o sobrenadante. Não mexer no pellet (às vezes não dá pra ver o pellet)

18. (Opcional: recomendado para foscídeos) Adicionar 500 µL de buffer PB Quiagem. Inverter 4-6 vezes para enxaguar o tubo. Centrifugar em velocidade máxima por 5 minutos. Remover e descartar o PB.

19. Adicionar 1 mL de Etanol 70% (em temperatura ambiente). Inverter 4-6 vezes para enxaguar o tubo.

20. Centrifugar a velocidade máxima por 5 minutos. Remover e descartar o Etanol.

21. Repetir os dois últimos passos mais duas vezes para remover os traços de Isopropanol

22. Deixar o pellet secar ao ar por aproximadamente 15 minutos

OBS.: O pellet mudará de cor de branco para quase transparente quando seca.

23. Ressuspender em volume desejado de água Milli-Q (30 µL). Manter no freezer.

Soluções

Todas as soluções devem ser preparadas em água destilada e autoclavadas, a não ser quando indicado. Qualquer dúvida, procurar o Livro:

Sambrook, J & Russel, DW (2000) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Aula 12 – Biotecnologia e Biodiversidade

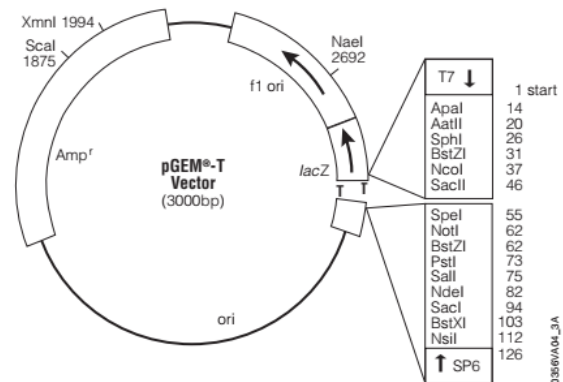
Ensaio de Restrição e eletroforese

Technical Manual

5.B. pGEM®-T Vector Map and Sequence Reference Points

pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1360, A1380,
A3600 AND A3610.



Ligação (pGEM – T Easy vector system)

Tampão 2X	5 µL
Enzima T4 DNA ligase [3 µ/µL]	1µL
Inserto (amostra purificada)	X µL (CALCULAR!)
Vetor pGEM – T Easy [50 ng/ µL]	1 µL
Volume final	10 µL

- Colocar em um eppendorf o tampão, em seguida o vetor, o inserto e por último a enzima. Misturar tudo.
- Colocar na geladeira *overnight* para efetuar a ligação.
OBS.: Usar proporção 1:1 de inserto e vetor (aproximadamente 50ng de DNA).

Bioquímica Básica e Experimental

Prática 1 - Bioquímica Básica e Experimental

Determinação da concentração de soluções (Titulação)

A. Determinação da concentração de um ácido fraco e uma ácido forte por titulação

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 58 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Material Utilizado no Experimento

- bureta graduada;
- pHmetro
- beakers
- papel toalha
- pisseta com água destilada
- funil
- haste de ferro
- bailarinas

Material específico

25 mL de ácido acético 0,1M feito pelo grupo

25 mL de ácido clorídrico de concentração desconhecida feita pelo técnico de laboratório

25 mL NaOH 0,2 M feito pelo técnico de laboratório

Metodologia Ácido Acético

- Prepare uma solução de ácido acético 0,1M. Determinar o volume a ser preparado e calcule quanto ácido acético deve ser utilizado. Determine qual a melhor vidraria para preparar a solução
- Lavar a bureta passando NaOH 0,2M.
- Adicionar NaOH 0,2 M na bureta;
- Introduzir o eletrodo na solução ácida contida no Becker;
- Anotar o pH inicial, antes da adição do NaOH e a cada 1 mL de NaOH adicionado, medindo o pH até que a solução atinja pH 12.
- Medir o pH a medida que a solução de NaOH for sendo adicionada de 1 em 1 mL;

Metodologia Ácido Clorídrico

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 59 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Lavar a bureta passando NaOH 0,2M.
- Adicionar NaOH 0,2 M na bureta;
- Introduzir o eletrodo na solução ácida de 25 mL de ácido clorídrico contida no Becker;
- Anotar o pH inicial, antes da adição do NaOH e a cada 1 mL de NaOH adicionado, medindo o pH até que a solução atinja pH 12.
- Medir o pH a medida que a solução de NaOH for sendo adicionada de 1 em 1 mL;

OBS:

- O becker contém a amostra a ser titulada, o eletrodo tem que ser mergulhado no becker. De preferência, não deixar que ele toque o fundo do becker.
- Espere que a leitura estabilize antes de anotar o pH.
- Antes de repetir o experimento, lave o eletrodo e deixe-o mergulhado em um becker com água destilada ou em uma solução própria.

QUESTÕES PARA O RELATÓRIO

1. O que é titulação e qual a finalidade do experimento?
2. Traçar o gráfico do valor do pH em função do volume adicionado de NaOH
3. Qual o volume necessário de NaOH 0,2 M para neutralizar 25 mL de ácido acético 0,1 M? Calcule a concentração do ácido acético e do ácido clorídricos? Como essas concentrações se comparam com a concentração preparada de ácido acético e de ácido clorídrico desconhecida.

B. Determinação espectrofotométrica de concentração de BSA pura

Materiais

- Uma amostra de albumina sérica bovina (BSA) de concentração desconhecida diluída em água destilada
- Espectrofotômetro com UV e lâmpadas visíveis

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 60 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Cubeta de quartzo
- Tubos eppendorfs
- Micropipetas e ponteiras
- Água destilada

Metodologia

1. Ligue o espectrofotômetro 30 min antes da leitura.
2. Diluir a amostra desconhecida de BSA 5X e 10X: fazer os cálculos de diluição para um volume final de 1 mL. Fazer a diluição em triplicata
3. Zerar o espectrofotômetro a 280 nm com o branco (água destilada).
4. Retirar a cubeta, descartar o branco e secar completamente. Ler em seguida a absorbância da amostra estoque de BSA e das duas diluições de proteína num comprimento de onda de 280 nm. Se certificar que a absorbância de ao menos uma das amostras esteja no intervalo de linearidade da lei de Lambert-Beer, ou seja entre 0,1 e 0,6 de valor de absorbância.
5. Procurar o coeficiente de absorvidade molar da BSA na literatura e calcular a concentração da proteína

C. Determinação espectrofotométrica de concentração de um amino ácido

Materiais:

- Amostra de triptofano de concentração desconhecida
- Espectrofotômetro com UV e lâmpadas visíveis
- Cubeta de quartzo

Metodologia:

1. Ligar o espectrofotômetro 30 min antes da leitura.
2. Zerar espectrofotômetro a 280 nm com o branco (água destilada ou tampão).
3. Retirar a cubeta, descartar o branco e secar completamente. Adicionar a amostra de triptofano e colocar a cubeta no espectrofotômetro.

4. Ler a absorbância da amostra a 280 nm.
5. Estimar a concentração do amino ácido.

Prática 2 - Bioquímica Básica e Experimental

Curva padrão de BSA para Bradford

1.0 - Curva padrão de proteína

Para preparar uma curva padrão de BSA para ser utilizada no ensaio de Bradford, você deve preparar 100µL de cada diluição da tabela abaixo.

- A solução estoque de BSA está na concentração de 1 mg/mL.
- Identificar cada tubo com a concentração de BSA.
- Fazer o experimento em triplicata.

[BSA] (mg/mL)	Volume do estoque à 1mg/mL a ser pipetado (µL)	dH ₂ O (µL)	Vol. Final (µL)	Abs _{595 nm}		
				Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3
0			100			
0,1			100			
0,2			100			
0,4			100			
0,6			100			
0,8			100			
1,0			100			

- Adicionar 1 mL do reagente de Bradford a cada tubo
- Incubar a temperatura ambiente por 5-10 minutos e começar a leitura (o Reagente fica estável por até 1 hora, porém, todas as leituras devem ser feitas num período de 10 minutos – da primeira a ultima).

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 62 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Fazer a média dos valores de absorbância, descontar o valor do branco e fazer a regressão linear, utilizando o programa Excel (será feito no Lab de Informática).

1.1- Quantificação de proteína

- Três amostras de proteína com concentrações desconhecidas devem ser analisadas. A 100 µL de amostra acrescentar 1,0 mL do reagente de Bradford, agitar, aguardar 5 min e ler a absorbância a 595 nm.
- Realizar o experimento em triplicata, para o branco substituir a amostra protéica por água.
- Para determinar a concentração de proteínas utilizar a curva-padrão do experimento anterior.

Prática 3 - Bioquímica Básica e Experimental

Extração de proteínas de folhas

Material e soluções necessárias por grupo

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Micropipetas • Centrífuga • Tubos eppendorfs • Estante para tubos • Isopor com gelo • Cubetas de plástico • Espectrofotômetro • Reagente de Bradford | <ul style="list-style-type: none"> • Béquer de descarte • Tampão de amostra (pós-graduação) • Banho maria 37°C e 100°C. • Flutuadores • Ácido tricloroacético 75% (TCA) • Acetona gelada • Vórtex • Balança de precisão |
|---|---|

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 63 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- TAMPÃO DE LISE - Tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 com 0,4% de dodecil sulfato de sódio (SDS)

Procedimentos a serem realizados durante a aula prática

A. Lise celular

1. Coletar folhas de plantas do jardim do bloco M
2. Pesar 200 mg de folhas em duplicata.
3. Identificar um tubo. Pesar o tubo correspondente a amostra do Tubo VAZIO e anotar.
4. Macerar uma amostra de folhas com 1 mL de Tampão.
5. Pipetar as amostras para cada um dos seus respectivos tubos.
6. Centrifugar as amostras a 13400 rpm por 10 min.
7. Coletar e preservar o sobrenadante em outro tubo, devidamente identificados, a 4°C.
8. Adicionar 1 mL dos tampões 1 ao tubo com o respectivo pellet. Agitar por 20 min.
9. Submeter os dois tubos a congelamento em N₂ líquido, seguido de aquecimento 37°C por 3 vezes.
10. Centrifugar os 2 tubos a 13400 rpm por 10 min.
11. Remover os sobrenadantes para dois novos tubo (Tp-S, Tp-P) e estocar a 4°C.

B. Quantificação protéica

- Diluir as amostras 3X, 5X e 10X, preparar 100 µL de cada diluição.
- A 20 µL das amostras diluídas, 3X, 5X e 10X, acrescentar 1,0 mL do reagente de Bradford, agitar, aguardar 10 min e ler a absorbância a 595 nm.
- Realizar o experimento em triplicata, e para o branco substituir a amostra protéica pelo tampão de lise utilizado.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 64 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Para determinar a concentração de proteínas, utilizar a curva-padrão do experimento anterior.

C. Preparo das amostras para eletroforese em gel

Adicionar 20 µL de TCA 75% a 100 µL das amostras, deixar na geladeira por 15 minutos, e centrifugar por 5 minutos a 13,400 rpm. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 500 µl de acetona (usar o vórtex). Centrifugar as amostras por 5 minutos a 13400 rpm. Descartar a acetona, ressuspender o pellet em 20 µl de tampão de amostra e ferver a amostra por 10 minutos.

5. Perguntas

Qual o objetivo da aula prática?

Quais seriam as propriedades mais importantes para um tampão de lise celular? Pense também nos tipos de moléculas que devem ser extraídas e estudadas.

Compare os dois tampões de lise.

Compare as amostras dos sobrenadantes e dos pellets.

Para que serve o ácido tricloroacético?

Prática 4 - Bioquímica Básica e Experimental

SDS-PAGE (Protein Acrylamide Gel Electrophoresis)

Soluções

Tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 com 0,4% de dodecil sulfato de sódio (SDS)

Tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8 com 0,4% de SDS

Tampão de corrida 10X (Tris, glicina, SDS)

Tampão de amostra (glicerol, SDS, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol)

Poliacrilamida 30%

Persulfato de amônia (APS)

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamina (TEMED)

Corante Azul de Comassie

TCA 75%

Acetona

Procedimento

- 1- Lavar as placas de vidro com etanol
- 2- Juntar as placas com espaçador
- 3- Colocar as placas no suporte adequado
- 4- Preparar o gel de separação 12% **sem APS e Temed**

Acrilamida 30% -	2 mL
Tampão Tris 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4% -	1,25 mL
Água destilada	1,70 mL
APS –	50 µL colocar por último
Temed –	6 µL colocar por último

- 5- Preparar o gel de empilhamento 5% **sem APS e Temed (apenas depois da polimerização do gel de separação)**

Acrilamida 30% -	0,42 mL
Tampão Tris 1,0 M, pH 6,8, 0,4% SDS –	0,34 mL
Água destilada –	1,72 mL
APS –	50 µL colocar por último
Temed –	6 µL colocar por último

- 6- Adicionar o gel de separação nas placas após a adição de APS e Temed
- 7- Nivelar o gel com etanol
- 8- Esperar o gel polimerizar
- 9- Preparar as amostras

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 66 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- a) Misturar 10 µL de cada amostra (P) com 5 µL com tampão de amostra e ferver a amostra por 10 minutos no banho maria.
- b) Adicionar 40 µL de TCA 75% a 200 µL de sobrenadante (S), deixar na geladeira por 15 minutos, e centrifugar por 5 minutos a 13,400 rpm. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 500 µl de acetona (usar o vórtex). Centrifugar as amostras por 5 minutos a 13,400 rpm. Descartar a acetona, ressuspender o pellet em 20 µl de tampão de amostra e ferver a amostra por 10 minutos.

10. Adicionar ao gel de empilhamento, o APS e o Temed e verter o conteúdo em cima do gel de separação. Colocar os pentes para formar os poços que irão conter as amostras. Esperar polimerizar.

11. Montar o gel no equipamento de corrida
12. Preparar o tampão de corrida
13. Retirar os pentes e pipetar as amostras em cada poço
14. Ligar o equipamento na fonte a 180 V por 50 minutos

Prática 5 - Bioquímica Básica e Experimental

Atividade Enzimática

Objetivo

Determinar o efeito do pH na atividade catalítica da α -glicosidase.

Reagentes

lisado de levedura
p-nitrofenil- α -glicosídeo (NP α Glc)
8 mM **em água**
tampão carbonato-bicarbonato
250 mM pH 11,0
tampão fosfato 200 mM pH 7,0
tampão borato 200 mM pH 8,0
tampão borato 200 mM pH 9,0
tampão citrato 200 mM pH 5,0
tampão citrato 200 mM pH 6,0

Materiais

banho de gelo
pipetadores
pipetas
ponteiras
suporte para tubos
tubos eppendorfs

Aparelhagens

banho 30°C
espectrofotômetro

1. Cultura de leveduras – inóculo inicial

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 67 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Em um erlenmeyer de 200 mL, adicionar 100 mL do meio YBD preparado anteriormente, inocular com o auxílio de um palito uma colônia de *Saccharomyces cerevisiae* e deixar a temperatura ambiente por 12h.

2. Lise celular

- 1 mL de cultura de leveduras será colocado em tubos eppendorfs e as amostras serão centrifugadas a 13400 rpm por 10 min
- Retirar o sobrenadante de todos os tubos e colocá-los em outros tubos eppendorfs
- Ao pellet adicionar 1000 µL de tampão de lise e ressuspender as células utilizando o vórtex.
- Usar 4 ciclos de congelamento e descongelamento com nitrogênio líquido para lisar as células. Centrifugar novamente a 13400 rpm por 10 min, e guardar o sobrenadante no gelo

2. Diluição do lisado (manter sempre no gel)

- Transferir 200 µL do lisado de levedura para um tubo de 2mL e identifica-lo como L10X.
- Adicionar 1,8 mL de água destilada gelada, homogeneizar suavemente. Manter no gelo.

3. Ensaio de atividade enzimática

- Preparar em banho de gelo, para cada pH, um conjunto de tubos de acordo com a tabela 1. Realizar o ensaio em duplicata.
- Misturar cuidadosamente.
- Adicionar o lisado de levedura (devidamente diluído)
- Agitar manualmente com cuidado.
- Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para um banho a 30°C, e incubar pelo tempo descrito na tabela 1.

- Ao retirar cada tubo do banho, interromper a reação pela adição de 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato, e agitar suavemente.
- Deixar os tubos em temperatura ambiente.
- Zerar o espectrofotômetro com água e ler as Abs a 420nm. Completar as tabelas 2 e 3.
- Determinar o pH ótimo da alfa-glicosidase.

pH = _____

Tabela 1

tubos	NP α Glc 8 mM (mL)	tampão _____ pH _____ (mL)	lisado diluído (mL)	tempo (min)
1	0,05	0,05	0,1	5
2	0,05	0,05	0,1	15
3	0,05	0,05	0,1	30

Tabela 2

pH = 5,0		pH = 6,0		pH = 7,0	
tubos	A420	tubos	A420	tubos	A420
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	

Tabela 3

pH = 8,0		pH = 9,0	

Perguntas:

Qual a reação catalisada pela enzima alfa-glicosidase? Qual a função dessa enzima? Ela é indispensável para a sobrevivência da levedura? Explique.

O que é *p*-nitrofenil-alfa-glicosídeo?

Como ocorre a detecção do produto?

Prática 6 - Bioquímica Experimental

Atividade enzimática com alfa-amilase

1 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

Alfa-amilase 0,1 mg/mL em cada tubo (Deixar 13 tubos prontos por aula com 1mL)

Adicionar 10uL em cada tubo (Deixar em 13 frascos pequenos para cada aluno)

- a) Prepare os seguintes tubos: separe 07 tubos para adicionar o amido conforme os volumes citados na tabela e completar o volume dos mesmos com a água (conforme tabela)

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Amido 1% (mL)	0,0	0,2	0,4	0,6	1,0	2,0	3,2
Água	3,2	3,0	2,8	2,6	2,2	1,2	0,0

Prática 7 – Bioquímica Básica e Experimental

Cromatografia de Troca Iônica

Tampões para cromatografia de troca iônica

Tampão de equilíbrio e lavagem: Acetato de sódio
0,1 M pH 5,0

Tampão de eluição: NaCl 0,5 M em acetato de
sódio 0,1 M pH 5,0

Tampão de equilíbrio e lavagem: Tampão Fosfato
0,1 M pH 6,8

SP Sepharose

DEAE Sepharose

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 70 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Tampão de eluição: NaCl 0,5 M em tampão
fosfato 0,1 M pH 6,8

Procedimento

1. Conectar a coluna à bomba peristáltica.
2. Equilibrar a coluna de SP Sepharose ou a coluna DEAE-Sephadex com o tampão de equilíbrio correspondente. Passe um volume de 50 mL.
3. Após o equilíbrio injetar 500 µL de extrato de levedura (pegar com o professor).
4. Lavar o conteúdo não retido na coluna com 50 mL de tampão de lavagem e coletar num tubo Falcon de 50 mL.
5. Eluir a proteína retida com o 20 mL de tampão de eluição, coletando frações de 1 mL (preparar antecipadamente tubos numerados 1-20).
6. Medir a absorbância de cada fração coletada nos comprimentos de onda 216 nm e 280 nm. Usar o tampão de eluição como branco (cuveta de quartzo). Devolver cada amostra ao tubo (**não descartar!!!**)
7. Manter os tubos com as amostras coletadas em **banho de gelo**.
8. Preparar um conjunto de tubos numerados de 1 a 20. Adicionar em cada tubo 100 µL de NPαGlc 8 mM e colocar os tubos em **banho de gelo**.
9. Adicionar em cada um destes tubos 100 µL das frações coletadas durante a cromatografia.
10. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para um banho de 30 °C.
11. Incubar os tubos por 10 min.
12. Ao remover os tubos, adicionar em cada um 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.
13. Agitar manualmente
14. Deixar os tubos em **temperatura ambiente**.
15. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
16. Ler as absorbâncias a 420 nm.
17. Construir um gráfico da absorbância *versus* números dos tubos.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 71 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

18. Uma vez identificados os tubos que contém atividade enzimática, reunir as frações (eluídas na cromatografia) correspondentes em um tubo “Falcon” identificado como **MATERIAL DEAE ou SP – Nome do grupo**.

Questões

A enzima a ser purificada possui um ponto isoelétrico (pI) de 5,8. De forma a purificá-la a partir do extrato bruto, temos a disposição uma coluna de SP Sepharose e uma DEAE Sephadex. A primeira é de troca catiônica e a segunda é de troca aniônica. Qual das duas escolher? Explique:

1. Explique o que é ponto isoelétrico de uma proteína.
2. Explique o princípio da cromatografia líquida de troca iônica.
3. Por que medimos a absorvância das frações coletadas em 216 e 280 nm?
4. Por que usar a cuveta de quartzo para ler as absorvâncias em 216 e 280 nm?

Prática 8 - Bioquímica Básica e Experimental

Detecção de Biomoléculas

1 – TESTE DA NINHIDRINA (solução alcoólica 0,1% de Ninhidrina)

SISTEMA DE REAÇÃO: Pipete 20 gotas das amostras desconhecidas em tubos de ensaio previamente identificados. Adicione 10 gotas do reagente e agite. Aqueça os tubos por cerca de 1 minuto em banho-maria a 95°C. Observe e anote os resultados. **AMOSTRAS:** Todas a 1%

Tabela 1: Reagentes do teste de Ninhidrina

(1) Ninhidrina
a. H ₂ O
b. Glutamina
c. Glicina
d. Albumina
e. AP

AP = Amostra “problema”

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 72 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

2 – TESTE DO BIURETO (Reagente de Biureto (macro))

SISTEMA DE REAÇÃO: Pipete 20 gotas das amostras em tubos de ensaios previamente identificados. Adicione 2 mL do reagente de Biureto e agite. Observe e anote os resultados. **AMOSTRAS:** Todas a 1%

Tabela 2: Reagentes do teste de Biureto

(2) Biureto	
a.	H ₂ O
b.	Glutamina
c.	Glicina
d.	Albumina
e.	AP

AP = Amostra “problema”

3 – Teste de Molisch (solução de α -naftol a 5% em álcool)

Sistema: Pipete 1 mL de cada uma das amostras em cada um dos tubos previamente já identificados. Adicione em cada um dos tubos 2 gotas do reagente do Molisch e **AGITAR BEM**. Adicione cuidadosamente, em cada tubo, 2 mL de H₂SO₄ concentrado, inclinando-o e deixando o ácido escorrer lentamente pelas paredes do tubo. Deixar os tubos em repouso e observar a formação de uma anel de cor violeta. Interpretar os resultados. **AMOSTRAS:** Todas 1%

Tabela 3: Reagentes do teste de Molish

(3) Molish	
a.	H ₂ O
b.	Glicose
c.	Sacarose
d.	Albumina
e.	AP.

AP = Amostra “problema”

4 – Teste de Fehling (Reativo de Benedict)

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 73 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

Sistema de reação: Pipete 1 mL de cada amostra em tubos de ensaio e acrescentar a cada um deles 1 mL do reagente.

Aquecer os tubos por mais ou menos 5 minutos, em banho-maria a 95°C. Observar e anotar os resultados.

AMOSTRAS: Todas 1%

Tabela 3: Reagentes do teste de Fehling

(4) Fehling
a. H ₂ O
b. Glicose
c. Sacarose
d. Frutose
e. AP.

AP = Amostra "problema"

5 – Teste de Seliwanoff (Reação para distinção entre aldoses e cetoses)

Sistema de reação: Pipete 1 mL de cada amostra em tubos de ensaio e acrescentar a cada um deles. Adicionar em todos os tubos de ensaio 1,5mL de ácido clorídrico e 0,5mL de reativo de Seliwanoff. Agitar cuidadosamente.

Aquecer os tubos por mais ou menos 5 minutos, em banho-maria a 95°C. Observar e anotar os resultados.

AMOSTRAS: Todas 1%

Tabela 4: Reagentes do teste de Seliwanoff

(5) Seliwanoff
f. H ₂ O
g. Glicose
h. Sacarose
i. Frutose
j. AP.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 74 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

ENZIMOLOGIA

Prática 1 – Enzimologia

Inibição enzimática

Material

Banho maria 37°C

Espectrometofotômetro (cubetas de plástico)

Cadinhos

Microcentrífuga

Vortex

Tripsina 3 mg/mL

Tampão Tris-HCl pH 8,0

TCA 20%

Azocaseína (Freezer)

NaOH 2M

Eppendorfs, micropipetas, estantes, ponteiras.

1. Preparação do extrato aquoso de sementes

- Selecionar as sementes e colocá-las no cadinho. Macerá-las em nitrogênio líquido.
- Encher um tubo eppendorf até a metade com o pó da maceração.
- Adicionar 1 mL de água destilada.
- Vortexar por 5 min e centrifugar a 13,4 x 1000 rpm por 10 min.
- Transferir o sobrenadante para um outro tudo. Este será o extrato aquoso da semente selecionada.

2. Determinação de atividade proteolítica (Proteases Alcalinas).

1.1- Atividade proteolítica controle

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 75 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Realizar o ensaio enzimático: em um tubo “eppendorf” adicionar 20 µl de enzima e 480 µl de tampão (em triplicata). Incubar por 15 min a 37°C e adicionar 200 µL de substrato azocaseína. Após o tempo de reação de mais 15 min acrescentar 300 µL de ácido tricloroacético a 20% (TCA), centrifugar a 3000 rpm por 15 min. Transferir 500 µL do sistema de reação para um outro tubo, adicionar 500µL de NaOH 2 M e ler a absorbância a 440nm.
- Os ensaios deverão ser realizados em triplicata, para o branco acrescentar azocaseína após o tempo de reação e seguir o protocolo ao acrescentar 300 µL de TCA 20%.

1.2- Efeito inibitório do extrato de semente

- Realizar o ensaio de inibição enzimática. Teste de três concentrações diferentes de inibidor.

No tubo 1, adicionar 20 µl de enzima, 380 µL de tampão, 100 µL de extrato de sementes

No tubo 2, adicionar 20 µl de enzima, 430 µL de tampão, 50 µL de extrato de sementes e 20 µL de água destilada

No tubo 3, adicionar 20 µl de enzima, 470 µL de tampão, 10 µL de extrato de sementes

- Incubar por 15 min a 37°C e adicionar 200 µL de substrato azocaseína. Após o tempo de reação de mais 15 min acrescentar 300 µL de ácido tricloroacético a 20% (TCA), centrifugar a 3000 rpm por 15 min. Transferir 500 µL do sistema de reação para um outro tubo, adicionar 500 µL de NaOH 2 M e ler a absorbância a 440nm.
- Os ensaios deverão ser realizados em triplicata

Prática 2 – Enzimologia

Determinação de atividade proteolítica (TRIPSINA).

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 76 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

1.1 - Atividade proteolítica – RESPEITE TODOS OS TEMPOS DE INCUBAÇÃO

- Realizar o ensaio enzimático: em um tubo “ependorf” adicionar 10 µl de enzima e 490 µl de tampão (em triplicata). Incubar por 15 min a 37°C e adicionar 200 µL de substrato azocaseína. Após o tempo de reação de mais 15 min acrescentar 300 µL de ácido tricloroacético a 20% (TCA), centrifugar a 3000 rpm por 15 min. Transferir 500µL do sistema de reação para um outro tubo, adicionar 500µL de NaOH 2 M e ler a absorbância a 440nm.
- Os ensaios deverão ser realizados em duplicata, para o branco acrescentar azocaseína após o tempo de reação e seguir o protocolo ao acrescentar 300 µL de TCA 20%.
- Expressar a atividade enzimática em U/mL (U: unidade de atividade enzimática): uma unidade de atividade enzimática será definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,1 a cada minuto de reação.
- Expressar a atividade em atividade específica (U/mg de proteína).

1.2 - Efeito do pH e temperatura na atividade proteolítica.

- Realizar a atividade da enzima em diferentes temperaturas (30, 40 e 50°C) e pH's (6, 7 e 8).

2.0- Curva padrão de proteína

- Preparar uma solução estoque de BSA (albumina sérica bovina) na concentração e 1mg/ml.
- Diluir a solução 10 X com tampão TRIS.

- Realizar o experimento em triplicata.
- Montar a curva padrão conforme a tabela abaixo:

Solução de BSA (µL)	mg de proteína	Água destilada (µL)	Abs. 595 nm
0		100	
10		90	
20		80	
40		60	
60		40	
80		20	
100		0	

- Fazer a média dos valores de absorbância, descontar o valor do branco e fazer a regressão linear, utilizando o programa Excel.

2.1- Quantificação de proteína

- A 100 µL de enzima enzimática acrescentar 1,0 mL do reagente de Bradford, agitar, aguardar 5 min. e ler a absorbância a 595 nm.
- Realizar o experimento em triplicata, para o branco substituir a amostra enzimática por água.
- Para determinar a concentração de proteínas utilizar a curva-padrão do experimento anterior.

Questões a serem entregues no final da aula

- 1.O que é a azocaseína? Como ela é utilizada para o teste de atividade da tripsina?
- 2.Qual a função da tripsina?

3. Qual a importância de se testar a atividade enzimática em diferentes pHs e diferentes temperaturas?
4. Quantificar uma enzima é uma etapa importante na caracterização de sua atividade, por que?
5. Como é realizado o processo de quantificação por meio do reagente de Bradford?
6. Por que devemos obter uma curva de calibração?

Prática 3 – Enzimologia

Fermentação Alcoólica

Material

Todo o material deverá estar limpo e autoclavado

Grãos de trigo

Levedura

Lúpulo

Moedor

2 Beckers de 1L autoclavados por grupo

1 Erlenmeyer de 1L autoclavado por grupo

Água destilada

Banho Maria a 65°C

Banho Maria Fervente

Gelo

Coedor

Termômetro

Balança

Compressa de Gaze

Açúcar

Procedimento

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 79 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- Moa o equivalente a 150 g de trigo
- Aqueça um Becker com 500 mL de água sem cloro a 65°C; e adicione os grãos moídos.
- Deixe o mosto cozinhar por 40 minutos
- Coe o mosto obtido (use a compressa de gaze fornecida), transfira-o para outro Becker e adicione 1 g de lúpulo. Ferva o mosto por mais 40 minutos
- Quando terminar o tempo de fervura do lúpulo desligue o fogo e resfrie este mosto até aproximadamente 30 graus.
- Transfira este mosto lupulado para o Erlenmeyer observando que o lúpulo não poderá acompanhar o mosto (use novamente a compressa de gaze). Ele deverá ser retirado.
- Enquanto o mosto resfria, tire o fermento da embalagem e adicione-o a um copo com água a 25°C. Coloque um pouco de açúcar para ver o fermento trabalhar. Após alguns minutos você verá uma espuma ser formada no nível superior no copo o que sinaliza que o fermento poderá ser adicionado ao mosto.
- Coloque o fermento no mosto, o fermentador (erlenmeyer) deverá sem tampado.
- Este mosto deverá ficar fermentando por cerca de 3 dias a uma temperatura entre 10°C e 21°C.

Perguntas

1. Qual a função da etapa de cozimento do mosto a 65°C? (Dica: qual o gosto do mosto?)
2. Qual a função do lúpulo?
3. Por que devemos resfriar o mosto?
4. Por que observamos uma espuma se formar ao “ativarmos” o fermento. O que significa ativar o fermento?
5. Qual a função da levedura?

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ **Roteiro de aulas Práticas** – Laboratório de Biologia Celular. Coordenação: Aline Braga. Universidade Católica de Brasília-UCB, 2013.

 Universidade Católica de Brasília	UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR	
Revisão 00	Emissão: 16/12/2022	Página 80 de 80
MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		

- ✓ ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS; Keith; WALTER, Peter, **Molecular biology of the cell**, 4ª edição Garland Science, New York 2002.
- ✓ DE ROBERTS, E. M. F.; HIB, Jose. **Bases da biologia celular e molecular**. Tradução por Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade; Sérgio Ferreira de Oliveira; Telma Maria Tenório Zorn. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.