

✕ UNIFAMINAS

APOSTILA DE AULAS PRÁTICAS

BIOLOGIA GERAL

VOLUME II

*Citologia, Genética e
Biologia Molecular*

EDITORES

Érica Mangaravite

Luciana de Andrade Agostinho

Christiane Mariotini-Moura

Fernando Augusto da Silveira

Maurício Alexander de Moura Ferreira



✕ UNIFAMINAS
APOSTILA DE AULAS PRÁTICAS

BIOLOGIA GERAL

VOLUME II

*Citologia, Genética e
Biologia Molecular*

EDITORES

Érica Mangaravite

Luciana de Andrade Agostinho

Christiane Mariotini-Moura

Fernando Augusto da Silveira

Maurício Alexander de Moura Ferreira

1ª Edição

Muriaé - MG, 2020



Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Cristina de Souza Maia- CRB6 2294

M266b

Mangaravite, Érica

Biologia geral: citologia, genética, biologia molecular. / Érica Mangaravite (edit.); Luciana de Andrade Agostinho (edit.); Christiane Mariotini-Moura (edit.); Fernando Augusto da Silveira (edit.); Maurício Alexander de Moura Ferreira (edit.) – Muriaé: UNIFAMINAS, 2020.

74 p., v.2

ISBN: 978-65-88341-00-1

1. Biologia geral. 2. Apostila de aulas práticas. 3. Citologia. 4. Genética. 5. Biologia molecular. I. Mangaravite, Érica (edit.). II. Agostinho, Luciana de Andrade (edit.). III. Mariotini-Moura, Chistiane, (edit.). III. Silveira, Fernando Augusto da (edit.). IV. Ferreira, Maurício Alexander de Moura (edit.). V. Título.

CDD 571.6

SUMÁRIO

Prefácio.....	4
Sobre os autores.....	6
Parte I – Citologia Básica.....	8
Prática 1 - Observando as células procarióticas e eucarióticas.....	8
Prática 2 - Membrana plasmática: especializações.....	12
Prática 3 - Membrana plasmática: permeabilidade seletiva e osmose.....	15
Prática 4 - Energia: Mitocôndrias.....	20
Prática 5 - Energia: liberação de CO ₂ e etanol através da fermentação.....	24
Prática 6 - Citoesqueleto: cílios e flagelos.....	27
Prática 7 - Citoesqueleto: Movimentação de cloroplastos de células de Elodea.....	31
Prática 8 - Organelas: Retículo endoplasmático.....	34
Prática 9 - Visualização dos núcleos em diferentes tipos celulares.....	37
Parte II – Genética e Biologia Molecular.....	40
Prática 10 - Mitose e cromossomos metafásicos de raiz de cebola germinadas.....	40
Prática 11 - Técnica de cariótipo com coloração por panótico.....	45
Prática 12 - Extração de DNA de fruta.....	52
Prática 13 - Planejamento da corrida de PCR.....	57
Prática 14 - Gel de agarose e corrida eletroforética.....	67

PREFÁCIO

A iniciativa em produzir essas apostilas surgiu quando entrei no Centro Universitário UNIFAMINAS (Muriaé-MG) e comecei a lecionar a disciplina de Biologia Geral, em março de 2019. Percebi que uma apostila poderia ser muito útil aos demais professores dessa mesma disciplina e, principalmente, que poderia auxiliar no processo de aprendizagem dos estudantes. Ao conversar com algumas professoras (Fernanda Mara Fernandes, Christiane Mariotini-Moura, Isabela Resende Pereira, Luciana de Andrade Agostinho e Livia Loiola) recebi um retorno positivo para colaboração. Tivemos a ideia de convidar estudantes (e outros recém-formados) do curso de Biomedicina (curso em que estou alocada) para também participarem e, felizmente, muitos aceitaram. Outra parceria extremamente importante foi a da professora Erika Takagi Nunes (Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Alegre-ES). Ela ministrou a disciplina de Histologia e Embriologia, que tive o prazer de presenciar, quando era caloura do curso de Ciências Biológicas. O meu encantamento pela disciplina foi tamanho que me tornara a monitora pelos dois semestres seguintes. Fiquei extremamente feliz nessa parceria, por ela ter feito parte da minha história acadêmica. E a professora Erika convidou seu atual monitor da disciplina, que também nos enriqueceu bastante. Após receber todas as práticas, previamente testadas, duas pessoas também foram extremamente importantes no processo de formatação, diagramação e ilustração: Fernando Augusto da Silveira e Maurício Alexander de Moura Ferreira que são, pesquisador colaborador e mestrando, respectivamente, do programa de pós-graduação de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa,-MG).

No início, a apostila abrangeia tópicos de Citologia, Histologia e Embriologia. Entretanto, ao longo do ano, o material intitulado **Apostila de Aulas Práticas: Biologia Geral** foi ganhando mais tópicos e colaborações, até ser subdividido, didaticamente, em três volumes. O Volume I **Introdução às Práticas de Laboratório** consiste de quatro práticas introdutórias para que o estudante possa iniciar em um ambiente de laboratório. O Volume II **Citologia, Genética e Biologia Molecular** é o maior e possui 14 práticas que abordam na primeira parte temas de Citologia e, na segunda parte, temas de Genética e Biologia Molecular. Por fim, o Volume III **Histologia e Embriologia** possui dez práticas e que também estão subdivididas em duas partes.

Dessa forma, apresentamos a vocês, estudantes da área de ciências biológicas e da saúde, um material didático, com resumos atuais e questões para fixação de cada tópico abordado. Posso garantir que todos os autores e editores (profissionais e estudantes) se empenharam bastante para oferecer um material que possa facilitar no processo de ensino e aprendizagem! Espero que lhes seja útil, que aproveitem bastante, mas que não se esqueçam de que vocês são os principais atores nesse processo!

Professora Érica Mangaravite

SOBRE OS AUTORES

Bianca de Matos Moreira (autora)

Biomédica (UNIFAMINAS), Muriaé, Minas Gerais, biabiubis@outlook.com

Caio Agostini Calheiros Grosso (autor)

Biomédico (UNIFAMINAS), auxiliar de laboratório do setor de Análise Clínicas do Hospital do Câncer de Muriaé (Fundação Cristiano Varella), Muriaé, Minas Gerais, caioagostiny@gmail.com

Christiane Mariotini-Moura (autora e editora)

Biomédica habilitada em Análises Clínicas (Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG), mestrado e doutorado em Biologia Celular e Estrutural (UFV), pós doutora em Bioquímica Aplicada (UFV), professora titular do Centro Universitário UNIFAMINAS, Muriaé, Minas Gerais, chrisbiomed@gmail.com

Érica Mangaravite (autora e editora)

Bióloga (UFES), mestre e doutora em Genética e Melhoramento (UFV), pós-doutora em Microbiologia Agrícola (UFV), professora titular do Centro Universitário UNIFAMINAS, Muriaé, Minas Gerais, erica.mangaravite@gmail.com

Fernanda Mara Fernandes (autora)

Farmacêutica (USS), farmacêutica bioquímica (UFJF), licenciada em Ciências Biológicas (UNIFRAN), especialista em Controle Biológico de Produtos Farmacêuticos e Correlatos (UFJF), mestre e doutora em Ciências Agrárias (UFV), professora titular do Centro Universitário UNIFAMINAS, Muriaé, Minas Gerais, fernandauss@hotmail.com

Fernando Augusto da Silveira (editor, revisor e diagramação)

Biólogo (UFOP), mestre e doutor em Microbiologia Agrícola (UFV), pesquisador colaborador do Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola (UFV), Viçosa, Minas Gerais, silveira.daf@gmail.com

Isabela Aparecida de Souza (autora)

Estudante do curso de Biomedicina (UNIFAMINAS), Muriaé, Minas Gerais, souzazabs@hotmail.com

Lais Gonçalves Parvan (autora)

Biomédica (UNIFAMINAS), Muriaé, Minas Gerais, laisgoncalvesparvan@gmail.com

Luciana de Andrade Agostinho (autora e editora)

Biomédica (USS), mestre e doutora em Neurologia (UNIRIO), pós doutora em Genética Médica (UBC Canadá), professora titular e coordenadora de curso de Biomedicina (UNIFAMINAS), supervisora do setor de Biologia Molecular Hospital do Câncer de Muriaé (Fundação Cristiano Varella), Muriaé, Minas Gerais, polucita@yahoo.com.br

Maria Eduarda Leandro Assis (autora)

Biomédica (UNIFAMINAS) Muriaé, Minas Gerais, eduardaaleandroassis@gmail.com

Maurício Alexander de Moura Ferreira (editor, revisor e desenho gráfico)

Biólogo (UFES), mestrando em Microbiologia Agrícola (UFV), Viçosa, Minas Gerais, mauricioferreira421@gmail.com

Rúzivia Pimentel Oliveira (autora)

Biomédica (UNIFAMINAS), mestranda em Microbiologia Agrícola (UFV), Viçosa, Minas Gerais, ruzivia@gmail.com

Suely Rodrigues dos Santos (colaboradora)

Médica (Escola de Medicina da Fundação Técnica Educacional Souza Marques - EFTESM), mestre em Medicina (Endocrinologia) (PUC-RJ), doutora em Morfologia (UNIFESP), responsável pelo Laboratório de Citogenética da UNIRIO e médica do Ambulatório de Genética da UNIRIO, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, surodosan@yahoo.com.br

Tiago César Gouvêa Moreira (autor)

Biomédico (UNIFAMINAS), auxiliar de laboratório do setor de Biologia Molecular do Hospital do Câncer de Muriaé (Fundação Cristiano Varella), Muriaé, Minas Gerais, tiagoocesar@gmail.com

PRÁTICA 1 - OBSERVANDO AS CÉLULAS PROCARIÓTICAS E EUCARIÓTICAS

Autores: Maria Eduarda Leandro Assis, Rúzivia Pimentel Oliveira, Christiane Mariotini-Moura

INTRODUÇÃO

As células são divididas em dois grupos principais, baseados na forma que se encontra seu material genético. As células procarióticas (exemplo: célula bacteriana) não contêm um envelope nuclear que delimita o espaço do seu material genético, logo, o mesmo se encontra disperso pelo citoplasma da célula. Já as células denominadas eucarióticas (exemplo: célula animal) possuem um envoltório (carioteca) que delimita o núcleo, separando o seu material genético do citoplasma (COOPER, 2007).

Geralmente as células bacterianas são menores medindo cerca de 0,5 a 2 μm de diâmetro e mais simples que as células animais que medem em média de 10 a 50 μm de diâmetro, além disso, seu genoma é bem menos complexo e não há organelas citoplasmáticas ou um citoesqueleto (FERNANDES, 2017).

Apesar das diferenças, os mecanismos moleculares básicos que controlam a vida de ambas são os mesmos, indicando a existência de um ancestral comum para todas as células.

EPI

Luvas e jaleco.

OBJETIVOS

Analisar microscopicamente células eucariontes presentes em bolores de pão, identificando suas características morfológicas.

MATERIAL

- Pão com bolor;
- Lâminas e lamínulas;
- Bisturi;
- Papel toalha;
- Microscópio;
- Solução salina;
- Solução de azul de metileno.

PROCEDIMENTOS

1. Pingar uma gota de solução salina sobre a lâmina;
2. Com a ajuda do bisturi, retire uma pequena quantidade do bolor presente no pão e coloque sobre a lâmina e espalhe de forma homogênea;
3. Pingue uma gota de azul de metileno;
4. Adicione a lamínula e remova o excesso de corante com papel toalha;
5. Observar ao microscópio óptico, passando da menor para a maior objetiva (antes de usar a de 100x aplique o óleo de imersão).

OBJETIVOS

Analisar microscopicamente células procariontes de uma colônia bacteriana (Figura 1.1), identificando suas características morfológicas.

MATERIAL

- Lâmina;
- Solução salina;
- Bico de Bunsen;
- Colônias bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- Alça de platina;
- Água destilada;
- Violeta Geniciana-Gram – 1%;
- Lugol Fraco-Gram-0,3%I/0,7%KI;
- Álcool 95%;
- Fucsina Fenicada-Gram 0,1%;
- Papel toalha.

PROCEDIMENTOS

1. Pingar uma gota da solução salina sobre a lâmina;
2. Flambar a alça de platina no bico de Bunsen, espere esfriar antes de retirar uma pequena colônia bacteriana da placa de Petri;
3. Esfregar a alça sobre a lâmina com salina, de forma homogênea;
4. Fixar o material na lâmina no bico de Bunsen passando 3x pelo Bico de Bunsen;
5. Cobrir a lâmina com o Cristal violeta durante 1 minuto e lavar em água destilada corrente;
6. Cobrir a lâmina com Lugol durante 1 minuto e lavar em água destilada;
7. Lave a preparação com álcool 95% (rapidamente) e lave o excesso de álcool novamente com água;
8. Cobrir a lâmina com Fucsina durante 30 segundos e lavar em água corrente;

9. Após a preparação secar (ao ar ou com papel toalha), observar ao microscópio óptico, passando da menor para a maior objetiva (antes de usar a de 100x aplique o óleo de imersão).

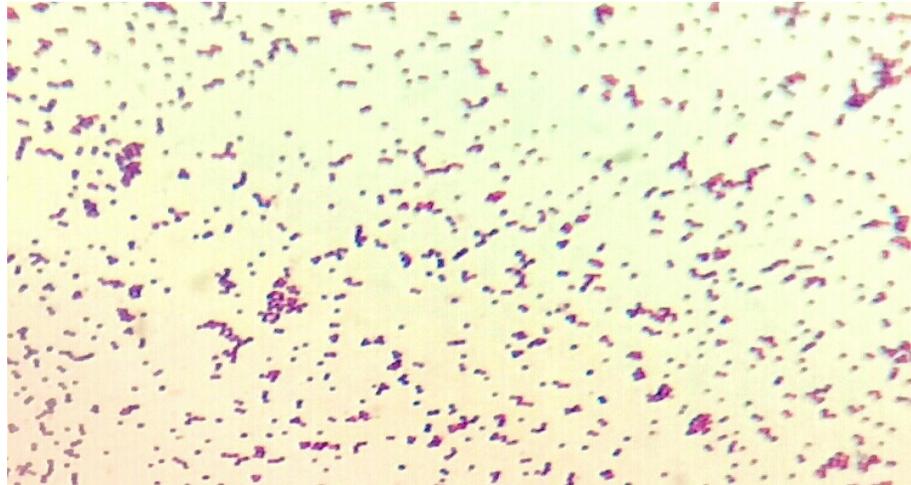


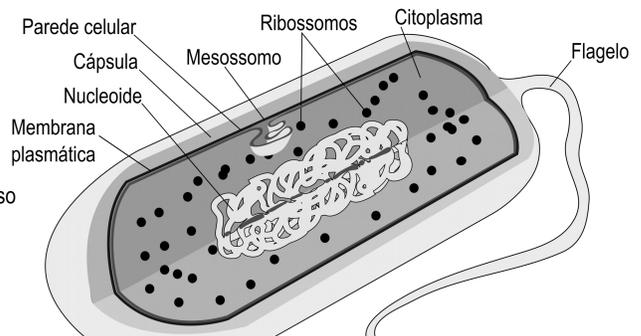
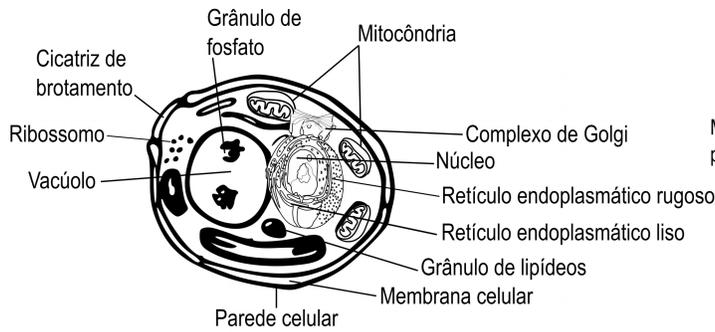
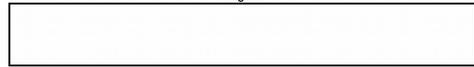
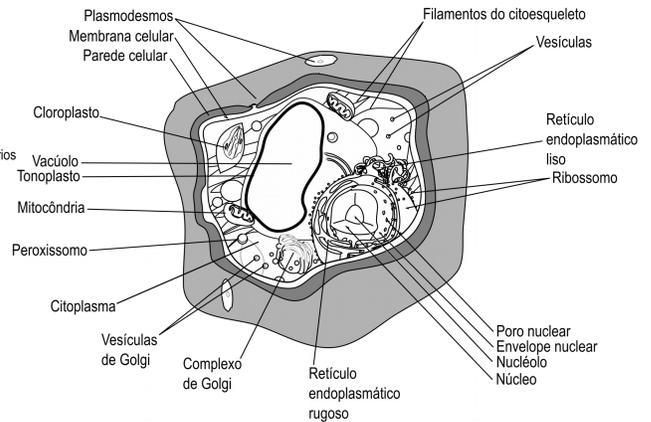
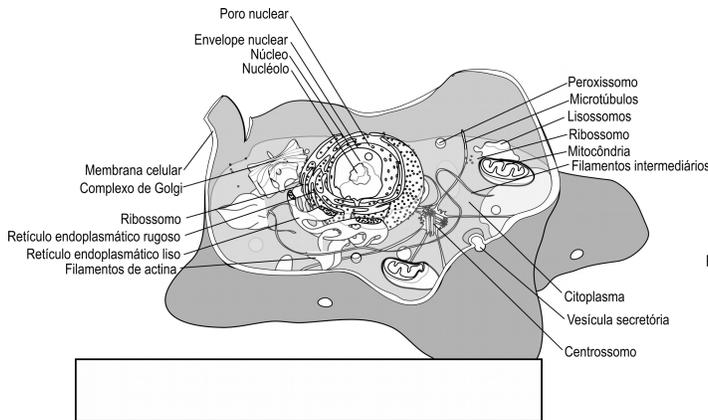
Figura 1.1: Células bacterianas Gram-positivas; Aumento de 100x. Fonte: Material preparado em laboratório do UNIFAMINAS-Muriaé-MG.

QUESTÕES

1) Quais são as principais diferenças visualizadas nas células dos procedimentos 1 e 2?

2) Qual estrutura celular é visualizada nas células do procedimento 1, porém não é possível de se visualizar no procedimento 2?

3) A quais grupos os esquemas celulares a seguir pertencem? Justifique sua resposta.



REFERÊNCIAS

COOPER, M.G. HAUSMAN, E.R. **Á Célula, uma abordagem molecular**. 3ª ed. ISBN: 0-87893-214-3. Editora: artmed. 2007.

FERNANDES, G.M; VAINI, O.J; CRISPIM, M.B; TEIXEIRA, Z.T. **Práticas de biologia celular**. Universidade Federal da Grande Dourados. Editora: Triunfal Gráfica e Editora. p.17; p.47 ISBN: 978-85-8147-111-2. 2017.

PEZZI, A; GOWDAY, O.D; MATTOS, S.N. **Biologia: Citologia, embriologia e histologia**. Vol.1- Ed. FTD S.A. São Paulo, 2010. ISBN: 978-85-322-7303-1

PRÁTICA 2 - MEMBRANA PLASMÁTICA: ESPECIALIZAÇÕES

Autores: Rúzivia Pimentel Oliveira, Maria Eduarda Leandro Assis, Christiane Mariotini-Moura

INTRODUÇÃO

As membranas plasmáticas apresentam especializações com a função de facilitar a adesão mecânica e a comunicação celular, como é o caso dos desmossomos, dos hemidesmossomos, das zônulas de adesão, zônulas de oclusão e das junções GAP.

Os desmossomos (Figura 2.1) têm a função de unir uma célula à outra através de uma placa de ancoragem, na qual se inserem filamentos intermediários. Os hemidesmossomos, por sua vez, têm a função de adesão da célula com a lâmina basal. Eles são semelhantes ao desmossomos, contudo, na placa de ancoragem dos hemidesmossomos, ao invés das caderinas, os filamentos de proteínas são da família das integrinas..

As zônulas de adesão também têm a finalidade de unir uma célula à outra, formando um cinturão onde microfilamentos de actina se inserem através das proteínas caderinas, deixando, porém, um pequeno espaço entre as membranas celulares. Já nas zônulas de oclusão, as membranas celulares se unem integralmente através das proteínas ocludinas e claudinas, para a inserção dos microfilamentos, bloqueando a passagem de substâncias. As junções do tipo GAP (comunicantes) auxiliam na comunicação celular através das proteínas conexinas que formam poros, permitindo a passagem de informações entre as células.

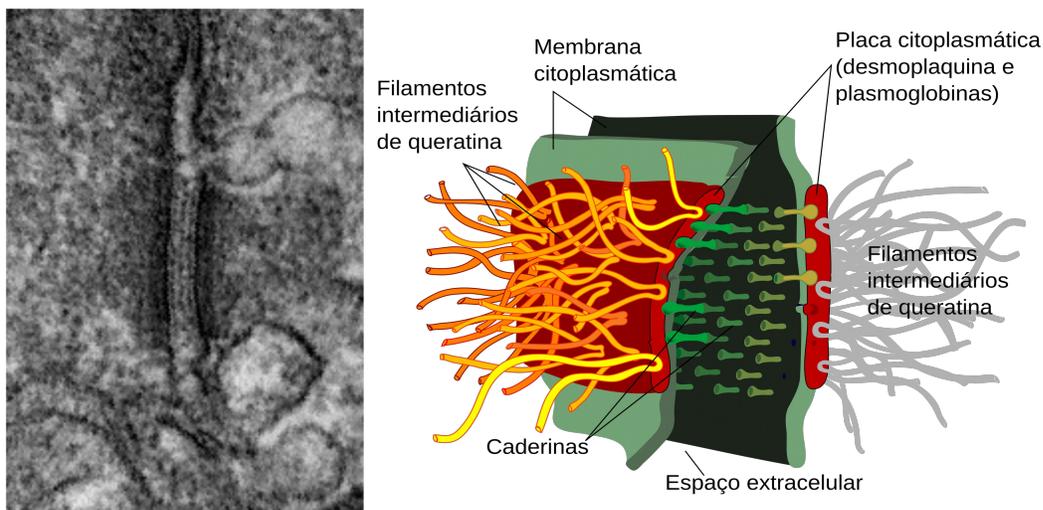


Figura 2.1: Desmossomos em fotomicrografia eletrônica e esquema.

Há também outro tipo de especializações, essas podem ser encontradas na membrana apical de algumas células, como as microvilosidades, os cílios e os estereocílios. As microvilosidades estão presentes no epitélio do intestino e possuem a função de absorção de moléculas. Os cílios são estruturas móveis que possuem um movimento de vai e vem e podem ser encontrados, por exemplo, nas tubas uterinas. Os estereocílios por sua vez se assemelham com os cílios, porém imóveis, e sua função é a mesma das microvilosidades, ou seja, aumentam a superfície de contato, podendo ser encontrados nos canais deferentes e no epidídimo.

OBJETIVO

Visualização de algumas especializações de membrana em lâminas permanentes.

EPI

Jaleco.

MATERIAL

- Lâmina permanente de traqueia;
 - Lâmina permanente de intestino delgado;
 - Lâmina permanente de estômago;
 - Lâmina permanente de tuba uterina;
 - Lâmina permanente de epidídimo;
 - Lâmina permanente de endocérvice;
 - Microscópio óptico;
 - Óleo de imersão.
-

PROCEDIMENTOS

1. Coloque as lâminas no microscópio óptico, passando da objetiva de menor aumento para a de maior (antes de usar a de 100x aplique o óleo de imersão) (Figura 2.2).



Figura 2.2: Lâmina de intestino grosso mostrando presença das microvilosidades. Aumento 10X. Fonte: Material preparado em laboratório do UNIFAMINAS-Muriaé-MG.

QUESTÕES

1) Desenhe as estruturas observadas no microscópio óptico.

--

2) Quais as diferenças estruturais e funcionais entre os desmossomos e os hemidesmossomos.

3) Diferencie zônula de oclusão de zônula de adesão.

REFERÊNCIAS

JUNQUEIRA, L.C. CARNEIRO, J. Histologia Básica. Ed.13°. Editora: Guanabara. ISBN: 9788527731812; 2017.

CAMARGO, A.F. DOMINGUES, E.C.C. Roteiro de aula prática da disciplina de biologia celular. Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba-SP. 2014

PRÁTICA 3 - MEMBRANA PLASMÁTICA: PERMEABILIDADE SELETIVA E OSMOSE

Autores: Rúzivia Pimentel Oliveira, Maria Eduarda Leandro Assis, Christiane Mariotini-Moura

INTRODUÇÃO

A membrana plasmática é uma estrutura celular que possui uma permeabilidade seletiva, ou seja, tem a capacidade de controlar a entrada e a saída de substâncias na célula. Para que uma substância passe pela membrana é necessária uma via de passagem, seja através da bicamada lipídica ou de uma proteína. Além disso, esse processo pode ser realizado de maneira passiva, sem o gasto de energia ou de maneira ativa, com gasto de energia. O transporte passivo independe do consumo de energia, ocorrendo a favor do gradiente de concentração, e pode ser realizado através da difusão simples, difusão facilitada (com auxílio de um transportador de membrana (permease) de natureza proteica) e da osmose (difusão da água através da membrana). O transporte ativo por sua vez depende de um transportador de membrana e da energia fornecida pela molécula de ATP ou por transporte acoplado, ocorrendo contra o gradiente de concentração.

A manutenção de suas funções só pode ocorrer se a membrana celular permanecer íntegra. Tratamentos com solventes orgânicos, por exemplo, dissolvem lipídios, desestruturando a bicamada e, com isso, alterando a permeabilidade da membrana. Altas temperaturas também afetam a integridade das membranas, desnaturando a maioria das proteínas celulares, incluindo aquelas envolvidas no transporte de substâncias.

As células vegetais são adaptadas a viver em um ambiente hipotônico, mas não se rompem graças à resistência da parede celular. Em meio hipertônico, perdem água, sofrendo uma retração, denominada plasmólise. A célula se recupera rapidamente se colocada em um meio diluído novamente ou água pura. Essa recuperação é denominada desplasmólise.

OBJETIVOS

- Analisar a morfologia das hemácias frente a diferentes concentrações de soluções salinas, com intuito de verificar o processo de osmose em uma célula animal (Figura 3.1);
- Analisar o efeito de diferentes concentrações de soluções salinas, com intuito de verificar o processo de plasmólise e desplasmólise em uma célula vegetal (Figura 3.2);
- Observar o efeito de um solvente orgânico e da temperatura sobre a permeabilidade das membranas celulares.

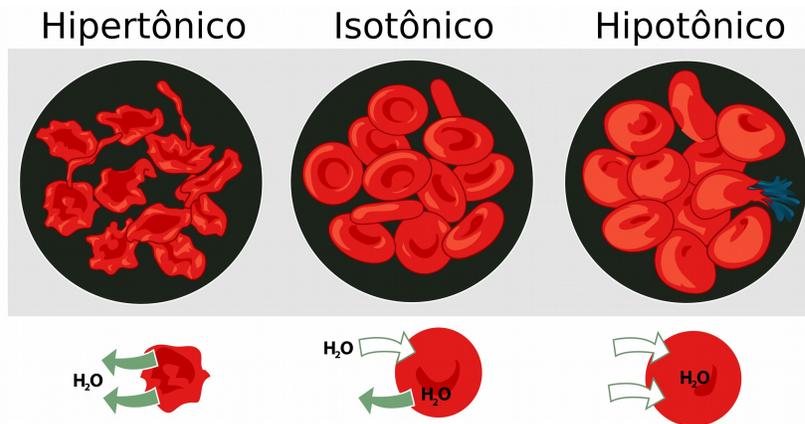


Figura 3.1: Esquema representando as alterações das hemácias em diferentes meios (hipertônico, isotônico e hipotônico).

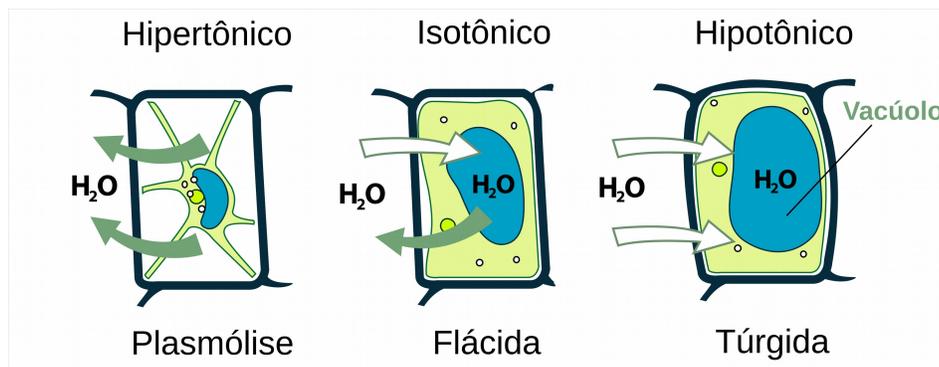


Figura 3.2: Esquema representando as alterações das células vegetais em diferentes meios (hipertônico, isotônico e hipotônico).

EPI

Luvas e jaleco.

MATERIAL

- Algodão;
- Álcool 70%;
- Acetona;
- Água destilada;
- Lancetas descartáveis;
- Cebola e beterraba;
- 6 lâminas (por grupo);
- 6 lamínulas (por grupo);
- Soro fisiológico (NaCl 0,9%);
- Solução hipertônica (solução saturada de 3 a 6% de NaCl ou açúcar);
- 6 Pipetas Pasteur;
- 7 tubos de ensaio (por grupo);
- 1 Béquer 50 mL (por grupo);

- 1 Pipeta graduada de 5 mL (por grupo);
- Papel filtro;
- Filme plástico;
- Faca ou estilete;
- Pinça;
- Banho-maria aquecido a 50 °C;
- Caneta para escrever em vidraria;
- Recipiente para descarte;
- Microscópio óptico.

PROCEDIMENTO 1 – OSMOSE EM CÉLULA ANIMAL

1. Fazer a antissepsia do dedo indicador com algodão embebido em álcool 70%;
2. Com auxílio da lanceta descartável, puncionar o dedo indicador;
3. Colocar uma gota de sangue em cada uma das 3 lâminas de vidro;
4. Pingar uma gota de soro fisiológico na lâmina nº 1 e cobrir com uma lamínula;
5. Pingar uma gota de solução hipertônica na lâmina nº 2 e cobrir com lamínula;
6. Pingar uma gota de solução hipotônica (água destilada) na lâmina nº 3 e cobrir com lamínula;
7. Observar as lâminas no microscópio óptico. Inicie pela lâmina nº 1.

PROCEDIMENTO 2 – OSMOSE EM CÉLULA VEGETAL

1. Retire um fragmento da epiderme inferior de cebola e coloque-a sobre a lâmina;
2. Cubra com uma gota de água destilada e lamínula;
3. Observe ao microscópio óptico em 10x e 40x.
4. Em seguida retire a lamínula, seque o excesso de água e coloque uma gota de solução NaCl 3,0 a 6,0% sobre a epiderme;
5. Observe ao microscópio óptico em 10X e 40X.
6. Em seguida retire a lamínula e transfira a epiderme para uma lâmina limpa com duas gotas de água destilada;
7. Observe ao microscópio óptico em 10X e 40X.

PROCEDIMENTO 3 – EFEITO DO SOLVENTE ORGÂNICO

1. Identifique um tubo com o nº 1 e adicione 4 mL de água;
2. Identifique um tubo com o nº 2 e adicione 2 mL de água e 2 mL de acetona;
3. Adicione, a cada um dos tubos, um pedaço pequeno de beterraba (+ou- 1cm) lavado em água corrente;
4. Aguarde cerca de 15 a 30 min (agitando a cada 10 min) e verifique o extravasamento do pigmento em cada tubo.

PROCEDIMENTO 4 – EFEITO DO CALOR

1. Identifique outros dois tubos com o nº 3 e nº 4 (contendo 4 mL de água em cada);
2. Adicione, a cada um dos tubos, um pedaço pequeno de beterraba (+ou- 1cm) lavado em água corrente;
3. Mantenha o tubo nº 3 em repouso por 15 min em temperatura ambiente;
4. Exponha apenas o tubo nº 4 ao calor em banho-maria (mínimo 50°C);
5. Observe ambos os tubos ao longo do tempo e compare o extravasamento do pigmento em cada tubo.

QUESTÕES

- 1) Descreva o que é um meio isotônico, hipertônico e hipotônico e diga em quais lâminas as hemácias se encontram nesses meios respectivamente.

- 2) Por que as células vegetais não se romperam após as alterações na osmolaridade do meio?

- 3) Qual a relação entre a hidrofobicidade de um solvente e sua capacidade de causar danos às membranas?

4) Como a exposição a temperaturas elevadas causa danos às membranas?

REFERÊNCIAS

DESSEN, E.M.B e OYAKAWA, Jorge. Observação de osmose em células vegetais. Centro de Estudos do Genoma Humano. Universidade de São Paulo. São Paulo. Disponível em: https://genoma.ib.usp.br/sites/default/files/protocolos-de-aulas-praticas/observacao_osmose_cel_vegetais_web.pdf. Acesso em 04 de março de 2020.

GALVÃO, T.B.; FERREIRA, D.A.N.M.; CARVALHO, L.E.F.; REZENDE, N.C.C.; VOIGT, E.L. Protocolo acessível para aula prática sobre fatores físicos e químicos que afetam a integridade das biomembranas. Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular. 2012. ISSN: 1677-3118.

LOPES, S. BIO. Ed.1°. Editora:Saraiva.ISBN:85-02-04031-6. São Paulo - SP. 2002.

PEZZI, A; GOWDAY, O.D; MATTOS, S.N. Biologia: Citologia, embriologia e histologia. Vol.1- Ed. FTD S.A. São Paul, 2010. ISBN: 978-85-322-7303-1

POZZOBON, A. Biomedicina na prática: da teoria à bancada. Ed.1°. Editora: UNIVATES. ISBN: 978-85-8167-224-3. Lajeado - RS. 2017.

PRÁTICA 4 - ENERGIA: MITOCÔNDRIAS

Autores: Maria Eduarda Leandro Assis, Rúzivia Pimentel Oliveira, Fernanda Mara Fernandes

INTRODUÇÃO

A mitocôndria é uma organela celular cuja função é transformar a energia dos alimentos em energia útil e transportável às células, através da molécula adenosina-trifosfato (ATP) evento que ocorre durante o ciclo de Krebs, sendo considerada assim uma verdadeira “casa de forças” das células, pois produzem energia para todas as atividades celulares (JUNQUEIRA, 2000).

Essas organelas possuem seu próprio material genético assim como sistema de transcrição e tradução, contendo ribossomos sendo capaz de sintetizar suas próprias proteínas. Devido a essas características alguns cientistas acreditam que a mitocôndria era uma bactéria que fora incorporada pelas células eucarióticas através de um processo de endossimbiose (OVALLE, 2008).

Cada mitocôndria é envolta por duas membranas celulares, que dão origem a compartimentos conhecidos como matriz e o espaço intermembrana, que desempenham importantes funções durante o Ciclo de Krebs (JUNQUEIRA, 2017). O número de mitocôndrias pode variar de uma célula para outra devido a sua necessidade energética, como é o caso de células musculares, que necessita de uma maior síntese de ATP e conseqüentemente, maior é o número de mitocôndrias (FERNANDES, 2017).

OBJETIVO

Verificar a presença das mitocôndrias no citoplasma dos leucócitos (Figura 4.1) e conhecer a morfologia dessas organelas citoplasmáticas.

EPI

Luvas e jaleco.

MATERIAL

- Lâminas e lamínulas;
- Papel filtro;
- Conta-gotas pipeta ou pipeta de Pasteur;
- Microlancetas descartáveis e estéreis;
- Palitos de madeira;
- Álcool iodado (para desinfecção dos dedos);
- Corante Verde Janus;
- Cronômetro.

PROCEDIMENTOS

1. Colocar uma gota do corante verde janus sobre a lâmina e esperar cerca de 10 minutos;
2. Passar algodão embebido em álcool iodado no dedo indicador;
3. Com o auxílio de microlanceta descartável, furar a ponta do dedo indicador;
4. Acrescentar uma gota de sangue sobre o resíduo do corante na lâmina, misturando com palito de madeira;
5. Cobrir cuidadosamente com lamínula, evitando a formação de bolhas de ar;
6. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente;
7. Esquematizar o que for observado nos aumentos de 100x, 400x e 1000x.

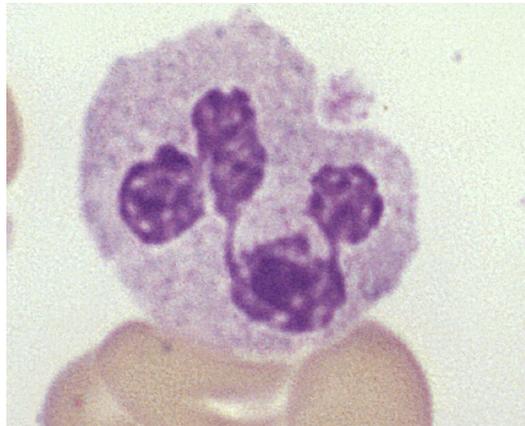
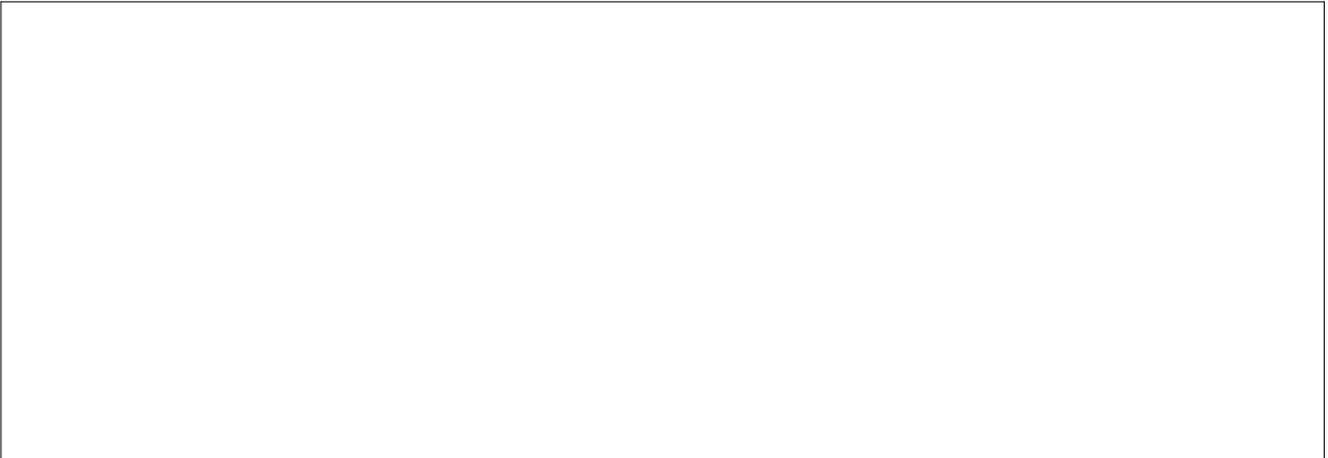


Figura 4.1: Esquema de um leucócito no aumento de 1000 x.

QUESTÕES

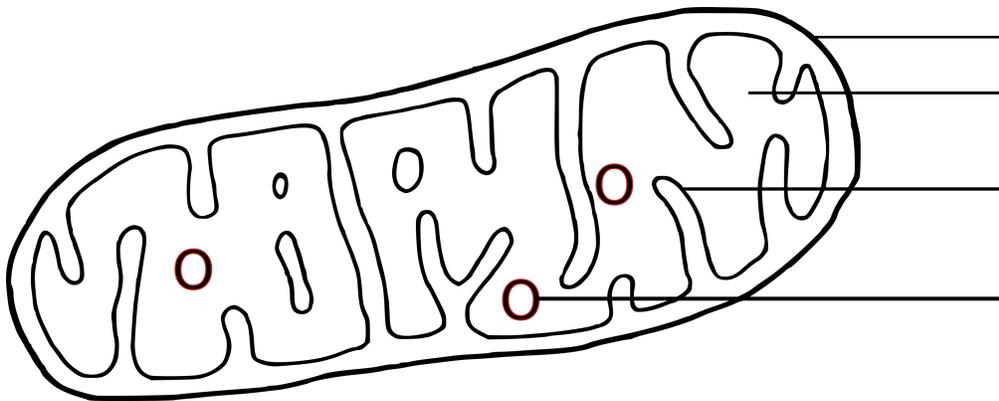
- 1) Descreva as mitocôndrias observadas.

2) Desenhe a estruturas observadas.



3) Descreva sobre o total de mitocôndrias nos diferentes tipos celulares.

4) Coloque o nome das estruturas apontadas na imagem abaixo.



REFERÊNCIAS

FERNANDES, G.M; VAINI, O.J; CRISPIM, M.B; TEIXEIRA, Z.T. Práticas de biologia celular. Universidade Federal da Grande Dourados. Editora: Triunfal Gráfica e Editora. p.17; p.47 ISBN: 978-85-8147-111-2. 2017

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 7. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 339 p.

JUNQUEIRA, L.C. CARNEIRO, J. Histologia Básica. Ed.13°. Editora: Guanabara. ISBN: 9788527731812; 2017.

OVALLE, W.K.; NAHIRNEY, P.C. Netter Bases da Histologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 30

PRÁTICA 5 - ENERGIA: LIBERAÇÃO DE CO₂ E ETANOL ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO

Autores: Maria Eduarda Leandro Assis, Rúzivia Pimentel Oliveira, Fernanda Mara Fernandes

INTRODUÇÃO

A fermentação é um processo de respiração anaeróbico, que ocorre graças à presença de determinada enzimas, os organismos capazes de realizar o processo de fermentação são divididos em dois grupos, um que não suportam a presença do oxigênio classificados como anaeróbicos obrigatórios e outros que respiram na presença de oxigênio e na ausência deles classificados como anaeróbicos facultativos (PEZZI, GOWDAY, MATTOS, 2010).

Existem dois tipos de processos fermentativos a lática na qual o produto final é o ácido láctico e não há a produção de CO₂, esse tipo de processo ocorre nos iogurtes pela ação de bactérias e nas células musculares quando diminui ou cessa o suprimento de oxigênio e a glicose passa então a ser quebrada de forma anaeróbica (TORTORA, FUNKE, CASE, 2017).

O outro tipo, e o mais comum, é a fermentação alcoólica, realizada principalmente pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, sendo o produto final dessa reação etanol e o CO₂. Em vista desse processo, o ser humano se beneficia dessa capacidade fermentativa das leveduras para produzir cerveja, vinho, cachaça, pães e outros alimentos (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008).

OBJETIVO

Visualizar a produção de CO₂ e etanol pelo processo de fermentação alcoólica com fermento biológico.

EPI

Luvas e jaleco.

MATERIAL

- Fermento biológico fresco;
- 6 tubos de ensaio com tampas;
- 6 balões de borracha (bexigas);
- Açúcar (sacarose);
- Montagem para banho-maria;
- Recipiente com gelo;
- Água.

PROCEDIMENTOS

1. Dissolver cerca de 30 gramas de fermento em 250 mL de água;
2. Enumere os tubos de ensaio de 1 a 5 e distribua quantidades iguais da solução de fermento em cada um deles. Em um sexto tubo de ensaio adicione apenas água (será o controle experimental) (Figura 5.1);
3. Coloque uma colher de sopa de açúcar em cada um dos tubos, exceto no tubo de número 1 (será um segundo controle experimental);
4. Adapte uma bexiga na boca de cada um dos tubos de ensaio ;
5. Deixe os tubos de ensaio 1,2,3 e 6 em temperatura ambiente ;
6. Coloque o tubo 4 em gelo e o número 5 em banho Maria de temperatura 35°C;
7. Observe o que ocorre com os tubos nos minutos seguintes.

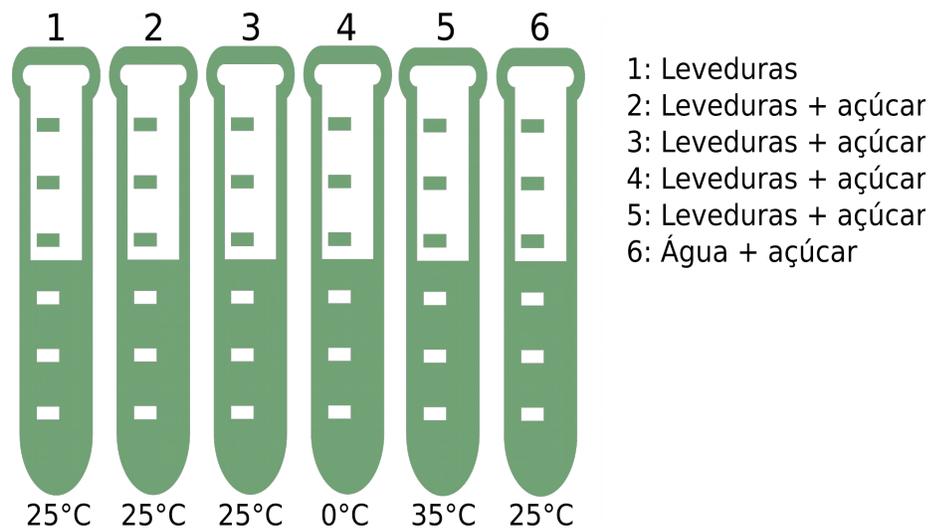


Figura 5.1: Desenho experimental.

QUESTÕES

- 1) Indique quais tubos apresentaram e quais não apresentaram a produção de gás? Por quê?

2) Como a temperatura afeta a fermentação?

REFERÊNCIAS

PEZZI, A; GOWDAY, O.D; MATTOS, S.N. Biologia: Citologia, embriologia e histologia. Vol.1- Ed. FTD S.A. São Paulo, 2010. ISBN: 978-85-322-7303-1.

TORTORA, G, J.; FUNKE, B, R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 12^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017 ISBN: 9788582713532.

TRABULSI, L.R, ALTERTHUM, F. Microbiologia. Editora: Atheneu; São Paulo: 1^a ed. 2008 ISBN: 978-8573799811.

PRÁTICA 6 - CITOESQUELETO: CÍLIOS E FLAGELOS

Autores: Bianca de Matos Moreira, Lais Gonçalves Parvan, Érica Mangaravite

INTRODUÇÃO

O citoesqueleto (Figura 6.1) é uma complexa rede de filamentos proteicos. Dentre esses se encontram os filamentos de actina, intermediários, os filamentos de miosina e os microtúbulos. Possuem a função da integridade estrutural das células; aquisição da forma; movimentação celular; transporte de organelas e outras estruturas citoplasmáticas (movimentação intracelular).

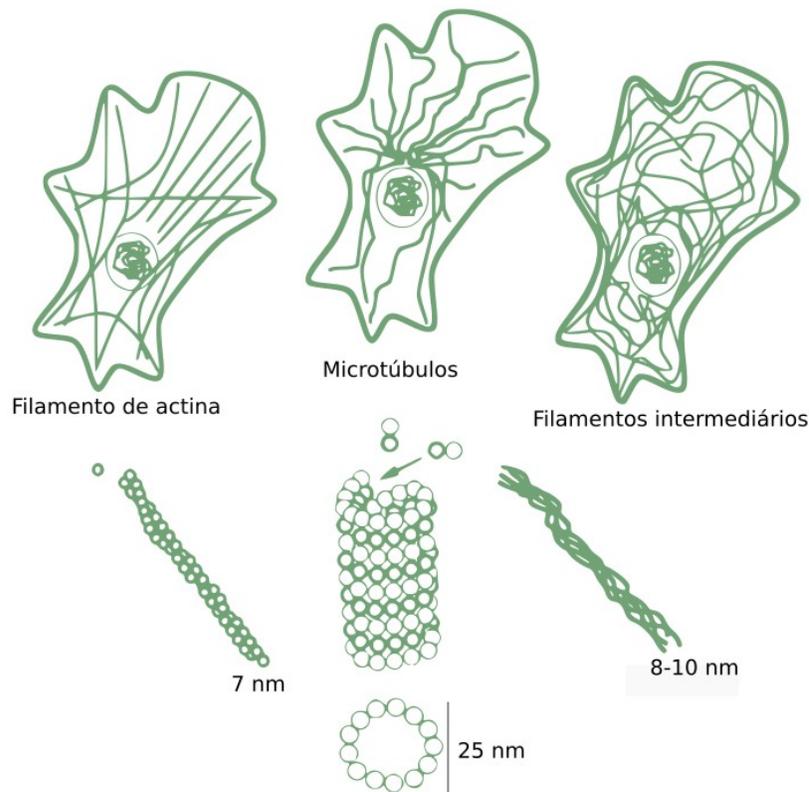


Figura 6.1: composição do citoesqueleto. Adaptado de Muranen, 2007.

Os filamentos de actina possuem de 5 a 9 nm de diâmetro e são resultantes da polimerização da proteína actina G (G - globular). Encontram-se distribuídos por todo o citoplasma, porém se concentram em maior quantidade na periferia. Em geral, são importantes para: o formato celular; a sustentar os microvilos e os estereocílios, especializações da superfície celular; permitir o transporte de vesículas na endocitose e na exocitose; participar na adesão das células; posicionam macromoléculas, como o RNAm e complexos

enzimáticos; a migração celular durante o desenvolvimento embrionário ou em cultura; organizar o anel contrátil, responsável pela citocinese, e constituem os filamentos finos das células musculares, contribuindo na contração.

Os filamentos intermediários (8 a 10nm de diâmetro) são originados por proteínas fibrosas. Dependendo do tipo celular, se faz presente a citoqueratina, vimentina, desmina, proteína ácida fibrilar glial, periferia ou neurofilamentos. Há ainda as lâminas que integram o envoltório nuclear. Em geral, possuem as seguintes características: são resistentes e estão envolvidos na manutenção da forma da célula e no posicionamento das organelas; a citoqueratina é exclusiva das células epiteliais, mas é uma família grande com mais de 50 isoformas. Os filamentos de citoqueratina (também denominados tonofilamentos) podem se agrupar em feixes, as tonofibrilas. Esses filamentos contribuem para a adesão das células e conferem resistência mecânica ao tecido; a vimentina é expressa em células de origem mesenquimal, como nas células epiteliais que revestem os vasos sanguíneos (células endoteliais) e as cavidades (células mesoteliais) e nos fibroblastos, que são células do tecido conjuntivo. Ela forma uma rede em volta do núcleo, mantendo sua posição na célula; a desmina é encontrada nas células musculares e nas células mioepiteliais; a proteína ácida fibrilar glial (GFAP de Glial Fibrillary Acidic Protein) está presente nos astrócitos e nas células de Schwann; a periferia ocorre em muitas células do sistema nervoso periférico, e os neurofilamentos, nos neurônios.

Os filamentos de miosina (10 a 15nm de diâmetro) estão presentes nas células musculares, e são denominados filamentos grossos (ou espessos). O deslizamento dos filamentos finos ao longo dos filamentos grossos promove a contração muscular. A miosina também ocorre em células não musculares, como, por exemplo, no anel contrátil da citocinese.

Os microtúbulos (25nm de diâmetro) possuem formato cilíndrico, são estruturas ocas, constituídas por 13 protofilamentos com as proteínas globulares α - e β -tubulinas. Possuem origem no centro organizador de microtúbulos (MTOC de *Microtubule Organizing Centers*), onde há um par de centríolos envoltos em uma matriz de tubulinas. Os centríolos têm um arranjo de nove trincas periféricas de microtúbulos, que possuem as seguintes características. Cada microtúbulo possui uma extremidade negativa, que não cresce e que geralmente está embutida no MTOC, e uma extremidade positiva, onde as tubulinas se polimerizam em direção à periferia da célula; os microtúbulos mantêm a forma da célula; os microtúbulos posicionam organelas e permitem o deslocamento das vesículas, das organelas e dos cromossomos. A média de vida dos microtúbulos é de 10 minutos.

Nas células epiteliais, centríolos posicionados próximo à superfície servem de base para formar o axonema (nove duplas periféricas e um par central de microtúbulos), que é a estrutura interna dos cílios e do flagelo. A união de nove pares de microtúbulos dão origem aos cílios e flagelos (Figura 6.2). O crescimento dos

cílios e flagelos ocorre a partir de Corpúsculos Basais que se relacionam intimamente com os centríolos. Com relação à função, os cílios movimentam o fluido sobre a superfície celular ou deslocam células isoladas em um fluido. No corpo humano podem ser encontrados no trato respiratório, removendo as impurezas e na tuba uterina para auxiliar no movimento do óvulo. Os flagelos propagam ondas ao longo de seu movimento, impulsionando a célula através do líquido e podem ser encontrados, por exemplo, nos espermatozoides proporcionando a sua locomoção.

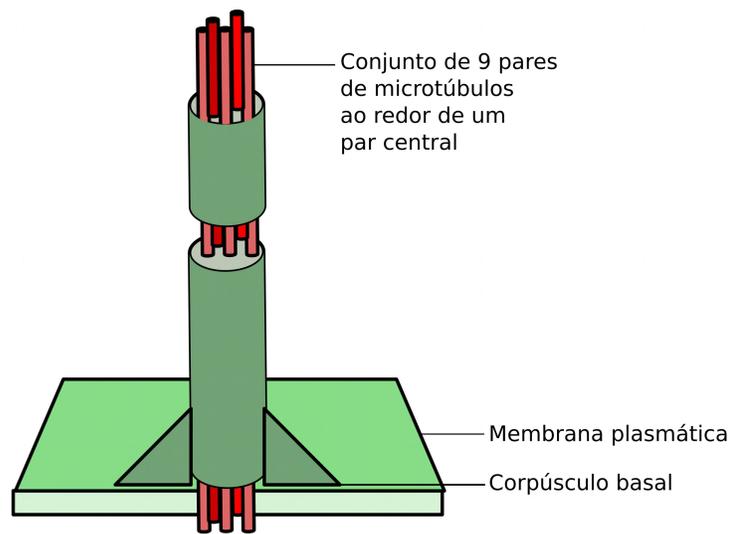


Figura 6.2: Constituição dos cílios e flagelos. Adaptado de Wikimedia Commons, sob a licença Creative Commons Atribuição-Compartilhual 4.0 Internacional.

OBJETIVO

Visualização de cílios e flagelos em lâminas permanentes.

EPI

Luvas e jaleco.

MATERIAL

- Lâmina permanente de espermatozoide;
- Lâmina permanente de traqueia;
- Lâmina permanente de tuba uterina;
- Microscópio óptico;
- Óleo de imersão.

PROCEDIMENTOS

1. Coloque as lâminas no microscópio óptico, passando da objetiva de menor aumento para a de maior (antes de usar a de 100x aplique o óleo de imersão).

QUESTÕES

- 1) Em quais locais do corpo humano os cílios e flagelos se fazem presentes?

- 2) Qual a sua função em cada um deles?

- 3) Esquematize um corte transversal dos cílios e dos flagelos (a), bem como as lâminas observadas da tuba uterina (b) e traqueia (c).

--	--	--

REFERÊNCIAS

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.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 7. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 339 p.

MONTANARI, T. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3.ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 2016. 229 p. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/livrodehisto>>ISBN: 978-85-915646-3-7.

MURANEN, T. The Neurofibromatosis 2 tumor suppressor merlin in cytoskeleton organization and cell cycle regulation, 2007.

PRÁTICA 7 - CITOESQUELETO: MOVIMENTAÇÃO DE CLOROPLASTOS DE CÉLULAS DE ELODEA

Autores: Bianca de Matos Moreira, Lais Gonçalves Parvan, Érica Mangaravite

INTRODUÇÃO

O cloroplasto (Figura 7.1) é a organela presente nas plantas e algas responsável pela fotossíntese e é composta por duas membranas, sendo uma externa e outra interna (lipoproteicas). Além disso, possui em seu interior duas estruturas:

- Tilacoide: sistema de membranas internas que contém clorofila (local em que ocorre a fase clara/fotoquímica da fotossíntese);
 - Cada pilha de tilacoide é chamada de granum.
- Estroma: matriz amorfa, rica em enzimas solúveis, DNA, RNA e ribossomos (local em que ocorre a fase escura/química da fotossíntese).

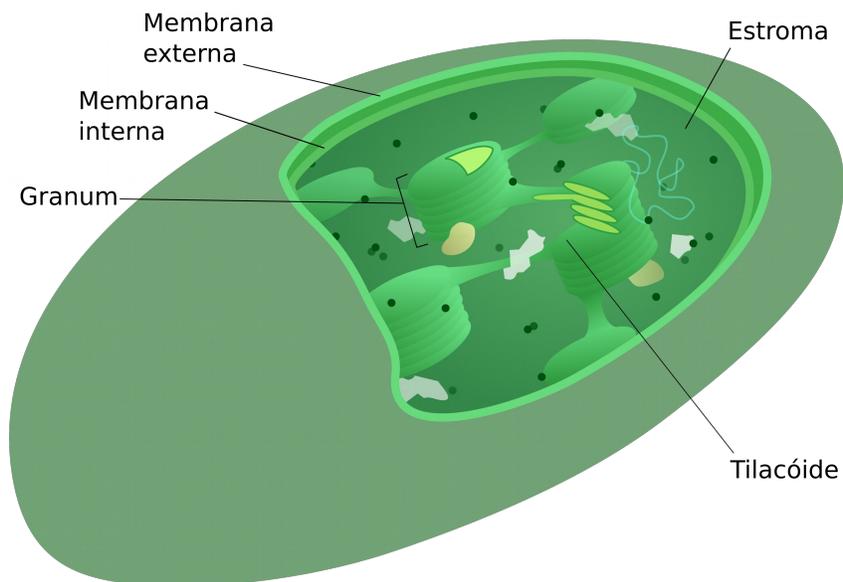


Figura 7.1: Esquema representativo de um cloroplasto.

A *Elodea* é uma planta aquática que possui folhas com nervuras paralelas, pertencente à família Hydrocharitaceae. Além disso, é utilizada para a ornamentação de aquários, sendo, portanto, fácil de ser encontrada. Por isso, o aproveitamento de suas folhas em aulas práticas se torna possível principalmente para

observar a movimentação dos cloroplastos (organelas grandes e que apresentam coloração verde por possuírem clorofila) no citoplasma.

Este movimento recebe o nome de ciclose, que, por intermédio da comunicação entre os filamentos de actina e miosina presentes no citoesqueleto, desloca os cloroplastos dependendo da intensidade da luz. Logo, ocorre o espalhamento dessas organelas quando a luminosidade é baixa e seu agrupamento, quando é alta.

OBJETIVO

Visualização da movimentação dos cloroplastos em células de *Elodea*.

EPI

Jaleco.

MATERIAL

- Microscópio de luz;
- Folhas de *Elodea* sp.;
- Água destilada;
- Pipeta de Pasteur;
- Lâminas e lamínulas;
- Pinça;
- Papel filtro.

PROCEDIMENTOS

1. Com a pipeta de Pasteur, adicionar uma gota de água destilada na lâmina;
2. Remover, com a pinça, um folículo de *Elodea* e colocá-lo na lâmina contendo a gota de água;
3. Posicionar a lamínula à 45° da lâmina, para que evite a formação de bolhas;
4. Caso estas sejam formadas, remover o excesso de líquido com papel filtro para que a lamínula não se mova;
5. Observar o material nas objetivas de 10x, 40x e 100x;
6. Girar o micrométrico para adaptar o foco;
7. Aguardar de 3 a 5 minutos e observar novamente o material nas objetivas de 10x, 40x e 100x.

QUESTÕES

1) Quais estruturas foram possíveis de ser visualizadas por meio da prática?

2) Em que posição os cloroplastos se encontravam durante a ciclose? Desenhe a lâmina antes e depois dos três minutos.

REFERÊNCIAS

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 7. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 339 p.

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.

MONTANARI, T. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3.ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 2016. 229 p. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/livrodehisto>>ISBN: 978-85-915646-3-7.

PRÁTICA 8 - ORGANELAS: RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Autores: Bianca de Matos Moreira, Lais Gonçalves Parvan, Érica Mangaravite

INTRODUÇÃO

O retículo endoplasmático (Figura 8.1) foi observado pela primeira vez em 1897, por Garnier, que o denominou inicialmente como ergastoplasma. O retículo endoplasmático é constituído por um sistema de membranas em forma de túbulos, vesículas e cisternas. É dividido em retículo endoplasmático rugoso, quando apresenta associação com ribossomos, e liso, quando não há ribossomos. Os ribossomos são partículas não membranosas, compostas de proteínas e RNA ribossômico. Eles são compostos por uma unidade maior e uma subunidade menor, com valores de sedimentação de 60S e 40S, respectivamente (Figura 8.2).

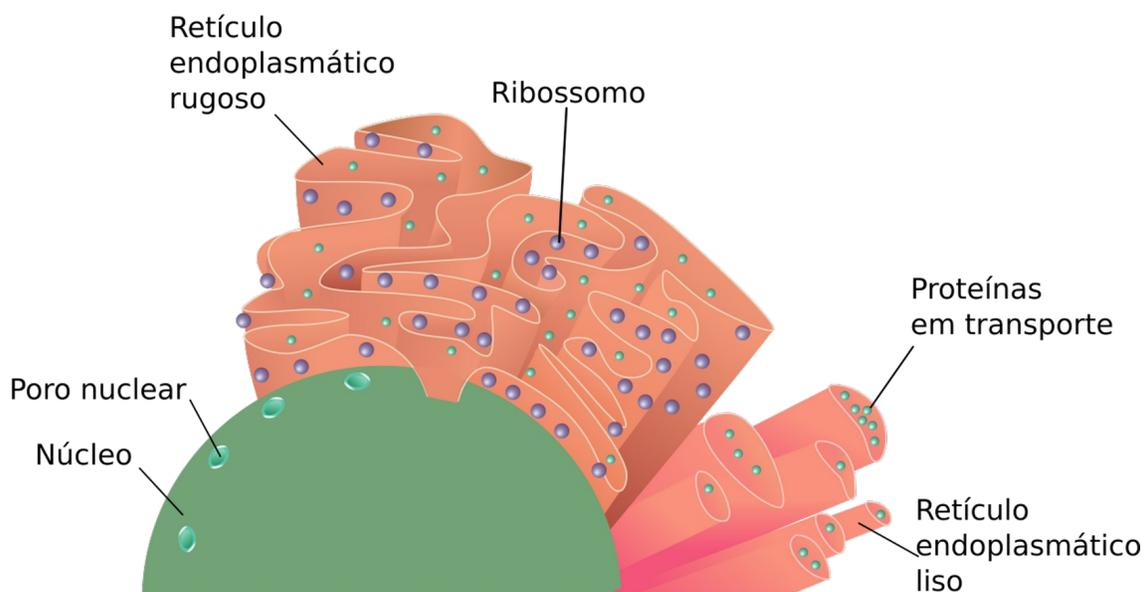


Figura 8.1. Representação dos constituintes do retículo endoplasmático. Adaptado de Wikimedia Commons, sob a licença GNU Free Documentation License, versão 1.2.

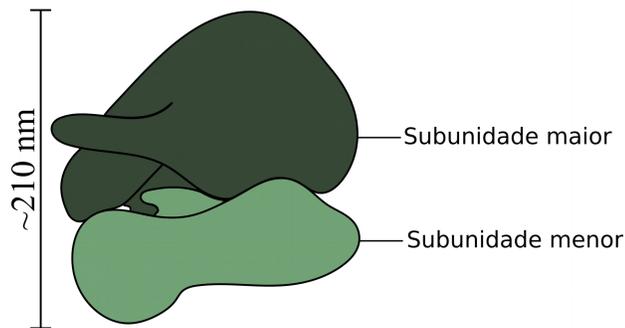


Figura 8.2: Ribossomo, subunidades maior e menor. Adaptado de Wikimedia Commons, sob a licença Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported e sob a licença GNU Free Documentation License, versão 1.2

O retículo endoplasmático rugoso é responsável pela síntese proteica. No momento em que a célula necessita produzir proteínas do citosol, do núcleo, das mitocôndrias e dos peroxissomos, os ribossomos se encontram livres no citoplasma. Porém, quando as proteínas a serem sintetizadas são destinadas as demais organelas, para a carioteca, membrana celular ou para o meio exterior, eles se encontram associados ao retículo endoplasmático.

Por outro lado, o retículo endoplasmático liso, ao invés de ribossomos, contém enzimas que sintetizam lipídeos (fosfolipídios) e esteroides – está envolvido na formação e reciclagem da membrana. Além disso, auxiliam no metabolismo do glicogênio e na detoxificação de drogas como o álcool, além de auxiliarem no controle de Ca^{2+} nas fibras musculares estriadas, visto que a liberação desse íon pelo citosol é essencial para a contração muscular.

QUESTÕES

- 1) O retículo endoplasmático pode ser visualizado em microscópio óptico? Justifique sua resposta.

REFERÊNCIAS

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 339 p.

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.

MONTANARI, T. *Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas*. 3.ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 2016. 229 p. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/livrodehisto>>ISBN: 978-85-915646-3-7.

PRÁTICA 9 - VISUALIZAÇÃO DOS NÚCLEOS EM DIFERENTES TIPOS CELULARES

Autores: Lais Gonçalves Parvan, Bianca de Matos Moreira, Luciana de Andrade Agostinho, Christiane Mariotini-Moura

INTRODUÇÃO

A Biologia Celular, também chamada de Citologia, é a parte da Biologia que se dedica ao estudo das células e suas estruturas. Admite-se que as células são formadas por três partes básicas: a membrana, o citoplasma e o núcleo.

O núcleo é a região delimitada pela membrana nuclear ou carioteca (*karyon* = núcleo; *théke* = invólucro), armazenando em seu interior os cromossomos, contendo também um ou mais nucléolos mergulhados em seu nucleoplasma.

Gerlamente, apresentam forma ovoide ou esférica, com diâmetro médio igual a 5 µm, porém, também podem também manifestar morfologia lobular: bilobulados ou multilobulados, observados em células de defesa (alguns tipos de leucócitos).

Dependendo do estágio do ciclo celular, podem admitir distintos comportamentos como, por exemplo, durante a intérfase (período de síntese intensa) o núcleo apresenta aspecto evidente, enquanto que no período de divisão celular (mitose ou meiose) tanto a carioteca quanto o nucléolo se desintegram, reaparecendo no final deste evento.

Sendo assim, o objetivo desta prática visa comparar os núcleos de células da mucosa bucal e núcleos de células sanguíneas (leucócitos) mostrando os diversos aspectos que podem apresentar dependendo do tipo celular (Figura 9.1).

OBJETIVO

Observação de células descamadas da mucosa bucal.

MATERIAL

- Swab ou Espátula de Ayre;
 - Conta-gotas;
 - Lâmina e lamínula;
 - Papel toalha.
 - Corante Azul de Metileno 1%;
-

EPI

- Luvas, jaleco e óculos.

PROCEDIMENTOS

1. Com a espátula de Ayre ou swab, raspar as células da mucosa da face interna da bochecha;
2. Colocar o material colhido em uma lâmina;
3. Pingar 1 gota de azul de metileno e cobrir com lamínula;
4. Retirar o excesso de corante pressionando um papel toalha sobre a lâmina.

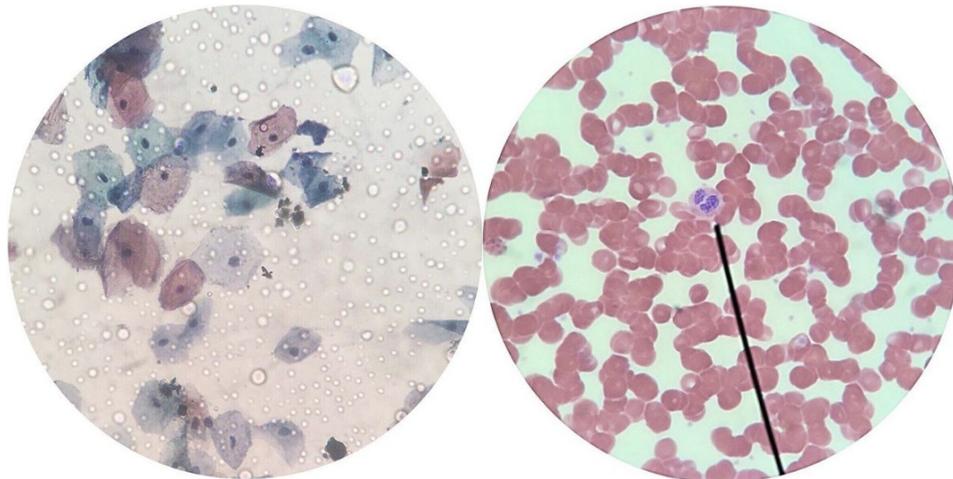


Figura 9.1: Células da mucosa bucal e esfregaço sanguíneo, respectivamente. Fonte: Material preparado em laboratório do UNIFAMINAS-Muriaé-MG

OBJETIVO

Observação dos núcleos de leucócitos em esfregaços sanguíneos.

EPI'S

- Luvas, jaleco e óculos.

MATERIAL

- Lâmina extensora;
- Lâminas;
- Panóptico rápido 1, 2 e 3;
- Amostra de sangue;
- Água destilada.

PROCEDIMENTOS

1. Colocar 1 gota de sangue na lâmina e realizar a extensão sanguínea. Deixar secar em temperatura ambiente;
2. Preencher 3 recipientes com as soluções de panóptico 1, 2 e 3 respectivamente;
3. Submergir as lâminas na solução 1 mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer bem;
4. Submergir as lâminas na solução 2 da mesma maneira que o procedimento anterior e proceder da mesma forma na solução 3;
5. Lavar com água destilada para remover o excesso de corante e deixar secar em temperatura ambiente;
6. Observar as células em objetiva de 100x submergidas em óleo de imersão.

QUESTÃO

- 1) Descreva os núcleos das células da mucosa bucal e das células sanguíneas diferenciando-os quanto à forma, tamanho e aspecto.

REFERÊNCIAS

FERNANDES, Marcos Gino et al. Práticas de biologia celular. Dourados, MS: Ed. UFGD, 2017.

GOMPEL, C. Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas. São Paulo: Roca, 2006.

ZAGO, MA, FALCÃO, EP, PASQUINI, R. Hematologia Fundamentos e Prática, São Paulo, 2 ed., Atheneu, 2002.

PRÁTICA 10 - MITOSE E CROMOSSOMOS METAFÁSICOS DE RAIZ DE CEBOLA GERMINADAS

Autores: Lais Gonçalves Parvan, Bianca de Matos Moreira, Christiane Mariotini-Moura, Luciana de Andrade Agostinho

INTRODUÇÃO

A prática em sala de aula com raízes de *Allium cepa* para observação do ciclo celular e aberrações cromossômicas é um modelo simples, de baixo custo, fácil de ser executado e bastante acessível para ser realizado em qualquer laboratório.

Por meio deste teste, é possível determinar a citotoxicidade e genotoxicidade de diversas substâncias. O índice mitótico e anormalidades microscópicas podem ser observados.

O ciclo celular normal das células das raízes de *A. cepa* demora aproximadamente 17 horas para ser completado. Dentro desse período, ocorrem fases como a intérfase e a fase M da mitose. A intérfase corresponde ao período em que a célula ainda não sofreu divisão. Esse período é dividido em fase G1, que antecede a duplicação do DNA; fase S que ocorre à duplicação do DNA, dos filamentos de cromatina e centríolos; e fase G2, na qual ocorre a síntese de RNA, proteínas e moléculas necessárias à divisão, como os centríolos.

À medida que essas fases vão ocorrendo, as células passam por mecanismos de reparo. Qualquer agente que provoque dano a essas células faz com que esse tempo sofra alteração, fazendo com que a célula demore um período maior ou menor que 17 horas para completar o seu ciclo.

Depois que a célula passa pelas verificações nos pontos de controle do ciclo celular (chamados de *checkpoints*), ela prossegue para a fase M da mitose. A prófase é a primeira fase, os cromossomos duplicados se condensam tornando-se visíveis. Na metáfase, os cromossomos atingem seu grau máximo de condensação e dispõem-se ao centro da célula, alinhados. Tensionados pelos cinetócoros dos microtúbulos formam a placa equatorial. Na anáfase, as fibras do fuso tracionam os cromossomos recém-separados para polos opostos na célula. A anáfase termina com a chegada dos cromossomos nos polos e inicia-se a descondensação cromossômica. Na telófase, os cromossomos filhos estão separados nos polos opostos, os microtúbulos com cinetócoros desaparecem e um novo envelope nuclear é reconstituído ao redor de cada grupo de cromossomos-filhos. Para que as duas novas células sejam separadas, há o surgimento do anel contrátil de actina e miosina

para que ocorra a separação da membrana celular, em duas novas. Na citocinese, o estrangulamento da membrana pelos anéis contrateis é visível, dando origem a duas novas células.

MATERIAL

Deve ser calculado proporcional a 1 (UM) aluno:

- 1 Bulbo de cebola;
- 200 mL de Água destilada;
- Substância teste de acordo com o uso do rótulo (adoçante, por exemplo);
- 1 Copo descartável de 250 mL;
- 4 Palitos de dente;
- 1 Estilete ou bisturi;
- 8 gotas de Corante (Orceína acética 2%);
- 1 Conta-gotas;
- 1 Bico de Bünsen;
- 2 Lâminas;
- 4 Lamínulas;
- 1 Resina ou esmalte (base).

EPI

- Luvas, jaleco e óculos.

PROCEDIMENTOS

Dia 1 (tempo de execução: 50 min)

1. As cebolas devem ser adquiridas no mesmo dia da aula. Retirar as cascas das cebolas, lavá-las em água destilada e raspar o bulbo cuidadosamente com o bisturi ou estilete para remover as raízes velhas (Figura 10.1);
2. Colocar as cebolas em contato com água destilada (Figura 10.1) por 24 horas para crescimento das raízes, até o dia 2 (trocar a água diariamente para evitar a proliferação de fungos);

Dias 2 (tempo de execução: 15 min cada dia)

1. As cebolas devem ter a água trocada por mais 24 horas, totalizando 48 horas desde o dia 1.



Figura 10.1: (A) Raspagem superficial dos bulbos; (B) Bulbos expostos à água destilada. Fonte: Material preparado em laboratório do UNIFAMINAS-Muriaé-MG

Dia 3 (tempo de execução: 15 min)

1. Colocar as cebolas em contato com o agente teste (com suspeita de efeito genotóxico) por 24 horas, até o dia seguinte;

Dia 4 (tempo de execução: 15 min)

1. As cebolas devem ter a substância teste trocada na mesma concentração por mais 24 horas, totalizando 48 horas desde o dia 3. É importante que esta substância teste seja preparada apenas uma vez no dia 3 e armazenada em vidro âmbar, para que não ocorra variação de sua concentração.

Dia 5 (tempo de execução: 2 horas)

1. Cortar as 3 maiores raízes das cebolas cuidadosamente com um bisturi;
2. Se as raízes estiverem muito compridas, cortar a parte da coifa e colocar sobre a lâmina;
3. Com o auxílio de um conta gotas, pingar uma gota de orceína acética 2% em cada uma das raízes (proporção de duas por lâmina);
4. Aquecer a lâmina na chama do bico de Bunsen com movimentos dentro e fora do fogo em intervalos de 3 segundos (fazer isso 6 vezes e não parar a lâmina ao fogo, sempre agitar). Manter uma certa distância da chama evitando seu contato com a lâmina. Esta etapa auxilia no rompimento das membranas celulares e exposição dos cromossomos;
5. Retirar o excesso de corante com água destilada sem que a água caia diretamente na lâmina;

6. Cobrir com lamínula e fazer o esmagamento manual imediatamente após o aquecimento;
7. Passar a resina ou esmalte em volta da lamínula;
8. Proceder para a visualização microscópica das raízes em objetiva de 40x (Figura 10.2).

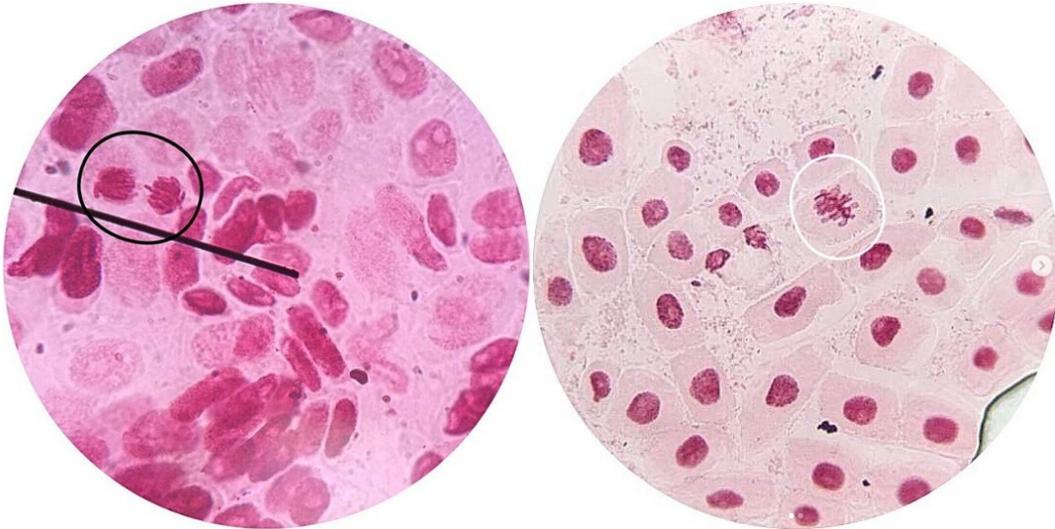


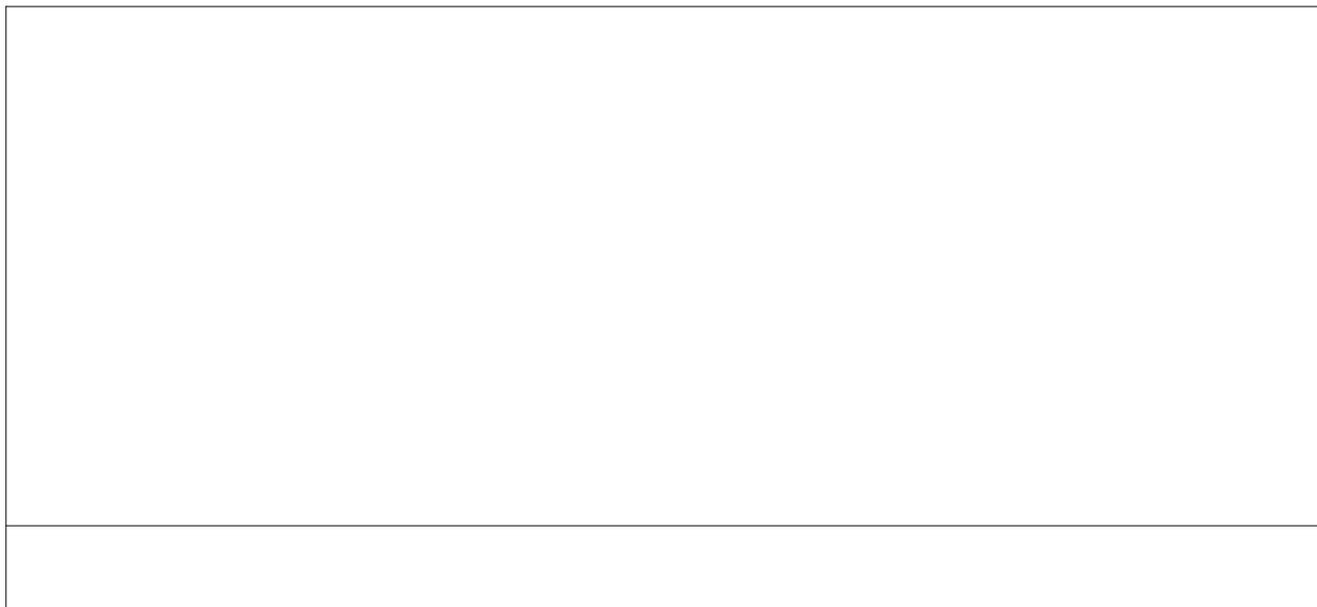
Figura 10.2: Raiz meristemática de *Allium cepa* corada comorceína acética 2% mostrando células em anáfase e metáfase, respectivamente. Fonte: Material preparado em laboratório do UNIFAMINAS - Muriaé-MG.

Notas:

- Indicar na lâmina com uma seta o sentido da coifa (apontar para a parte apical da raiz onde estão as células mais novas).
- Caso a aula deva ser apenas para mostrar células normais, os dias 3 e 4 devem ser desconsiderados e deve seguir para o dia 5, executando a técnica em 3 dias. Ou o preparo do dia 1 poderá ser preparado pelo professor antes da aula e, a mesma deverá ser executada no último dia do experimento.

QUESTÃO

- 1) Escolha um campo com uma célula em divisão. Esquematize-o; indique o núcleo e a parede celular. Nomeie a etapa da mitose que pode ser observada na célula encontrada.



REFERÊNCIAS

AIUB C. A. F., FELZENSWALB I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. Revista Genética na Escola; 6(1): 12-15, 2011.

Blog Biologia Total. Disponível em: <<https://blog.biologiatotal.com.br/mitose-para-somar-e-preciso-dividir/>>. Acesso em: 8 de abril de 2019.

PRÁTICA 11 - TÉCNICA DE CARIÓTIPO COM COLORAÇÃO POR PANÓTIPO

Autores: Bianca de Matos Moreira, Rúzivia Pimentel Oliveira, Isabela Aparecida de Souza, Suely Rodrigues dos Santos, Luciana de Andrade Agostinho

INTRODUÇÃO

O cariótipo é uma técnica que realiza a análise dos cromossomos para a investigação de grandes alterações estruturais ou numéricas. Algumas vantagens desta ferramenta são o baixo custo, a utilização de reagentes sem efeitos nocivos para o manipulador, a obtenção de amostra biológica acessível e o baixo tempo de realização da análise, o que viabiliza a realização da técnica em pesquisas científicas e práticas acadêmicas (MIRANDA, 2011).

Apesar de possuir baixo custo, o cariótipo exige um manuseio cuidadoso, artesanal, durante sua execução. Assim, qualquer erro pode prejudicar a obtenção das células com boa qualidade para a visualização dos cromossomos. Outros fatores podem interferir na qualidade das metáfases ao final do cultivo, como a temperatura, o pH incorreto das soluções e o manuseio inadequado dos meios de cultura (MADIGAN, 2016).

Em 1956, sabia-se que os cromossomos possuíam padrões como tamanho de braços e posição do centrômero, dividindo-os em braço curto e longo, assim como caracterizando-os em metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (VERMA; BABU, 1955). No ano de 1960, Moorhead desenvolveu a técnica de cariótipo em sangue periférico. Já em 1968, Casperson desenvolveu a técnica de bandas, fato que marcou o início da era pós-bandas e a partir de então foram descritas numéricas e estruturais, tornando a caracterização cromossômica mais específica e significativa (MOORHEAD *et al*, 1960; CASPERSON *et al*, 1968).

Na prática clínica, a citogenética auxilia na pesquisa e detecção de anomalias cromossômicas para a investigação de doenças genéticas (ALBANO, 2000). Além disso, o cariótipo é considerado um dos principais exames de triagem genética, pois auxilia no diagnóstico ou direciona para testes mais complexos (THOMPSON; THOMPSON, 2002).

A padronização do protocolo da técnica de cariótipo é importante visto que, por possuir baixo custo e elevado benefício, viabiliza sua utilização em pesquisas e aulas práticas. Além disso, todas as etapas dela devem ser executadas de forma cautelosa para que sejam obtidas boas metáfases e conseqüentemente, uma análise adequada. Para que isso ocorra em laboratórios multiusuários é necessário que ocorra a manutenção, limpeza e calibração de equipamentos como balança, pHmetro e estufa, bancadas e vidrarias. O controle da temperatura

dos reagentes e meios utilizados é importante para que não ocorra desestabilização do pH ou contaminação, o que inviabiliza a realização adequada da técnica.

MATERIAL (4 CULTIVOS)

- Centrífuga para tubo Falcon 12mL;
- Escorredor de lâmina;
- 1 caixa de lâminas novas;
- Chapa agitadora;
- Barra magnética;
- Estufa estéril (37°C);
- Banho-maria (37°C e 60°C);
- Termômetro;
- Balança;
- Vórtex;
- Papel alumínio;
- Papel manteiga;
- Tesoura;
- Gaze;
- 3 pêras pipetadoras compatíveis com pipetas de vidro de 5 mL;
- Corante hematológico: Panótico;
- Água destilada;
- Ácido acético (100%);
- Metanol (100%);
- KCl: Cloreto de potássio (sólido);
- Álcool 70%;
- Soro Fetal Bovino;
- Fitohemaglutinina;
- Meio RPMI;
- Colchicina;
- 1 pipeta P200 ou P1000 (para colchicina);
- 8 ponteiras p200 ou p1000
- 3 estantes para tubo Falcon;
- 2 espátulas de ferro;
- 2 Becker para descarte de 500 mL;
- 4 Becker de vidro 500mL;
- 3 vidros âmbar de 500mL;
- 2 vidros âmbar de 1L;
- 8 etiquetas;
- 1 caneta a prova d'água;
- 4 tubos Falcon 12 mL (para 1 cultivo);
- 2 pipetas de vidro de 5mL;
- 2 seringas 1mL;
- 5 agulhas cinza;
- 2 pinças.

PROCEDIMENTOS

Uma semana antes do experimento, deve-se lavar as lâminas que serão utilizadas com intuito de desengordurá-las. Para isso, lavar as lâminas previamente com gaze úmida e detergente, passando no mínimo

10 vezes em cada uma e enxaguar em água corrente, após isso, deixa secar em temperatura ambiente . Após a secagem, estas serão guardadas em caixa de madeira na geladeira e deixadas até o dia 3 do experimento.

1° Passo – Limpeza das vidrarias e do laboratório

Limpeza das bancadas e capela de fluxo laminar com álcool 70%. A luz UV germicida do fluxo laminar deve ser ligada antecedendo 30 minutos do início da prática.

Limpeza e higienização das vidrarias com água corrente (torneira) e detergente e último enxágue com água destilada.

2° Passo - Lançamento de cultura

- Inicialmente, coleta-se 3mL de sangue para cada cultivo;
- Para o lançamento de cultura (início do cultivo celular), prepara-se o fluxo laminar com o material:
 - 1 Estante para tubo Falcon de 12 mL;
 - 4 Tubos do tipo Falcon novos;
 - 2 Seringas de 5mL (uma para cada meio)
 - 1 Seringa de 1 mL (fitohemaglutinina);
 - 2 agulhas;
 - Becker de 500 mL para descarte;
 - Fita *parafilm*;

Os reagentes que compõem o meio de cultura, como o RPMI, o Soro Fetal bovino e a fitohemaglutinina, devem estar previamente aquecidos a 37°C em banho-maria ou estufa (1 hora antes do início). Os mesmos não devem ser colocados na luz germicida, apenas antes do início do cultivo.

A coleta do sangue periférico deve ser realizada em seringa heparinizada ou o mesmo deve ser inserido (sem agulha) em um tubo contendo heparina. O sangue deve ser levado para o fluxo laminar e devem estar identificados, para o início do cultivo celular.

Em cada tubo de cultivo, devem ser inseridos: 4 mL de Meio RPMI, 0,2 mL (200 µL) de Fitohemaglutinina e 1 mL de Soro Fetal Bovino. Depois, colocar 0,5 mL de sangue (sem a agulha da seringa) e homogeneizar os tubos imediatamente.

Após adicionar os componentes em cada tubo juntamente com o sangue, os tubos devem ser homogeneizados e levados à estufa à 37°C por 48 horas, a qual deve ter controle de temperatura 2 vezes ao dia.

3° Passo - Interrupção do ciclo celular utilizando colchicina

Faltando 1 hora e 20 minutos para concluir 48 horas, as amostras devem ser retiradas da estufa e levadas ao fluxo laminar para o lançamento da colchicina (previamente aquecida à 37°C em banho-maria). Os cultivos devem ser homogeneizados antes e após a inserção de 200 µL de colchicina. Em seguida, os tubos devem ser vedados novamente com *parafilm* e retornados à estufa para completar as 48 horas.

A colchicina é utilizada para impedir a formação do fuso mitótico e assim, há interrupção do ciclo celular com parada em metáfase, fase na qual os cromossomos estão em alto grau de condensação, tornando-se visíveis para análise em microscópio óptico.

4° Passo: preparo das soluções

Prepara-se uma solução fixadora com metanol e ácido acético na proporção de 3:1. Para 4 amostras, prepara-se 120mL (90mL metanol para 30mL de ácido acético).

A solução hipotônica é feita com 0,3g de KCl para 50 mL de água destilada. Após o preparo, esta solução é armazenada em vidro âmbar. Ambas as soluções são armazenadas em 37° em banho-maria até sua utilização.

5° passo: fase de fixação

Serão utilizadas pipetas de vidro 5 mL e pipetadores do tipo pêra para a remoção do sobrenadante e adição das soluções hipotônica (7mL) e fixadora (4mL) em momentos diferentes (Figura 11.1).

Assim que os tubos forem retirados da estufa, deve-se homogeneizá-los e centrifugar por 10 minutos.

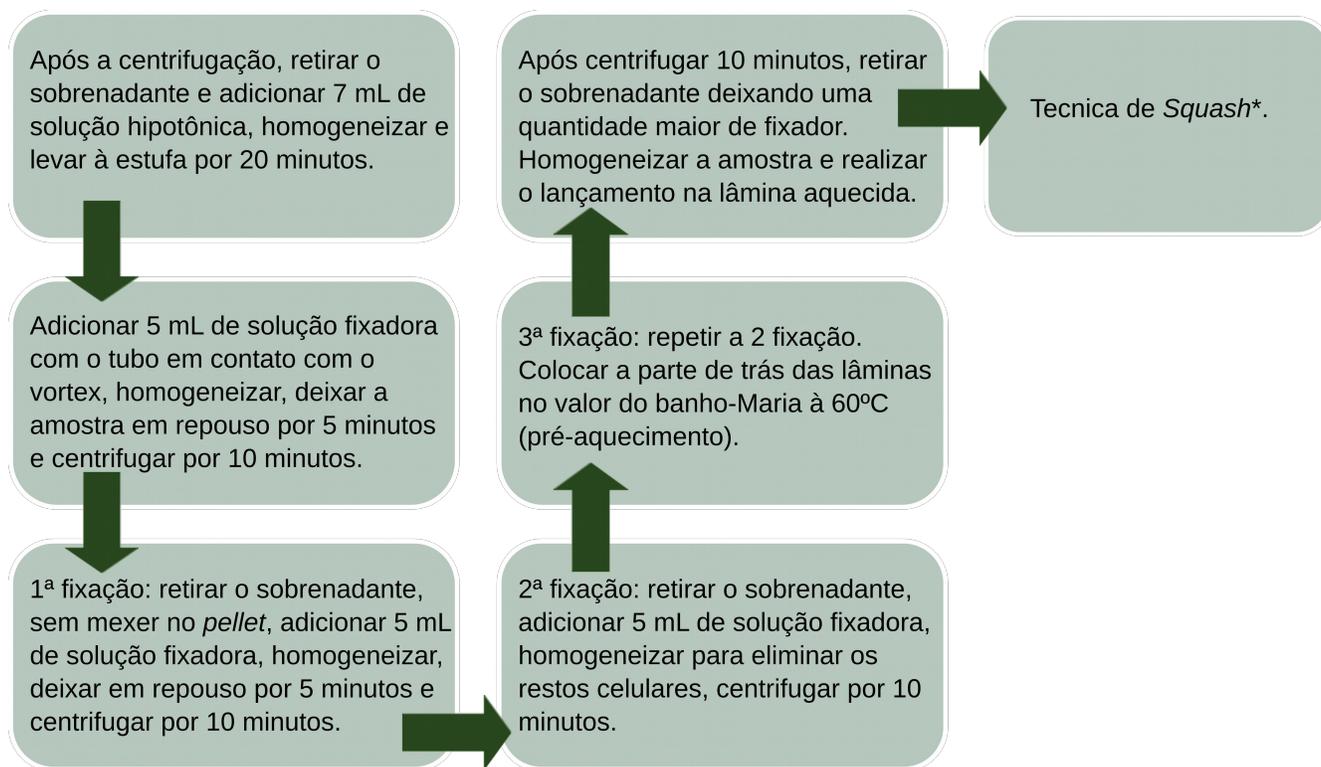


Figura 11.1. Fluxograma da prática a partir da fase de fixação.

* Com as lâminas ainda no vapor do banho Maria, numa dada distância com a pipeta, goteja-se 6 a 8 gotas em lugares distintos da lâmina, essa técnica é denominada Squash.

Ao inserir a solução hipotônica, inicialmente gota a gota, deve-se homogeneizá-la no vórtex, e depois, inserir o restante do volume manualmente com ajuda da pipeta. Deve-se fazer mais de 10 movimentos de sucção e dispensa da cultura dentro do tubo até que apareça grande quantidade de espuma.

6º Passo: coloração das lâminas

Após o lançamentos das células nas lâminas, aguardar a secagem e realizar a coloração com corante Panótico.

O corante panótico é composto por 3 etapas: 1-fixação, 2-coloração e 3-lavagem. Deve-se mergulhar as lâminas na solução 1 por 20 segundos, na 2 por 20 s e, na 3, por 30 s. Em seguida esperar secar, realizar a lavagem da lâmina em água corrente, limpá-las na parte de baixo e visualizar as metáfases em microscópio.

Deve-se percorrer toda a lâmina, começando com a objetiva de 4x para focalizar inicialmente, depois muda-se para a objetiva de 10x, seguida da de 40x, tendo cuidado para não confundir o que é metáfase com

possíveis restos celulares. Tendo encontrado a metáfase desejada (Figura 11.2), adiciona-se o óleo de imersão para ajustar a visualização na objetiva de 100x.

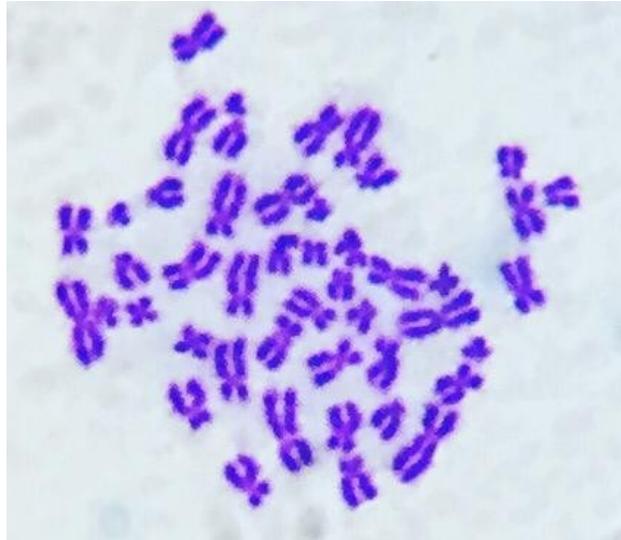
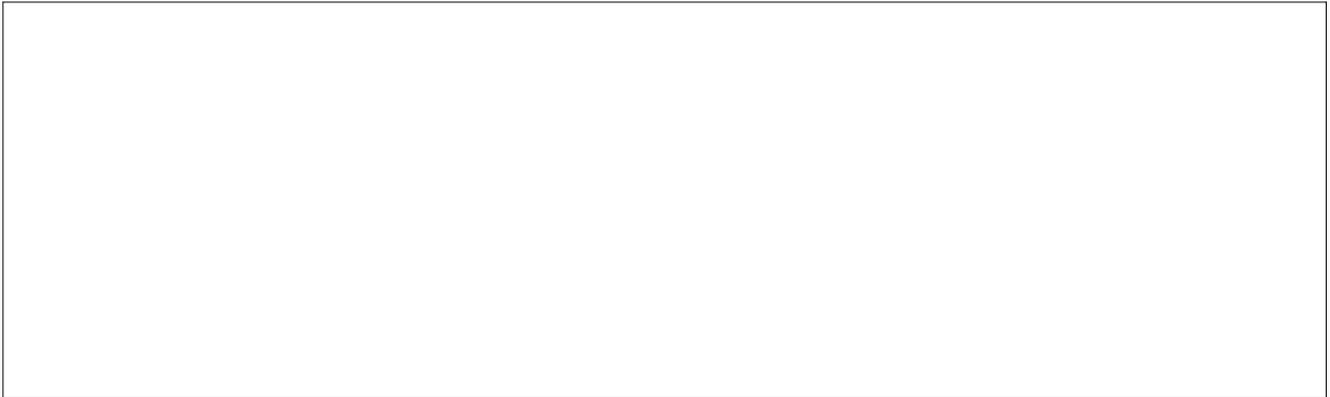


Figura 11.2. Cromossomos metafásicos bem espalhados e com tamanho adequado para análise do número cromossômico.. Objetiva de 100x. Fonte: Material preparado em laboratório do UNIFAMINAS-Muriaé-MG

QUESTÕES

1) Qual a importância da colchicina e da fitohemaglutinina na técnica de cariótipo?

- 2) Desenhe o que foi possível visualizar microscopicamente após o preparo das lâminas e determine a fase do ciclo celular encontrada.



REFERÊNCIAS

CASPERSON, T., Fa r-ber , S., Foley, G.E., Kudynowski, L., Modest, E.J., Simonsson, E., Wagh, U. & Zech, L. Chemical differentiation 'along' metaphase chrrossoms. Exp.Cell Res.58:141-152 (1968).

MADIGAN, M. T. – Microbiologia de Brock. 14° ed – Artmed, 2016.

MIRANDA, J. A.Citogenética humana / SharbelWeidner Maluf. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MOORHEAD, P.S.; NOWEL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured form human peripheral blood. Experimental Cell Research, v.20, p.613-616, 1960

NUSSBAUM, Robert L.; McInnes, Roderick R.; Willard, Huntington F. Thompson & Thompson –Genética Médica. 7 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 2008

VERMA RS, BABU A. Human Chromosomes – Principles and Techniques. New York. McGraw-Hill, Inc, 2a edição, 1995.

PRÁTICA 12 - EXTRAÇÃO DE DNA DE FRUTA

Autores: Tiago César Gouvêa Moreira, Caio Agostini Calheiros Grosso, Luciana de Andrade Agostinho

INTRODUÇÃO

O DNA foi descoberto em 1869 pelo médico suíço Friedrich Miescher. Durante os experimentos realizados com as proteínas presentes nos leucócitos, ele notou uma substância com propriedades diferentes das proteínas. Sendo assim, descreveu suas propriedades e realizou a primeira purificação bruta da molécula de DNA, antes denominada por ele de nucleína (MIESCHER, 1869).

Décadas depois, em 1944, os pesquisadores Avery, MacLeod e McCarty mostraram que o DNA seria um material que poderia ser transmitido ao longo das gerações (AVERY et al., 1944). Dez anos após esta descoberta, Rosalind Franklin, Wilkins, Watson e Crick descreveram como seria a estrutura desta molécula (FRANKLIN RE; GOSLING RG, 1953; WILKINS MHF; STOKES AR; WILSON HR, 1953; WATSON; CRICK, 1953)..

EPI

Luvas e jaleco.

OBJETIVOS

Extrair o DNA da fruta, permitir que os alunos observem a molécula de DNA enovelada (condensada), evidenciado a presença dentro das células das frutas poliplóides.

MATERIAL (1 ALUNO)

- 1/2 banana ou 2 morangos;
- 01 saco plástico transparente;
- 01 Becker de 250 mL;
- 01 Becker de 500 mL;
- 01 bastão de vidro;
- 01 colher de sopa de detergente;
- 01 colher de chá de sal de cozinha (Cloreto de Sódio- NaCl);
- 01 filtro de café de papel;
- 01 vidro de álcool 95% gelado;
- 01 pipeta de pasteur;
- 01 tesoura.

Observação: caso seja realizado experimento com 200 mL de extração do DNA da fruta, utilizar Becker de 500 mL e dobrar a quantidade de NaCl e detergente.

EQUIPAMENTOS

- 01 banho-maria com capacidade de aquecimento a 60°C;
- 01 micro-ondas;
- 01 geladeira.

PROCEDIMENTOS

1. Lavar as mãos e colocar luvas e jaleco.
2. Limpar a bancada com álcool 70%.
3. Retirar as folhas e os cabos de 3 ou 4 morangos ou pegar metade da banana descascada e colocar dentro de um saco plástico transparente.
4. Amassar a banana ou morango tendo cuidado para não rasgar o saco plástico.
5. Em um Becker de 250 mL, adicionar uma colher de sopa de detergente, uma de chá de sal e 100 mL de água destilada, misturar com bastão de vidro ou agitar no Becker.
6. Adicionar esta solução dentro do saco com as frutas amassadas.
7. Fechar o saco plástico e amassar bem os pedaços da fruta junto a solução.
8. Coloque o saco fechado contendo a mistura dentro de um Becker de 250 mL e preencha o mesmo Becker com água até cobrir totalmente.
9. Coloque o Becker no banho Maria a 60°C por 15-30 minutos.
10. Posicione o filtro de papel dentro de um Becker de 500 mL com as abas dobradas para fora.
11. Retire o Becker do banho-maria e com auxílio de uma tesoura, abra o saco plástico com cuidado.
12. Em seguida passe a mistura através do filtro de papel dentro do Becker.
13. Adicione álcool 95% gelado ao suco de morango ou banana ao filtrado que se encontra no Becker.
14. Coloque o dobro do volume de álcool 95% (200 mL), em relação ao volume do filtrado, no Becker (Volume final da solução no Becker: 300 mL). Não misture a solução.
15. Aguarde alguns segundos e observe as duas fases da solução.
16. Em uma das fases, irá se formar uma massa esbranquiçada, o DNA (Sobrenadante).
17. Puxe e/ou manipule o DNA como a pipeta de Pasteur.

Informações técnicas

A extração de DNA de células das frutas são subdivididas em 3 etapas principais:

1ª etapa: Ruptura física e química das membranas das células para liberação do DNA

Dentro desta etapa ocorre a ruptura física e química. A ruptura física ocorre por meio da maceração da fruta, já a química, utiliza-se o detergente, pois este junto com a temperatura de 60°C no banho-maria rompe a bicamada lipídica das membranas celulares da fruta, liberando o DNA e as organelas. Um dos componentes do detergente, o dodecil sulfato de sódio, desnatura as proteínas, separando-as do DNA cromossômico. O sal (NaCl) proporciona ao DNA um ambiente favorável para evitar a quebra da molécula, pois contribui com íons positivos e negativos que neutralizam as cargas do DNA em contato com a água (3ª etapa).

2ª etapa: Separação do DNA alvo e os componentes orgânicos das células

Por meio do filtro de papel é possível separar os restos celulares resultantes da primeira etapa do DNA alvo. Os restos celulares ficam retidos no papel filtro que posteriormente será descartado, já o DNA alvo passa pela membrana do filtro.

3ª etapa: Precipitação do DNA

O álcool gelado, em ambiente salino, faz com que as moléculas de DNA se aglutinem, formando uma massa filamentosa e esbranquiçada. Após esse passo, é possível observar o DNA na primeira fase da solução formada no Becker (Figura 12.1).

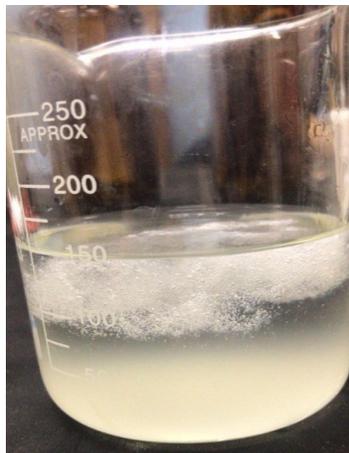


Figura 12.1: Precipitação do DNA no Becker após adição do álcool gelado. Fonte: Material preparado em laboratório do UNIFAMINAS-Muriaé-MG

QUESTÕES

1) Descreva a importância de cada etapa do processo de extração do DNA da fruta.

2) Por que o DNA da fruta é visível a olho nu e o DNA humano não?

3) Cite 3 possíveis problemas que possam ocorrer durante a extração para que se tenha uma falha do protocolo.

REFERÊNCIAS

ROSSI-RODRIGUES BC, GALEMBECK E. *Biologia: aulas práticas*. Campinas, SP: Editora Eduardo Galembeck, 2012.

AVERY et al. Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.*, 79 (1944), pp. 137-158.

FRANKLIN RE, GOSLING RG. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 1953; 171:740–741.

MIESCHER. Carta I; para Wilhelm His; Tübingen, 26 de fevereiro de 1869 W. His , et al. (Eds.) , Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher - Aus dem Wissenschaftlichen Briefwechsel de F. Miescher , vol. 1, FCW Vogel , Leipzig (1869) , pp. 33 – 38.

ROSSI-RODRIGUES BC, GALEMBECK E. Biologia: aulas práticas. Campinas, SP: Editora Eduardo Galembeck, 2012

WATSON J. D; CRICK F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature, v. 171 (1953) pp. 737–738.

WILKINS MHF, STOKES AR, WILSON HR. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. Nature 1953;171:738–740.

PRÁTICA 13 - PLANEJAMENTO DA CORRIDA DE PCR

Autores: Tiago César Gouvêa Moreira, Caio Agostini Calheiros Grosso, Luciana de Andrade Agostinho

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o diagnóstico molecular tem demonstrado grandes avanços com a automação e criação de novas ferramentas com capacidade de análise genética em menor tempo e custo (BARRA; CAIXETA; COSTA; 2011).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) possibilita a detecção de diversas mutações no DNA e RNA por gerar milhões de cópias de regiões específicas dos ácidos nucleicos (OLIVEIRA, 2010). A técnica foi utilizada pela primeira vez para o diagnóstico pré-natal de hemoglobinopatias, como por exemplo, em anemia falciforme, na investigação mutações no gene responsável por expressar a beta-globina (BARRA; CAIXETA; COSTA; 2011).

Antes de realizar a PCR, deve-se realizar o cálculo e planejamento, por escrito, da quantidade de cada item que deverá ser inserido na reação. Deverão ser calculados para o volume final de cada reação (25 µL): a quantidade de cada *primer* (iniciador genético), solução tampão, Taq polimerase, dNTPs e ácidos nucleicos adicionados.

OBJETIVOS

Evidenciar os principais pontos durante uma reação de PCR, além de demonstrar que o planejamento da corrida diminui a chance de erros de uma reação.

EPI

- Luvas sem talco, jaleco, máscara e touca.

MATERIAL (10 REAÇÕES)

- 01 par de *primer* (iniciador genético) com 100 pmoles de cada um;
- 01 solução tampão para PCR suficiente para 10 reações (com dNTPs, íons). Esta solução tampão também é conhecida como *Master Mix*;
- Molécula de DNA pura de boa qualidade;
- 1 mL de água ultra pura (DNase e RNase free);
- 01 caneta de retroprojeter;
- 01 pisseta com hipoclorito 10%;
- 01 garrafa de 1L de Álcool Absoluto;
- 01 pipeta de cada volume: p10, p20 e p200;

- 01 rack de ponteiras para cada tipo de pipeta: p10, p20 e p200;
- 10 microtubos de 0,1/0,2 mL (compatível com a placa do termociclador);
- 10 microtubos de 1,5 mL.

EQUIPAMENTOS

- 01 espectrofotômetro;
- 01 vortex;
- 01 centrífuga;
- 01 fluxo laminar;
- 01 geladeira;
- 01 termociclador (opcional, caso queira dar prosseguimento a PCR e não realize apenas o planejamento da reação).

PROCEDIMENTOS

1ª etapa: Diluição das amostras

Após extração e quantificação/qualificação da molécula alvo, com auxílio de um equipamento, como por exemplo, o espectrofotômetro, calcular as diluições das amostras para determinar a quantidade de DNA inserida em cada reação (20-80 ng dependendo do protocolo). Caso a concentração em ng/μL da amostra estiver alta, diluí-la a em água ultra pura até que chegue a uma concentração ideal de acordo com a quantidade em ng/ensaio estipulada.

Exemplo:

Uma amostra que teve seu DNA extraído, após a quantificação/qualificação apresentou 80 ng/μL de concentração e fator de pureza 260/280: 1,8 e 260/230: 2,0. Para que esta amostra tenha volume final de 10 ng/μL deve-se seguir a equação 13.1.

$$\begin{aligned}
 CI \times VI &= CF \times VF \\
 80 \text{ ng}/\mu\text{L} \times VI &= 10 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 10 \mu\text{L} \\
 VI &: 1,25\mu\text{L de amostra}
 \end{aligned}$$

Equação 13.1: Cálculo da diluição da amostra de DNA para um volume final de 10 μL e 10 ng/μL.

Portanto, deve-se inserir 1,25 μL da amostra de DNA concentrada e completar até 10 μL , inserindo 8,75 μL de água ultra pura para se obter a concentração final de 10 ng/ μL .

2ª etapa: Planejamento da PCR

Com a amostra de DNA diluída, calcular a quantidade de *primer* (10 pmoles de cada), Master Mix (1x), de DNA (20-80 ng/reação, sugestão de início: 50 ng) e de Taq polimerase (1-5 unidades por reação ou 1x em relação ao volume final) para volume final de 25 μL . Com a quantidade estipulada de cada item que deverá ser inserido na reação de PCR, multiplicar a quantidade por reação de cada um, pelo número total de reações realizadas somando-se 2 extras.

Exemplo:

Para 13 reações de PCR, devemos calcular 15 unidades com 2 extras. Para cada reação utilizaremos 1 μL de cada *primer* (com quantidade de 10 pmoles, com concentração inicial de 10 pmoles/ μL), 12,5 μL de Master Mix 2x, 1 μL de Taq Polimerase (sendo 2 U/ μL) e 5 μL de DNA (sendo 10 ng/ μL , inserindo 50 ng no total) e água ultra pura q.s.p. (quantidade suficiente para) para um volume final de 25 μL (Tabela 13.1).

Tabela 13.1: Cálculo da quantidade de *primer* e master mix adicionados na solução trabalho para 15 reações.

Preparo da reação de PCR no laboratório	Reações (μL)	
	1 reação*	15 reações
<i>Primer</i> 1	1 (10 pmoles)	15
<i>Primer</i> 2	1 (10 pmoles)	15
Master Mix 2x	12,5 (1x)	187,5
Água Ultrapura	4,5	67,5
Taq Polimerase	1 (2 U)	15
DNA alvo	5 (50 ng)	será colocado individualmente
Volume final	25	--
*Total de 25 μL em cada reação		

Nota: Este processo deve ser realizado dentro do fluxo laminar na ordem da tabela anterior. A Taq polimerase só deve ser retirada da refrigeração na hora da pipetagem. Todos os reagentes devem ser misturados e centrifugados (5 segundos) antes do uso.

Após inserir todos os itens com exceção do DNA, a reação deve ser agitada no vórtex e deve ser colocados 20 µL em cada tubo das reações planejadas. O DNA deve ser inserido fora do fluxo laminar e em um tubo de cada vez.

3ª etapa: Esquema das amostras na placa ou strip (fileira de microtubos de 8 unidades)

Em uma tabela esquematizar a posição das amostras (Figura 13.1) para que não ocorra troca das mesmas durante a análise dos resultados no final do processo.

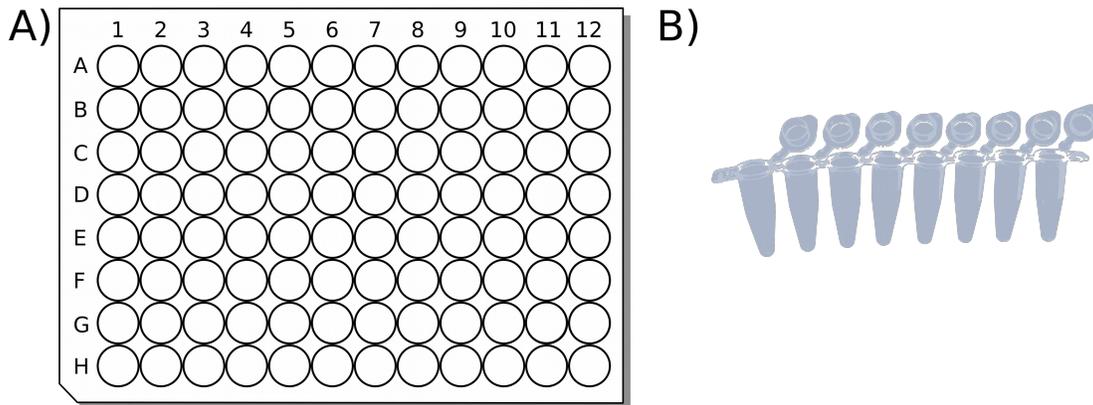


Figura 13.1: A) Placa de 96 poços utilizada para corrida PCR. B) Strip utilizada para corrida PCR

4ª etapa: Organização da bancada para início da reação de PCR

1. Lavar as mãos, colocar EPIs.
2. Preparar a bancada limpando com hipoclorito 10% e logo em seguida álcool 70%.
3. Forrar com papel lençol a bancada onde ocorrerá a reação.
4. Organizar na bancada, em estantes, os microtubos, água ultra pura, caneta de retroprojeter para escrever nos tubos, pipetas p10, p20 e p200, ponteiras, vórtex e centrífuga de microtubos.
5. Deixar as amostras já diluídas (conforme 1ª etapa deste protocolo), descongeladas em bancada, e preparar previamente a reação de PCR no fluxo laminar.

5ª etapa: Preparo da PCR no fluxo laminar

1. Ligar o fluxo laminar e limpar com álcool 70%.
2. Ligar UV com ponteiras expostas, dentre outros materiais utilizados, por 30 minutos.
3. Vortexar e centrifugar todos os reagentes utilizados na PCR.
4. Em um tubo de 1,5 mL adicionar a quantidade total de todos os itens conforme tabela 13.1 deste protocolo.
5. Adicionar em cada tubo 20 µL da solução de PCR previamente misturada em vortex sem o DNA alvo.

Nota: A solução de PCR contém todos os componentes necessários para que a reação de PCR ocorra, como: Taq Polimerase (realiza a extensão da cadeia de DNA), dNTPs (são adicionados pela DNA polimerase estendendo a nova cadeia de DNA: dNAPs, dNTPs, dNGPs, dNCPs), solução tampão com íons e principalmente Cloreto de Magnésio (proporciona energia para a atividade da Taq polimerase e regula o pH da solução) e água ultra pura (diluição dos reagentes para determinar a concentração final de acordo com o volume final).

6. Após adicionar os reagentes no fluxo, tampar a placa ou strip (microtubo) e levar até a bancada para realizar a inserção das amostras de DNA.
7. Adicionar cada amostra de acordo com o planejamento da 3ª etapa. Ao inserir cada amostra nos tubos, fazer *Up and Down* (homogeneização) com a pipeta 5x.
8. Vedar o tubo ou placa, no caso de placa vedar com adesivo óptico.
9. Centrifugar brevemente, removendo resíduos dos reagentes na tampa e bolhas.

6ª etapa: Ciclos de temperatura para a reação de PCR (etapa opcional)

1. Colocar o microtubo no termociclador (Figura 13.2) sem fazer movimentos bruscos.



Figura 13.2: Termociclador.

2. Fechar a tampa do equipamento.
3. Programar a ciclagem utilizada durante as etapas da PCR em suas três etapas: Desnaturação prévia, hibridação e extensão da cadeia (Figura 13.3).

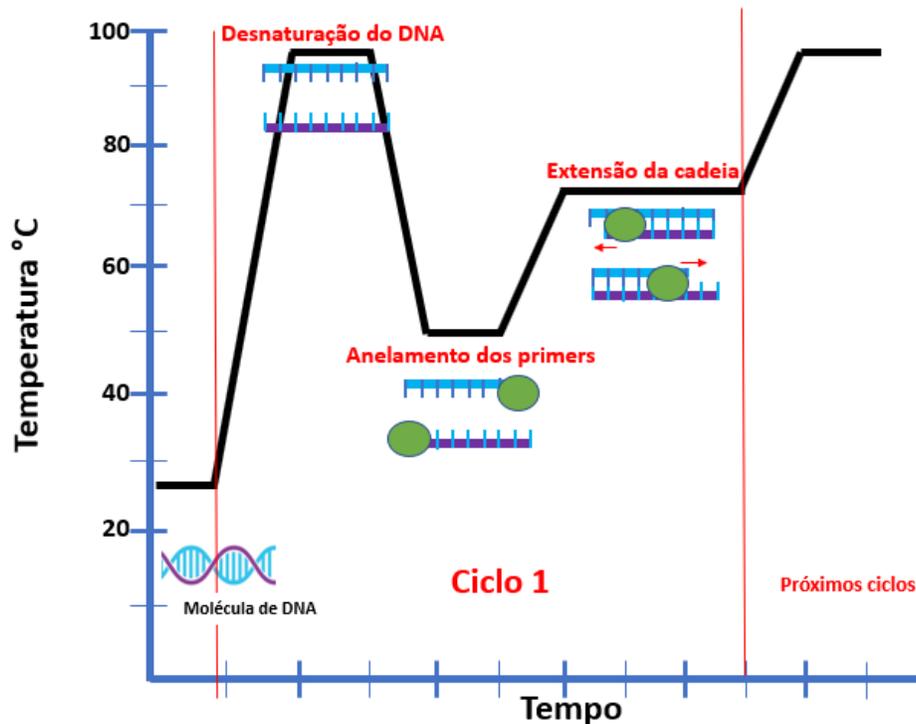


Figura 13.3: Ciclos de temperatura da PCR e as respectivas etapas: Desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e extensão da cadeia.

4. Iniciar a ciclagem e aguardar o final da reação.
5. Após o término, analisar as amostras por outra técnica, dependendo do tipo de alteração genética investigada. Ex: Gel de agarose, análise de fragmentos, sequenciamento Sanger, sequenciamento NGS.

Informações técnicas

Cálculo da reação de PCR

- Diluição, quantificação e qualificação da amostra: No caso de baixa concentração de DNA pode ocorrer à perda de sensibilidade de detecção e até mesmo em resultado falsos negativos. A qualificação referente aos

fatores 260/280 e 260/230 nm do espectrofotômetro é extremamente importante para determinar se existe contaminação de ácidos nucléicos. Para uma amostra pura, os valores do fator 260/280 ideais variam de 1,8-2,0 e do fator 260/230 de 1,8-2,2 para DNA (SCHRADER et al., 2012; HAQUE et al., 2003).

- Talco das luvas: O talco é um dos principais inibidores da técnica descritos em literatura (SCHRADER et al., 2012).
- Limpeza da bancada com hipoclorito: O hipoclorito tem a função de degradar qualquer tipo de DNA presente na bancada. Sendo assim, impede que a amostra extraída naquele dia não seja contaminada por resquícios de DNA de outra extração (PRINCE; ANDRUS, 1992).

QUESTÕES

- 1) Com base na quantificação das amostras, realizar os cálculos da diluição das 3 amostras. Para um volume total de 25 μL igualar a concentração das amostras para inserir em cada uma 40ng/ensaio. Calcular a diluição de cada uma e o volume que deverá ser inserido em cada reação de PCR (Tabela 13.2). Sugestão de volume inserido de amostra = 5 μL . Sugestão de volume final da diluição de cada amostra = 10 μL .

Tabela 13.2: Características das amostras investigadas.

Amostra	ng/ μL	A260/A280	A260/A230	Volume final (μL)	Água ^a	Amostra ^b	Amostra diluída ^c (ng/ μL)	Concentração final (ng/ μL) da reação ^d	Concentração final em ng/ensaio ^e
Amostra1	80	1,85	2						
Amostra2	50	1,7	1,2						
Amostra3	65	1,8	1,9						

a Água inserida para diluição das amostras;

b Amostra concentrada;

c Concentração em ng/ μL da diluição das amostras para um volume final de 10 μL ;

d Concentração final em ng/ μL da reação de PCR, com um volume final de 25 μL ;

e Concentração final em ng/ensaio das amostras.

- 2) Esquematize as 3 amostras testadas. Não se esqueça que você deve incluir os 3 controles: os dois tipos de controles negativos, um com amostra sem mutação e outro sem amostra, e o controle positivo com amostra com presença de mutação. Todos devem ser analisados em duplicata. Quantos microtubos você vai usar ao todo? Usaria placa (96 poços) ou *stripes* (de 8 microtubos, cada)?

- 3) Calcule a quantidade de reagentes utilizados para a reação de PCR da questão anterior, lembrando de adicionar 2 reações extras devido à perda de reagentes durante a pipetagem que geralmente ocorre (Tabela 13.3). Calcule as quantidades para uma reação e para o número de ensaios que deseja realizar. Sugestão: Inserir 1 U de enzima em cada reação e 10 pmoles de cada *primer*.

Tabela 13.3: Cálculo da quantidade de *primer* e master mix adicionados na solução trabalho para reação de PCR. Concentração inicial de cada item: Cada *primer* tem 20 pmoles/ μL ; Taq Polimerase está em 2 U/ μL ; Master Mix está em 2x de concentração.

Preparo da reação de PCR no laboratório	Reações (μL)	
	1 reação	__ reações
<i>Primer 1</i>	0,5	
<i>Primer 2</i>	0,5	
Master Mix 2x	12,5	
Água Ultra pura	6,5	
Taq Polimerase	1	
DNA alvo	5	
Volume final	25	
*Total de 25 μL em cada reação		

REFERÊNCIAS

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.1.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

HAQUE, Kashif A. et al. Performance of High-Throughput DNA Quantification Methods. *BMC Biotechnology* 3, 2003.

PRINCE, A. M.; ANDRUS, L. PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques*, Mar;12(3), p. 358-60, 1992.

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.1.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors- occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* v. 113, n. 5, p. 1014-26, nov. 2012.

PRÁTICA 14 - GEL DE AGAROSE E CORRIDA ELETROFORÉTICA

Autores: Tiago César Gouvêa Moreira, Caio Agostini Calheiros Grosso, Luciana de Andrade Agostinho

INTRODUÇÃO

A eletroforese em gel é caracterizada pela migração de partículas carregadas sob a influência de um campo elétrico devido ao seu peso molecular. Diversos tipos de moléculas biológicas, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos podem migrar para o anodo ou catodo, dependendo de sua carga predominante. O equipamento utilizado para corrida eletroforética deve conter fonte de energia (carga positiva e negativa) e uma unidade de eletroforese (gel e cuba) na qual ocorrerá a migração destas moléculas. As cubas de eletroforese podem ser divididas em duas formas, de acordo com o sentido de migração, podendo ser vertical ou horizontal (WILSON; WALKER, 2010).

O tipo de matriz (gel) utilizada para a corrida vai depender de acordo com o tamanho do fragmento de DNA em pares de base na qual pretende investigar, que deve ser compatível com a natureza da matriz conforme o tamanho dos seus poros. Para fragmentos que variam entre 0,2 quilobases (kb) a 50 kb (1 kb= 1000 pares de bases) utiliza-se o gel de agarose, já para fragmentos menores, em até 1 kb, utiliza-se a poliacrilamida (REINIGER et al., 2004; SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A sensibilidade de detecção das bandas de DNA ao serem visualizados no transiluminador UV após corrida, ocorre quando a amostra possui mais que 5 ng/ensaio (GREEN; SAMBROOK, 2012).

Atualmente com a automação desta técnica, como a técnica de análise de fragmentos por eletroforese capilar automatizada, foi possível realizar diagnóstico de diversos tipos de alterações genéticas impactando diretamente no tratamento, prognóstico e diminuição de risco de várias doenças.

OBJETIVOS

Treinar e evidenciar os principais pontos do preparo do gel de uma corrida eletroforética.

EPI

- Luvas com talco, luvas térmicas, óculos e jaleco.

MATERIAL (GRUPO DE ALUNOS PARA 6 AMOSTRAS ANALISADAS)

- 01 vidro de álcool 70%;
- 3 gramas de agarose em pó;
- 01 espátula;
- 01 Litro de tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA), sendo 150 mL para o gel e 850 para cobrir a cuba eletroforética (pode-se usar água destilada caso não tenha);
- 01 Erlenmeyer de vidro de 250 mL;
- 6 microtubos de 0,2 mL ou 1,5 mL;
- 01 pipeta P20;
- 24 ponteiros para pipeta P20;
- 10 µL de escala alélica (ladder);
- 20 µL de tampão marcador de corrida (*Gel Loading Buffer*) (usar na proporção corante/amostra 1:5);
- 12 µL de corante de DNA (marcador de DNA para UV), item opcional para visualização do gel no transiluminador. Sugestão de corantes e proporção corante/amostra, GelRed® e Syber® Green e 1:5, respectivamente.

EQUIPAMENTOS

- 01 micro-ondas;
- 01 kit completo de cuba horizontal para eletroforese em gel;
- 01 transiluminador UV (opcional se for visualizar o gel após a corrida);
- Vortex;
- Centrífuga para microtubos.

Em caso de falta de cuba de eletroforese em gel para todos os grupo, utilizar a placa de Petri para solidificar a matriz de agarose.

PROCEDIMENTOS

1ª etapa: Preparação do gel de agarose: Protocolo de preparo de 150 mL de gel de agarose a 3% (m/v).

1. Lavar as mãos e colocar luvas e jaleco.
2. Limpar a bancada com álcool 70%.
3. Realizar o cálculo de quanto utilizar em gramas de agarose de acordo com a concentração estipulada da trama (Equação 14.1). Em nosso caso 3% (m/v).

Para a preparação de 150mL de um gel de agarose a 3% (m/v) de concentração, deve-se primeiramente calcular quantos gramas de agarose concentrada (100%) será utilizada para diluição em tampão TAE.

$$\begin{aligned} CI \cdot VI &= CF \cdot VF \\ 100 \cdot x &= 3 \cdot 100 \\ 100x &= 300 \\ x &= 300/100 \\ x &= 3g \text{ agarose para } 100mL \text{ de Tampão TAE} \end{aligned}$$

Equação 14.1: Cálculo da quantidade de agarose em gramas necessária para chegar à concentração de 3% (m/v) em um volume final de 100mL.

4. Para 100 mL usa-se 3 g, em 150 mL, usaremos 4,5 gramas.
5. Pesar 4,5 g em balança analítica em uma folha de papel alumínio com auxílio da espátula e transferir esta quantidade para um Erlenmeyer de vidro de 250 mL (cuidado para não derramar).
6. Adicionar 150 mL de tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x no Erlenmeyer. Caso o tampão esteja concentrado (50x), diluir em água destilada antes para que fique 1x.
7. Após cálculo, preparar 150mL do tampão TAE 1x (ou água) e despejar no Erlenmeyer contendo a agarose.
8. Homogeneizar bastante até que todo o pó de agarose se misture no tampão.
9. Esquentar em micro-ondas de 2-3 minutos esta solução. Observar a solução atentamente para evitar derramamento da solução durante a fervura, se ferver antes, desligue o micro-ondas. Colocar a luva térmica para evitar queimaduras nas mãos.
10. Pausar o micro-ondas de 30/30 segundos e homogeneizar a mistura.
11. Fazer isso até completar 2 minutos ou até que a solução inicie fervura. As bolhas do gel devem desaparecer rapidamente, caso não ocorra, colocar mais tempo de aquecimento sob observação até fervura.
12. Quando terminar, esfriar o Erlenmeyer com a solução em torneira com água corrente.
13. Após esfriar com a solução verificar a temperatura em pele, se estiver morna, despejar na cuba ou placa de Petri que será realizada a corrida eletroforética (o gel deve estar líquido durante sua transferência e deve-se evitar bolhas).
14. Colocar imediatamente o pente na cuba ou placa de Petri, para formar os poços para inserir depois as amostras da corrida.

15. Esperar por 30 min até que o gel solidifique e retirar o pente.
16. Após solidificado, transferir o gel para dentro da cuba e adicionar tampão de corrida TAE 1x até cobrir toda a superfície do gel.

2ª etapa: Inserção das amostras e corrida eletroforética

1. Verificar se a cuba e a os fios da corrente elétrica estão prontos para o uso e se a cuba está posicionada corretamente na horizontal sem desníveis. Utilizar inicialmente 100V em 1 hora de corrida para fragmentos de 100-300 pb (varia de acordo com o tamanho do fragmento analisado).
2. Em tubos de 0,2 ou 1,5 mL preparar as amostras de DNA inserindo *Gel Loading Buffer* conforme proporção mencionado anteriormente. Sugestão: Para 10 µL de amostra em cada poço do gel, usar 2 µL de corante de DNA e 2 µL de *Gel Loading Buffer*, com volume final de 14 µL.
3. Etapa opcional, em caso de posterior análise pelo transiluminador UV. Em um dos poços deve ser inserida a escala alélica (ladder) para comparação dos fragmentos de DNA investigados. Colocar 10 µL de ladder na primeira posição do gel com 2 µL de corante e 2 µL de *Gel Loading Buffer*.
4. Antes de utilizar os reagentes e amostras, agitar no vortex e centrifugar brevemente. Após o preparo de cada amostra repetir a mistura e centrifugação antes de inserir no gel.
5. Com o gel imerso sobre o tampão TAE dentro da cuba, adicionar as amostras, inclusive o ladder (opcional) nos poços do gel de agarose.
6. Ligar a cuba entre 100-150 Volts durante a corrida e observar se o DNA está migrando corretamente através do gel.
7. Após a corrida (1 a 1:30 hora), retirar o gel da cuba e observar a olho nu a marcação do *Gel Loading Buffer*.
8. Para visualizar o DNA (opcional), colocar o gel no transiluminador UV para avaliar as bandas das amostras em comparação com a escala alélica. Não esqueça o uso dos EPIs.

Informações técnicas

Preparo do gel

Para que ocorra um preparo correto do gel de agarose atentar-se para a colocação do pente no gel para formação dos poços de corrida, o pente não deve ultrapassar toda a altura do gel, deve-se evitar poços abertos ao final do gel para a inserção das amostras sem vazamentos.

Corrida das amostras

Deve-se alinhar a cuba para que não tenha desníveis que possam influenciar no resultado da corrida. As amostras devem ser adicionadas no gel imerso com TAE cuidadosamente, certificando que a pipeta está alcançando o interior de cada poço do gel antes de realizar a pipetagem. Durante a corrida do gel, deve-se verificar o nível do *Gel Loading Buffer* para evitar que o DNA ultrapasse todo o gel e saia dele. Regular a voltagem caso a velocidade de migração das bandas esteja baixa. Ao final, retirar cuidadosamente o gel da cuba para observação das marcações do *Gel Loading Buffer*. Caso realizem a análise do DNA, o gel deve ser colocado no transiluminador UV (opcional).

Preparo do Gel Loading Buffer

Reagentes: 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.03% azul de bromofenol, 0.03% xileno cianol, 60% glicerol, 60mM EDTA. Sugestão: 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xileno cianol, 30% de glicerol em 10 mL de água destilada para preparar o tampão de corrida em 6x. Armazenar em temperatura ambiente.

Preparo do Tampão TAE 50x (para armazenar)

Reagentes: 40mM Tris Base (Tris Hidroxi-metil Amino Metano PA) – 242 g (pH = 8); Ácido Acético Glacial 57,1 mL; 0,5 M EDTA (pH=8) = 18,6 g em 100 mL. Para fazer TAE 1x, diluir 20 mL desta solução (50x) em 980 mL de água destilada para volume final de 1 Litro. Armazenar em temperatura ambiente e autoclavar se necessário. Fonte: MANIATIS, 1982.

QUESTÕES

- 1) Um pesquisador realizou amplificação do DNA pela técnica de PCR de uma amostra e precisa analisar o fragmento de DNA (amplicon) gerado para detecção de uma deleção de 200 pb.
- a) A escolha da técnica da corrida de eletroforese em gel foi correta? Não seria melhor realizar o sequenciamento genético daquela região para avaliar a presença da deleção? Justifique sua resposta.

- b) Marque a opção correta (A, B, C, ou D) em qual posição colocar o gel de agarose com DNA dentro da cuba para que corrida em gel ocorra na direção correta (Figuras 14.1 e 14.2).

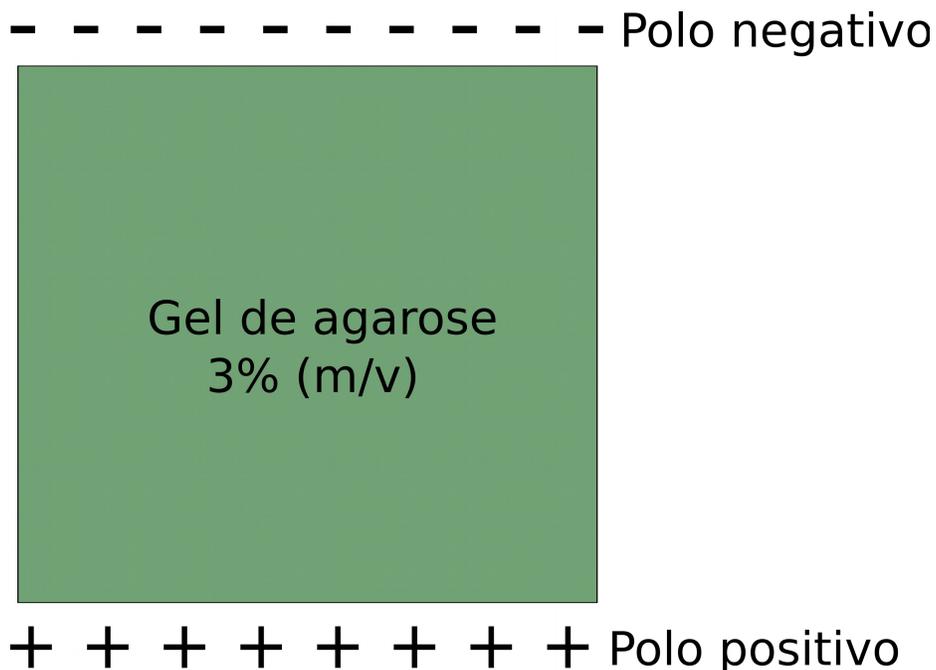


Figura 14.1: Esquema de uma cuba de eletroforese e seus polos positivo e negativo.

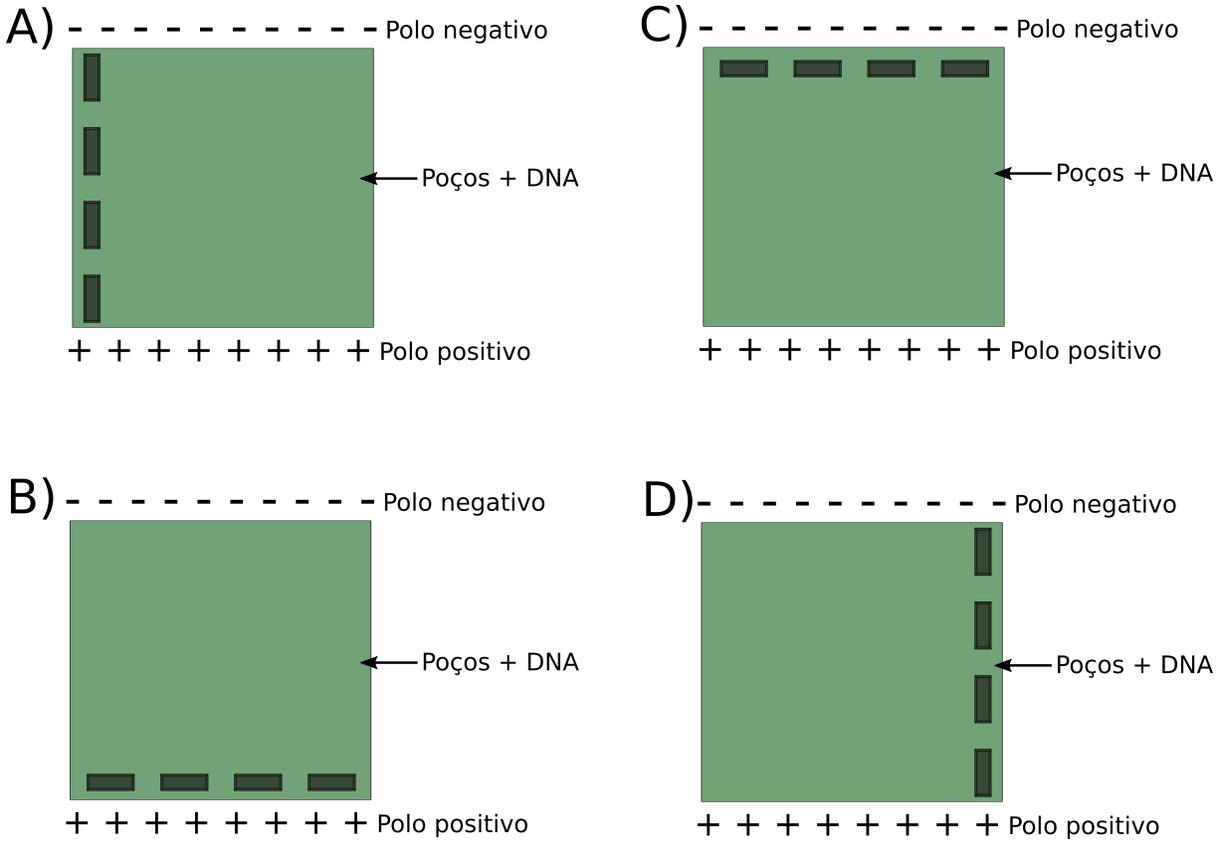


Figura 14.2: Questão sobre a posição do gel e os poços com DNA na cuba de eletroforese com seus respectivos polos positivo e negativo.

- 2) Para análise de uma determinada mutação genética foi escolhida a corrida de eletroforese em gel de agarose. Sendo assim, calcule a quantidade em gramas de agarose utilizar para preparação de 500mL de gel a uma concentração de 1,5% (m/v).

REFERÊNCIAS

SAMBROOK J.; RUSSELL DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

MANIATIS T.; FRITSCH EF; SAMBROOK J. Molecular cloning: A laboratory manual. 1.ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

REINIGER et al. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. Ciência Rural, v. 34, n.5, set-out, 2004.

SAMBROOK J.; RUSSELL DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 2001.

GREEN RM, SAMBROOK J. Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL. 4 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 2012.

WILSON Keith, WALKER John. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed. Page 399, 2010.

BIOLOGIA GERAL

VOLUME II

Citologia, Genética e Biologia Molecular

