

Manual de Biossegurança da Embrapa Amazônia Oriental



ISSN 1983-0513
Março, 2018

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 436

Manual de Biossegurança da Embrapa Amazônia Oriental

*Simone de Miranda Rodrigues
Elisa Ferreira Moura Cunha
Luciana Gatto Brito
Ilmarina Campos de Menezes*

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2018

Disponível no endereço eletrônico: <https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>

Embrapa Amazônia Oriental

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.

CEP 66095-903 – Belém, PA.

Fone: (91) 3204-1000

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicação

Presidente: *Bruno Giovany de Maria*

Secretária-Executiva: *Ana Vânia Carvalho*

Membros: *Luciana Gatto Brito*

Alfredo Kingo Oyama Homma

Sheila de Souza Corrêa de Melo

Andréa Liliane Pereira da Silva

Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana

Colaboradora: Leonaria Silva Souza

Supervisão editorial, tratamento de imagens e editoração eletrônica: *Vitor Trindade Lobo*

Revisão de texto: *Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana*

Normalização bibliográfica: *Andréa Liliane Pereira da Silva*

1ª edição

Publicação digitalizada (2018).

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Amazônia Oriental

Manual de biossegurança da Embrapa Amazônia Oriental / Simone de Miranda Rodrigues... [et al.]. – Belém, PA : Embrapa Amazônia Oriental, 2018.
99 f. : il. ; 15 cm x 21 cm. – (Documentos / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513; 436).

Disponível em: <<https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>>

1. Biossegurança. 2. Saúde. 3. Laboratório. 4. Meio ambiente. I. Rodrigues, Simone de Miranda. II. Série. III. Embrapa Amazônia Oriental.

CDD 620.82

© Embrapa 2018

Autoras

Simone de Miranda Rodrigues

Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento,
pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental,
Belém, PA

Elisa Ferreira Moura Cunha

Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento,
pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental,
Belém, PA

Luciana Gatto Brito

Médica-veterinária, doutora em Sanidade Animal,
pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental,
Belém, PA

Ilmarina Campos de Menezes

Agrônoma, doutora em Cultura de Tecido,
pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental,
Belém, PA

Apresentação

Biossegurança é o conjunto de procedimentos, métodos e ações capazes de eliminar ou minimizar riscos intrínsecos a atividades de pesquisa e extensão, que podem comprometer a saúde do trabalhador, tornando necessário e essencial a adoção de medidas associadas a um plano de educação, considerando as normas nacionais e internacionais de segurança vigentes.

Conseqüentemente, esta publicação tem por objetivo auxiliar usuários de laboratórios com Certificado de Qualidade em Biossegurança, como os laboratórios de Genética Molecular e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, para que conheçam conceitos, metodologias e regras que devem ser seguidos rotineiramente, visando à proteção da sua saúde e do meio ambiente, com foco na redução de riscos de modo geral.

Adriano Venturieri

Chefe-Geral da Embrapa Amazônia Oriental

Sumário

Manual de Biossegurança da Embrapa Amazônia Oriental	.09
Introdução	09
Definições	10
Classificação de risco biológico	14
Níveis de biossegurança	17
Recomendações e procedimentos de biossegurança 1 (NB-1)	21
Equipamentos de Proteção Individual (EPIs)	22
Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs)	23
Procedimentos mínimos para trabalho em áreas com CQB	24
Procedimentos de descarte de material biológico	25
Manuseio de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e infrações	26
Literatura recomendada	30

Anexos	32
Anexo 1. Placas sugestivas (Emergência e Segurança).....	32
Sinalização de emergência	32
Símbolos de segurança	34
Anexo 2. Procedimentos Operacionais Padrão (POPs)	36
Preparo de soluções e diluição de reagentes	36
Preparo de amostras e extração do DNA vegetal para ensaio de PCR...42	
Preparo de amostras e extração do DNA de mosca-dos-chifres (<i>Haematobia irritans</i>)	47
Preparo de amostras e extração do DNA de larvas do carrapato de bovinos para ensaio de PCR de mutação de alelo	51
Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega.....	54
Purificação de produto de PCR – Invitrogen_Life Technologies	66
Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM - T Easy Vector System Promega	70
Preparo de soluções desinfetantes utilizadas em atividades de rotina ...	87
Desinfestação de material vegetal (rizoma de banana, <i>Musa</i> sp.) para inoculação in vitro.....	91
Desinfestação de material vegetal (pimenteira-do-reino, <i>Piper</i> <i>nigrum</i> L.) para inoculação in vitro	96

Manual de Biossegurança da Embrapa Amazônia Oriental

Simone de Miranda Rodrigues

Elisa Ferreira Moura Cunha

Luciana Gatto Brito

Ilmarina Campos de Menezes

Introdução

A Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da Embrapa Amazônia Oriental foi criada em atendimento à Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, que estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização para as técnicas de manipulação de organismos geneticamente modificados (OGM), a qual é regulada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), tendo como orientações o estímulo ao avanço científico nas áreas de Biossegurança e Biotecnologia, visando à proteção à vida, à saúde animal e vegetal e ao meio ambiente.

Desse modo, o Manual de Biossegurança da Embrapa Amazônia Oriental foi elaborado no intuito de disponibilizar de forma organizada aos colaboradores da Unidade as normas, responsabilidades e procedimentos de rotina que devem ser realizados nas áreas que possuem Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB), com a finalidade de eliminar e/ou diminuir os riscos envolvidos nas atividades laboratoriais, preservando, assim, a segurança das pessoas e do ambiente de trabalho.

São apresentadas as recomendações em biossegurança realizadas pela Embrapa e que devem ser adotadas por todos os usuários nas dependências dos laboratórios de Genética Molecular e Biotecnologia da Unidade, visto que tais laboratórios compartilham o CQB 263/08, que os habilita a desenvolver atividades envolvendo OGMs pertencentes à classe de risco 1, Nível de Biossegurança NB-1.

Vale ressaltar que a CIBio da Embrapa Amazônia Oriental é o comitê deliberativo e fiscalizador das atividades envolvendo manipulação e uso de OGMs no âmbito desta Unidade da Embrapa, ao qual compete monitorar e vistoriar todas as atividades com OGM e seus derivados, fazendo-se cumprir as normas de biossegurança estabelecidas pela CTNBio.

Definições

Agentes infecciosos – São aqueles com potencial para causar infecções, doenças ou lesões, em graus variados, aos seres humanos ou a outros organismos, tais como bactérias, fungos, vírus, OGMs e protozoários, entre outros.

Biossegurança – É um conjunto de procedimentos, ações, técnicas, metodologias, equipamentos e dispositivos capazes de prevenir, eliminar ou minimizar riscos inerentes a todos os tipos de atividade que possam comprometer a saúde humana, animal e do meio ambiente, portanto, preza pela segurança de modo geral. Entretanto, no âmbito da Lei de Biossegurança (nº 11.105, de 24 de março de 2005), o foco de atenção são os OGMs.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) – É uma instância colegiada multidisciplinar, criada por meio da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao governo federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGM, bem como no estabelecimento de normas técnicas

de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados. É a responsável pela emissão do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) para o desenvolvimento de atividades com OGMs no País.

Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) – É a instância colegiada responsável pelo monitoramento e vigilância das atividades com OGM e seus derivados e por fazer cumprir as normas de biossegurança vigentes determinadas pela CTNBio. São de sua responsabilidade a divulgação e verificação do cumprimento das normas e recomendações da CTNBio, por meio de comunicações e inspeções de instalações e equipamentos. A CIBio também se configura como instância deliberativa local para avaliação e acompanhamento das atividades de pesquisa, desenvolvimento e prestação de serviços que utilizem OGMs e derivados em sua condução, além de acompanhamento do trânsito de material geneticamente modificado entre diferentes áreas com CQB. Toda instituição que se dedique ao ensino, à pesquisa científica, ao desenvolvimento tecnológico e à produção industrial que utilize técnicas e métodos de engenharia genética, realize pesquisas com OGMs e seus derivados, ou precise importar OGM e seus derivados deverá criar uma CIBio. Na Embrapa Amazônia Oriental, a CIBio é subordinada ao chefe-geral da Unidade, que responde legalmente por qualquer ação que viole a Lei de Biossegurança nº 11.105/2005, e que, juntamente com a CIBio, fica encarregado de assegurar a observância das disposições da Resolução da CTNBio envolvendo OGMs.

Classe de risco – Classe de risco de OGM se baseia na Resolução Normativa nº 2 da CTNBio, de 27 de novembro de 2006, sendo principalmente orientada pelo potencial de risco que um determinado microrganismo patogênico oferece ao indivíduo, à comunidade e ao meio ambiente.

Clonagem – É o processo de reprodução assexuada baseada em um único patrimônio genético, com ou sem utilização de técnicas de engenharia genética.

Contenção – São ações e métodos de segurança utilizados durante a manipulação de materiais biológicos considerados de risco dentro do laboratório, tendo como objetivo a redução ou minimização de exposição a riscos dos profissionais que atuam no ambiente.

Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) – É necessário às entidades nacionais, estrangeiras ou internacionais, para que possam desenvolver atividades relativas a OGM e derivados, devendo ser requerido pelo proponente e emitido pela CTNBio (cf. art. 8º do Decreto 1.752, de 20 de dezembro de 1995). As agências financiadoras ou patrocinadoras de atividades ou de projetos que preveem o uso de OGM deverão exigir o CQB das instituições beneficiadas.

Engenharia genética – É a atividade de produção e manipulação de moléculas de DNA/RNA recombinante para fins de manipulação dos genes de qualquer organismo a partir de experimentos artificiais, resultando na duplicação, transferência ou isolamento de genes-alvos.

Organismo doador – É o organismo doador de sequência de DNA ou RNA que será usada para transformar geneticamente um organismo receptor, via engenharia genética.

Organismo receptor – É o organismo que irá sofrer a transformação genética por meio da utilização de técnicas de engenharia genética.

Organismo Geneticamente Modificado (OGM) – É todo organismo que recebeu material genético de outro organismo de modo a favorecer alguma característica desejada.

Equipamento de Proteção Coletiva (EPC) – São itens fixos ou móveis, instalados a fim de propiciar a proteção coletiva de todos aqueles que

compartilham um determinado ambiente e visam proteger a saúde e a integridade física dos trabalhadores em ambientes laborais factíveis de exposição a situações de risco, sejam eles químicos, físicos ou biológicos. Entre os principais EPC destacam-se: fitas, placas de sinalização, grades e dispositivos de bloqueio, barreiras contra luminosidade e radiação, exaustores, corrimão, chuveiros, pias, etc. Não proporcionam incômodo ao trabalhador e protegem a integridade física dos colaboradores e de terceiros presentes.

Equipamento de Proteção Individual (EPI) – É todo dispositivo de uso individual utilizado pelo trabalhador, destinado a evitar danos à saúde e à vida do trabalhador. A empresa é obrigada a fornecer gratuitamente aos empregados e em perfeito estado de conservação e funcionamento os EPIs adequados ao risco ao qual o colaborador será exposto. São considerados como EPIs: protetores da cabeça, olhos e face, auditiva, respiratória, membros superiores e inferiores, como capacete, óculos, máscaras, respiradores, luvas, jalecos, sapatos, entre outros.

Material biológico – É todo material que contém informação genética e é capaz de autorreprodução ou de ser reproduzido em um sistema biológico, incluindo os organismos cultiváveis e microrganismos, as células humanas, animais e vegetais, as partes replicáveis destes organismos, células/partículas/fragmentos (bibliotecas genômicas, plasmídeos, vírus e fragmentos de DNA clonado), príons e os organismos ainda não cultivados.

Nível de Biossegurança (NB) – Consiste no nível de contenção necessário para promover a proteção e a segurança necessárias em um determinado ambiente, e que indica o nível do método de biossegurança que deve ser utilizado e adverte sobre o grau de proteção e contenção necessários para que se permita a realização de atividades em que se utilizam OGMs de forma segura e com risco mínimo para o operador e para o meio ambiente.

Procedimento Operacional Padrão (POP) – É um documento que descreve todo o planejamento do trabalho a ser executado, contendo uma descrição detalhada de todas as etapas necessárias para a realização de uma tarefa.

Risco – É a probabilidade de um evento acontecer, seja ele uma ameaça, quando negativo, ou oportunidade, quando positivo, decorrente de processos ou situações envolvendo OGM e seus derivados.

Risco biológico – Considera-se agentes de risco biológico as bactérias, fungos, parasitos, vírus, entre outros, que apresentam a capacidade de causar danos a outros seres vivos, como animais e plantas, ou ao ambiente, e ainda qualquer organismo que tenha sido manipulado geneticamente (OGMs).

Trabalho em contenção – É a atividade com agentes biológicos patogênicos ou potencialmente patogênicos aos seres vivos e ao ambiente em condições que não permitam seu escape ou liberação para o ambiente, podendo ser realizada em pequena ou grande escala.

Vetor – É o agente carreador da sequência genômica que será introduzida no organismo receptor.

Classificação de risco biológico

Considera-se agentes de risco biológico todo organismo, partícula ou substância oriunda de um organismo que traz qualquer tipo de ameaça, como bactérias, fungos, parasitas, vírus, entre outros, assim como qualquer organismo que tenha sido manipulado geneticamente (OGM). Tais agentes de risco biológico podem provocar inúmeras doenças, incluindo tuberculose, brucelose, malária e febre amarela, quando um colaborador é exposto a estes agentes patogênicos sem que corretas medidas de proteção e contenção estejam presentes. As principais vias envolvidas num processo de contaminação biológica são

as vias cutânea, respiratória (aerossóis), conjuntiva e oral. Os riscos são avaliados em função do poder patogênico do agente infeccioso, da sua resistência no meio ambiente, do modo de contaminação, da importância da contaminação (dose), do estado de imunidade do manipulador e da possibilidade de tratamento preventivo e curativo eficaz. Os agentes biológicos que afetam a saúde do homem e do meio ambiente são distribuídos em classes de risco assim definidas:

Classe de risco 1 – Baixo risco individual e para a coletividade. Inclui os agentes biológicos conhecidos por não causarem enfermidades humanas ou de importância veterinária. Ex: *Lactobacillus* sp.; *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*, entre outros. Requer o nível 1 de contenção para a manipulação dos agentes biológicos da classe de risco 1. Não há necessidade de isolamento de área, sendo suficiente a adequação do espaço para a realização das atividades e a adoção de boas práticas laboratoriais.

Classe de risco 2 – Risco individual moderado e limitado risco para a comunidade. Inclui os agentes biológicos que provocam infecções no homem ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, porém dispõe-se de medidas eficazes de tratamento e prevenção. Ex: *Schistosoma mansoni*; *Chlamydia pneumoniae*; *Escherichia coli* (todas as cepas enteropatogênicas, enterotoxigênicas, enteroinvasivas e detentoras do antígeno K1); *Haemophilus influenzae*; *Helicobacter pylori*; *Salmonella* ssp (todos os sorotipos); *Trypanosoma* spp.; *Rhizoctonia* spp; *Papillomavirus*, entre outros. Requer o nível 2 de contenção para a manipulação dos agentes biológicos da classe de risco 2, sendo usado nos laboratórios clínicos ou hospitalares de níveis primários de diagnóstico. Há necessidade de treinamento, adoção das boas práticas, uso de EPIs e EPCs, e desenho e organização do laboratório.

Classe de risco 3 – Alto risco individual e moderado risco para a comunidade. Inclui os agentes biológicos que possuem capacidade de transmissão por via respiratória e que causam patologias humanas

ou animais potencialmente letais, entretanto, existe profilaxia e/ou tratamento preventivo. Ex: *Bacillus anthracis*; *Clostridium botulinum*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Coccidioides immitis*; *Herpesvirus*, *Retrovirus*, entre outros. Requer o nível 3 de contenção para a manipulação dos agentes biológicos da classe de risco 3. É necessário, além dos itens relatados na classe de risco 2, a construção de laboratórios especiais, que devem ter rígidos controles de acesso e operação, inspeção e manutenção das instalações e equipamentos.

Classe de risco 4 – Alto risco individual e para a comunidade. Inclui os agentes biológicos com grande poder de transmissibilidade por via respiratória ou de transmissão desconhecida, não havendo nenhuma medida profilática ou terapêutica eficaz, com alta capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Inclui principalmente os vírus. Ex: vírus Ebola; vírus da hepatite viral do pato tipos 1, 2 e 3, entre outros. Requer o nível 3 de contenção para a manipulação dos agentes biológicos da classe de risco 3. O laboratório é funcionalmente independente de outras áreas. São necessários, além dos itens relatados nas classes de risco 1, 2 e 3, barreiras de contenção e procedimentos especiais de segurança.

Classe de risco especial – Alto risco de causar doença animal grave e de disseminação no meio ambiente. Inclui agentes biológicos de doença animal não existente no País, que podem gerar graves perdas econômicas e/ou na produção de alimentos. Ex: vírus da aftosa com seus diversos tipos e variantes; vírus da cólera suína, vírus da peste aviária; vírus da peste bovina.

No caso de mais de uma espécie de um determinado gênero ser patogênica, são representadas pelo gênero seguido da denominação spp, indicando que outras espécies do gênero podem ser patogênicas. A classificação de parasitas e as respectivas medidas de contingenciamento se aplicam somente para os estágios de seu ciclo durante os quais sejam infecciosos para o homem ou animais. Os agentes incluídos na classe especial deverão ser manipulados

em área NB-4, enquanto ainda não circularem no País, devendo ter sua importação restrita, sujeita à prévia autorização das autoridades competentes.

No caso de OGM, a classe de risco resultante não poderá ser inferior à classe de risco do organismo receptor, exceto nos casos em que exista redução da virulência e patogenicidade do OGM. O OGM que contenha sequências de DNA/RNA de organismos ou agentes infecciosos desprovidos de potencial de expressão nas atividades e projetos propostos será classificado na mesma classe de risco do organismo receptor. O OGM que contenha sequências de DNA/RNA derivadas de organismos de classe de risco superior e com potencial de expressão poderá ser classificado na classe de risco do organismo receptor, a critério da CTNBio, desde que reconhecidamente não associadas à toxicidade ou patogenicidade nas atividades e projetos propostos.

Níveis de biossegurança

O nível de biossegurança de um procedimento será determinado segundo o agente biológico de maior classe de risco envolvido. A CTNBio é responsável pelas atribuições relativas ao estabelecimento de normas, análise de risco, definição dos Níveis de Biossegurança e classificação de OGMs, sendo verificado o potencial patogênico do organismo doador e receptor, as sequências nucleotídicas transferidas, a expressão das sequências no organismo receptor e a severidade dos danos. Todo OGM deverá possuir um marcador capaz de identificá-lo dentre uma população da mesma espécie, e o vetor utilizado para genes que codificam produtos específicos deverá ter capacidade limitada para sobreviver fora do ambiente de contenção.

Os OGMs são classificados em quatro classes de risco (capítulo 4 da RN2 da CTNBio, de 27 de dezembro de 2006).

Nível de Biossegurança 1 (NB-1) – Inclui as atividades e os projetos de pesquisa que envolvam OGM da classe de risco 1, considerados de

baixo risco individual e baixo risco para a coletividade. Os organismos envolvidos (receptor e doador do transgene) não são causadores de efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente. Não é necessário que as instalações estejam isoladas das demais dependências físicas da instituição, sendo as atividades e projetos conduzidos geralmente em bancada, biotério ou casa de vegetação. Todos os usuários deverão receber treinamento específico sobre os procedimentos de biossegurança utilizados no local de trabalho. Todo resíduo contaminado com OGM deve ser descontaminado antes de ser descartado. É necessário que tenha pias para lavagem das mãos e higienização de equipamentos, além de ser obrigatório o uso de EPIs e EPCs, visando minimizar o risco de exposição ao OGM. Materiais contaminados só podem ser retirados do laboratório em recipientes rígidos e à prova de vazamentos. Deve ser providenciado um programa rotineiro de controle de insetos e roedores.

Nível de Biossegurança 2 (NB-2) – Inclui trabalhos que envolvam agentes de risco moderado para as pessoas e para o meio ambiente. O OGM contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor com moderado risco de agravo à saúde humana e animal, e tem baixo risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente. As instalações e procedimentos exigidos para o NB-2 devem atender às especificações estabelecidas para o NB-1, acrescidos de: necessidade de haver uma autoclave disponível em seu interior, para permitir a descontaminação de todo o material antes do descarte, sem o trânsito do OGM por corredores e outros espaços não controlados; utilização de cabines de segurança biológica (Classe I ou II); o acesso ao laboratório deve ser limitado durante os procedimentos operacionais; as salas devem ser mantidas trancadas quando fora de uso; roupas contaminadas devem ser desinfestadas com técnica adequada e não devem ser guardadas junto com trajes pessoais no mesmo armário; usar luvas adequadas em todo tipo de atividade que possa resultar em contato acidental direto com sangue, tecidos, fluidos ou animais infectados. É recomendável não permitir o trabalho de pessoas portadoras de ferimentos, queimaduras,

imunodeficientes ou imunodeprimidas; há necessidade de providenciar o exame médico periódico e kits de primeiros socorros na área de apoio ao laboratório. Devem-se estabelecer normas e procedimentos com ampla divulgação para todos os trabalhadores sobre o potencial de risco associado ao trabalho, bem como sobre os requisitos específicos (por exemplo, imunização) para entrada em laboratório, e sobre o tipo de material biológico manipulado. O símbolo de "Risco Biológico" deve ser colocado na entrada do laboratório onde agentes etiológicos estiverem sendo utilizados.

Nível de Biossegurança 3 (NB-3) – Inclui os trabalhos que envolvam agentes de risco biológico da classe 3, ou seja, que acarretam elevado risco individual e baixo risco para a comunidade e podem causar doenças sérias e potencialmente letais. O pessoal do laboratório deve ter treinamento específico no manejo de agentes patogênicos, devendo ser supervisionados por cientistas com vasta experiência com esses agentes. O laboratório deverá ter instalações compatíveis para o NB-3. Além das práticas de biossegurança estabelecidas para o NB-2, o trabalho com agentes de risco 3 não permite que menores de 18 anos de idade entrem no laboratório. Todos os procedimentos que envolverem a manipulação de material infeccioso devem ser conduzidos dentro de cabines de segurança biológica ou outro dispositivo de contenção física. Os manipuladores devem usar uniforme completo específico para as áreas de trabalho com OGM, sendo proibido o uso dessas roupas fora do laboratório. As roupas devem ser descontaminadas antes de serem encaminhadas à lavanderia ou para descarte. Devem ser usadas máscaras faciais apropriadas ou respiradores nas salas onde são manipulados animais de experimentação. Os animais devem ser mantidos em sistemas de confinamento parcial. Toda a superfície de trabalho deve ser selada e sem reentrâncias, para facilitar limpeza e descontaminação. As janelas do laboratório devem ser fechadas ou lacradas e as portas de acesso ao laboratório ou ao módulo de contenção devem possuir fechamento automático. As linhas de vácuo devem estar protegidas com filtro de

ar com elevada eficiência e coletores com líquido desinfetante. Todo o pessoal deverá tomar banho ao deixar essas áreas de trabalho.

Nível de Biossegurança 4 (NB-4) – Este nível de contenção deve ser usado sempre que o trabalho envolver organismo ou OGM resultante de organismo receptor ou parental com potencial patogênico desconhecido. Além dos procedimentos e práticas citados para os outros níveis de biossegurança, requer outros específicos. Os laboratórios devem ser de contenção máxima, contendo portas hermeticamente fechadas, funcionando sob o controle direto das autoridades sanitárias. A instalação laboratorial deve estar localizada em uma edificação separada ou em uma área controlada dentro do edifício, que seja totalmente isolada de todas as outras. Devem ser usadas cabines de segurança biológica Classe III ventiladas por sistema de suporte de vida. O trabalho no laboratório deve ser sempre executado em dupla. É necessária a elaboração de um manual de trabalho pormenorizado, o qual deve ser testado previamente. Nenhum material deverá ser removido do laboratório, a menos que tenha sido autoclavado ou descontaminado em autoclave de dupla porta, câmara de fumigação ou sistema de antecâmara pressurizada, exceto os materiais biológicos que necessariamente tenham que ser retirados na forma viável ou intacta. Deve-se trocar a roupa comum por roupa protetora completa e descartável, sendo exigido um chuveiro especial para desinfecção química das pessoas que deixam o vestuário. Todos os resíduos devem ser incinerados após serem removidos do laboratório. Todos os líquidos que deixam o laboratório, incluindo a água do chuveiro, precisam ser descontaminados antes de serem definitivamente descartados. Equipamentos ou materiais que não resistam a temperaturas elevadas devem ser descontaminados utilizando-se gases ou vapor em câmara específica. Deve-se prever uma unidade de quarentena, isolamento e cuidados médicos para o pessoal suspeito de contaminação.

Recomendações e procedimentos de biossegurança 1 (NB-1)

As medidas de biossegurança devem ser adotadas por laboratórios e associadas a um plano de educação, com base nas normas nacionais e internacionais de transporte, conservação e manipulação de microrganismos patogênicos, garantindo assim a segurança e integridade vital dos funcionários. Os laboratórios da Embrapa Amazônia Oriental que possuem CQB detêm permissão para desenvolver atividades de pesquisas classificadas no nível de biossegurança 1, com menor grau de risco, sendo o nível mais básico de proteção, o qual requer o uso de EPIs, EPCs, adoção de Boas Práticas e adequação das instalações onde as seguintes práticas devem ser adotadas:

- Não há necessidade de separar o laboratório das demais dependências do edifício. As atividades devem ser realizadas em bancadas com superfície impermeável, a qual deve ser limpa e descontaminada diariamente. Requer uma pia específica para lavar as mãos antes e após o trabalho, não exigindo equipamentos especiais de contenção. A organização e as instalações devem permitir a fácil limpeza e descontaminação. As paredes devem ser lisas e o piso deve ser antiderrapante, não poroso, impermeável a líquido e resistente a produtos químicos. Toda a edificação deve ser adequada, conforme estabelecido nas normas legais.
- As portas do laboratório devem ser mantidas fechadas, preferencialmente articuladas com sistema de molas. A abertura de todas as portas deverá ser feita no sentido de dentro das salas para fora. As portas de saída de emergência devem estar identificadas, preferencialmente dotadas de sistema de barra para abertura por toque.
- O acesso ao laboratório deve ser limitado de acordo com a definição do responsável, não sendo permitida a entrada de animais e crianças, assim como comer, beber ou utilizar cosméticos no laboratório. A sinalização contendo o símbolo internacional de risco biológico e advertência de área restrita é obrigatória. É necessário identificar o nome do responsável pelo laboratório e/ou pelas áreas constantes do CQB, nome do OGM e contato da CIBio. Deve ser feito o registro de acessos diários da entrada e saída no

laboratório e dos experimentos em condução, e apresentar lista de pessoas autorizadas ao acesso ou controle de acesso eletrônico.

- Deve haver manutenção periódica de equipamentos, conforme recomendação do fabricante. Identificar equipamentos, armários e caixas de uso para ensaios, armazenamento e transporte de OGM.
- Os usuários do laboratório devem ser treinados em biossegurança e nos procedimentos laboratoriais. Pessoas com a saúde debilitada ou lesões na pele devem abster-se de trabalhar com patógenos humanos. Equipamentos de proteção coletiva devem estar disponíveis em local identificado e de fácil acesso. Dentro dos laboratórios deve estar disponível local para guarda de jalecos e outros equipamentos de proteção individual. Deve-se usar jalecos apenas no laboratório, sapatos fechados e luvas quando manusear material químico e biológico. Objetos de uso pessoal não devem ser guardados no laboratório.
- Usar micropipetas, capela de exaustão para riscos químicos, cabine de segurança biológica e dispositivo de contenção de aerossóis, quando necessário. Os locais do laboratório onde houver a manipulação de reagentes químicos perigosos deverão ser identificados. Ex: brometo de etídio. Deve haver almoxarifado e armário para armazenamento de materiais e reagentes, com controle interno.
- Todo o material com contaminação biológica deve ser introduzido em recipiente de vidro com tampa para ser autoclavado antes de ser descartado, conforme orientações de descarte. Portanto, seringas com agulhas devem ser descartadas como lixo patológico. Todos os coletores de material para descarte devem estar corretamente identificados contendo inclusive os símbolos de Biossegurança e Riscos/Periculosidade, em se tratando de descarte diferente de acordo com os grupos de resíduos.
- Qualquer acidente de trabalho deve ser imediatamente comunicado ao responsável pelo laboratório para registro e acompanhamento junto ao setor de saúde e bem-estar da Unidade, assim como à CIBio, caso haja necessidade.

Equipamentos de Proteção Individual (EPIs)

Os EPIs consistem nas barreiras primárias que protegem a integridade física e a saúde do trabalhador. Segundo lei trabalhista, é obrigação do

trabalhador usar e conservar os EPIs, podendo ser responsabilizado, caso não utilize, com multa no Ministério do Trabalho, podendo responder na área criminal ou civil e sofrer sanções trabalhistas. O EPI verdadeiro tem Certificado de Aprovação (CA). São exemplos:

- **Jalecos** – São usados para fornecer uma barreira de proteção, visando reduzir os riscos provenientes da manipulação de agentes químicos e biológicos. Protegem a roupa e a pele dos trabalhadores, e devem ser usados apenas nas áreas de trabalho, não sendo colocados no armário em que são guardados objetos pessoais. Devem sempre ser de algodão ou fibra sintética, possuindo mangas longas. Os descartáveis devem ser resistentes e impermeáveis.
- **Luvas** – São usadas para prevenir a contaminação das mãos do trabalhador de agentes químicos e biológicos, devendo ser descartadas de forma segura após o uso. O uso de luvas não substitui a necessidade da lavagem das mãos. Usar luvas apenas no ambiente de trabalho e não reutilizar luvas descartáveis.
- **Calçados de segurança** – São usados para proteção dos pés contra umidade e agentes químicos e biológicos, não sendo permitido o uso de sapatos abertos.
- **Protetores oculares e faciais** – São usados quando houver necessidade de proteger os olhos e a face contra respingos, objetos impactantes, aerossóis e fonte artificial de radiação de ultravioleta.
- **Protetores respiratórios** – São utilizados para proteger o aparelho respiratório e devem ser selecionados conforme o risco inerente à atividade a ser desenvolvida.

Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs)

São equipamentos que possibilitam a proteção coletiva do pessoal do laboratório e do meio ambiente. São exemplos:

- **Chuveiro** – Chuveiro de aproximadamente 30 cm de diâmetro, acionado por alavancas e localizado em local de fácil acesso. Em caso de emergência, deve-se ficar 15 minutos de fluxo contínuo sob a ducha.
- **Capelas de exaustão** – Câmara que funciona com o sistema de exaustor

ligado e com a janela frontal parcialmente aberta para colocar apenas os braços dentro. Mesmo durante seu funcionamento, é obrigatório o uso de EPIs. Usada para trabalhos com produtos químicos, tóxicos, voláteis, vapores agressivos, partículas ou líquidos perigosos em grande quantidade, prejudiciais para a saúde humana. Toda manipulação que possa ocasionar uma reação perigosa deve ser feita dentro de uma capela.

- **Cabines de segurança biológica** – Constituem o principal meio de contenção contra agentes biológicos. São classificadas em três tipos: Classe I, Classe II – A, B1, B2, B3, e Classe III, em que varia o tipo e o número de filtros usados, a orientação da ventilação, a vedação e o uso de sistemas de esterilização, como a luz UV.
- **Extintores** – É um equipamento que possui a finalidade de extinguir ou controlar princípios de incêndios em casos de emergência. Pode ser carregado até o local do foco do incêndio, funcionando sob pressão. São classificados da seguinte forma: à base de água, à base de CO₂ em pó, à base de pó seco, à base de espuma contra líquidos inflamáveis e à base de bromoclorodifluorometano (BCF).

Procedimentos mínimos para trabalho em áreas com CQB

Trabalhos em um laboratório, especialmente em áreas com CQB, determinam a adoção de uma série de procedimentos a fim de evitar a contaminação de equipamentos e de todos aqueles que utilizam ou frequentam o laboratório, como técnicos, pesquisadores, alunos e profissionais da limpeza. Para tal, alguns cuidados devem ser observados, tais como:

- Todos os membros da equipe técnica do laboratório, casa de vegetação e campo experimental, estagiários e terceirizados devem ser formalmente treinados e orientados para que seja exigido o cumprimento das regras de biossegurança.
- Todos os usuários do laboratório são responsáveis pela limpeza e organização do ambiente de trabalho.
- A utilização de EPIs e EPCs é obrigatória e os mesmos devem ser utilizados corretamente e sempre que necessário. EPIs não podem ser usados ou descartados fora da área de trabalho.

- É necessário o controle das atividades de pesquisa com OGMs e dos acessos às áreas com CQB.
- O descarte de OGMs, materiais e resíduos de OGM deve ser realizado conforme as normas de biossegurança estabelecidas.

Procedimentos de descarte de material biológico

A classificação dos resíduos é baseada na Resolução Conama nº 5, Resolução Conama 283, NBR-10004 e NBR-12808 da ABNT, e objetiva agrupar os resíduos segundo suas características biológicas, físicas, químicas, estado da matéria e origem, para o seu manejo seguro. No caso do descarte de material biológico, consideram-se culturas ou estoques de microrganismos infecciosos, instrumentos usados para manipulação e inoculação, vacinas, filtros, sangue, tecidos, etc. Todos os resíduos devem ser descartados segundo as normas legais e técnicas vigentes.

Todo **material biológico contaminado** que ofereça risco à saúde deverá ser autoclavado antes do descarte e nunca ser jogado na pia ou no lixo comum. Todos os utensílios que entrarem em contato direto com o material deverão passar por desinfecção posterior antes de serem lavados ou descartados. Deverão ser autoclavados a 120 °C, pressão de 1 atm por 20 minutos. Lixo contaminado deve ser embalado em sacos plásticos autoclaváveis para o lixo tipo 1, de capacidade máxima de 100 L, indicados pela NBR 9190 da ABNT.

O descarte de **resíduos perfurocortantes** (agulhas, seringas, tubos quebrados, tubos contendo material biológico, lâminas, etc.), que é a principal fonte potencial de risco, deve ser realizado em recipientes de paredes rígidas com tampa e resistentes à autoclavagem, devidamente etiquetados, ou em caixas coletoras próprias para o material infectante. A agulha não deve ser entortada ou retirada da seringa após o uso.

Resíduos biológicos oriundos de OGMs devem ser descartados de acordo com as normas específicas da CTNBio (Resolução Normativa nº 02/2006), devendo ser inativados para impedir sua disseminação. Orienta-se que os resíduos sejam autoclavados por 30 minutos, a 121 °C e 1 atm de pressão antes de serem descartados. Em caso de alteração genética de um OGM previamente liberado pela CTNBio, o descarte poderá ser similar ao ocorrido para o organismo não transgênico. No entanto, caso o OGM ainda não tenha sido liberado, o material deverá ser destruído, considerando incineração, isolamento ou serem enterrados. Podem ser moídos, autoclavados ou germinados, seguido de destruição química ou mecânica. O material utilizado na limpeza do local deverá ser autoclavado e incinerado. Todas as áreas para manipulação de OGMs devem apresentar CQB e a instituição deve ter constituída sua CIBio.

Observação: As disposições inadequadas dos resíduos gerados em laboratório poderão constituir focos de doenças infectocontagiosas e de escape de OGMs se não forem observados os procedimentos para seu tratamento.

Lembre-se: Biossegurança mais descarte correto do lixo implica na preservação da vida de outros trabalhadores e do meio ambiente.

Manuseio de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e infrações

As áreas para manipulação de OGMs devem ter CQB e a instituição deve ter constituída sua CIBio. Quaisquer atividades que envolvam OGM no Brasil devem ser comunicadas e autorizadas pela CTNBio. Na Embrapa Amazônia Oriental, todas as atividades que envolvam OGMs, incluindo alterações nas atividades anteriormente aprovadas pela CTNBio, devem ser informadas à CIBio da Unidade, visando à autorização das ações pelo órgão competente. O pesquisador responsável pela atividade deve conduzir os trabalhos de acordo com as normas de biossegurança recomendadas pela CTNBio.

O manuseio de OGMs deverá ser realizado apenas por pessoal treinado e autorizado, assegurando que as atividades deverão ser iniciadas após permissão concedida pela CTNBio; deverá ser solicitada à CIBio autorização para transferência de OGMs, dentro do território nacional, com base nas resoluções normativas da CTNBio, enviando à CIBio solicitação de autorização de importação de OGMs e seus derivados, para que seja submetida à aprovação da CTNBio; deverão ser informadas à CIBio as mudanças na equipe técnica do projeto; devem ser relatados à CIBio todos os acidentes e agravos à saúde possivelmente relacionados às atividades com OGMs; devem ser fornecidas à CIBio informações adicionais, quando solicitadas, bem como atender a possíveis auditorias da CIBio.

A Embrapa Amazônia Oriental ainda não desenvolve pesquisas com espécies vegetais geneticamente modificadas, entretanto, como a CIBio dessa instituição atua segundo a legislação vigente (Resolução Normativa Nº 02/2006), todo trabalho envolvendo a classe de risco 1 deve atender às normas de biossegurança exigidas para o NB-1, considerando a manipulação de OGMs da classe de risco 1. Nesse caso, a casa de vegetação deverá ser mantida trancada quando não houver pessoas trabalhando, sendo o acesso restrito à equipe técnica. Deve possuir telas antiofídicas, podendo ter ventilação no teto. Há necessidade de se ter estabelecido um programa obrigatório de controle de plantas invasoras, animais ou patógenos. Não há necessidade de barreiras para pólen, exceto para plantas alógamas e anemófilas. Todos os tipos de tecidos vivos só podem ser retirados da casa de vegetação com finalidade para pesquisa em instalações em regime de contenção, armazenamento ou descarte. A liberação no meio ambiente ocorrerá após autorização da CTNBio (Resolução Normativa nº 6/novembro de 2008 e Resolução Normativa nº 8/junho de 2009).

- a) **Transporte** – O transporte de OGMs é regulado por legislação vigente (Instrução Normativa CTNBio nº 4, de 19 de dezembro de 1996, da CTNBio, Lei de Biossegurança nº 11.105, Instrução Normativa CTNBio nº 17, de 17 de novembro de 1998) e depende da classificação e do

destino do OGM. É necessário que tanto a entidade remetente quanto a de destino possuam CQB. Para OGMs da classe de risco 1, o pesquisador principal deverá notificar, anteriormente à remessa do material, as CIBio de sua instituição e da instituição de destino. O pesquisador principal remetente deve assegurar que o OGM a ser transportado estará contido em embalagens firmemente fechadas ou vedadas, para prevenir o escape do mesmo. Todo o material deve estar devidamente etiquetado e contendo o símbolo de biossegurança.

- b) **Armazenamento** – O armazenamento de todo OGM deverá ser realizado em área com CQB, identificada e com acesso controlado, assegurando a contenção e mantendo a integridade e a rastreabilidade dos materiais, permitindo um controle de todo o percurso do OGM. Os OGMs armazenados devem estar devidamente identificados e organizados de forma a facilitar sua inequívoca e pronta recuperação. O acesso aos materiais é restrito ao pesquisador principal, sendo vedada a autorização de outras pessoas.

Segundo Capítulo VII da Lei de Biossegurança, os responsáveis pelos danos ao meio ambiente e a terceiros responderão por sua indenização ou reparação integral, independentemente da existência de culpa.

Considera-se infração administrativa toda ação ou omissão que viole as normas previstas nesta lei e demais disposições legais pertinentes.

As infrações administrativas serão punidas com as seguintes sanções:

I – advertência; II – multa; III – apreensão de OGM e seus derivados; IV – suspensão da venda de OGM e seus derivados; V – embargo da atividade; VI – interdição parcial ou total do estabelecimento, atividade ou empreendimento; VII – suspensão de registro, licença ou autorização; VIII – cancelamento de registro, licença ou autorização; IX – perda ou restrição de incentivo e benefício fiscal concedido pelo governo; X – perda ou suspensão da participação em linha de financiamento em estabelecimento oficial de crédito; XI – intervenção no estabelecimento; XII – proibição de realizar contratos com a administração pública, por período de até 5 anos.

As multas podem variar de R\$ 2 mil a R\$ 1,5 milhão, proporcionalmente à gravidade da infração. No caso de reincidência, a multa será aplicada em dobro.

Atualmente, dois laboratórios da Embrapa Amazônia Oriental possuem CQB (263/08), o de Genética Molecular e o de Biotecnologia, os quais devem estar adequados para desenvolver atividades de pesquisa com OGM, nível de biossegurança 1. Esses laboratórios desenvolvem pesquisas com marcadores moleculares e cultura de tecidos para dar suporte aos programas de melhoramento genético da mandioca, pimenta-do-reino, fruteiras amazônicas e bubalinocultura, e se propõem a iniciar atividades de pesquisa envolvendo a detecção de sequências gênicas de interesse, identificação de fitopatógenos em hortaliças, identificação de vetores e hospedeiros envolvidos na transmissão de doenças em rebanhos bovinos e bubalinos, e identificação de mutações genéticas e alterações metabólicas em artrópodes de interesse agropecuário responsáveis por conferir resistência a pesticidas nesses organismos. Para tal, esses laboratórios possuem metodologias definidas, conforme a descrição de alguns procedimentos operacionais padrão (POPs) anexados no final deste manual, que objetivam expressar o planejamento do trabalho repetitivo que deve ser executado para o alcance de metas padrão nesses laboratórios, visto serem métodos aprovados, revisados conforme a necessidade e assinados. Ademais, são apresentadas placas de biosseguranças que podem ser afixadas no interior dos laboratórios, visando à melhor conduta a ser tomada perante determinadas circunstâncias e situações importantes.

Literatura recomendada

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados (OGMS) e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança (PNB), revoga a Lei no 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória no 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º e 16º da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 mar. 2005. Seção 1, p. 1-5.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Brasília, DF, 2006. 36 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

CHAVES, M. J. F. **Manual de biossegurança e boas práticas laboratoriais**. [S.l.]: Instituto do Coração, 2016. Versão 2.0.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Resolução Normativa nº 1, de 20 de junho de 2006. Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões Internas de Biossegurança (CIBios) e sobre os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 jun. 2006. Seção 1, p. 7-8.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Resolução Normativa nº 2, de 27 de novembro de 2006. Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 nov. 2006. Seção 1, p. 90-93.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Instrução Normativa CTNBio nº 17, de 17 de novembro de 1998. Dispõe sobre as normas que regulamentam as atividades de importação, comercialização, transporte, armazenamento, manipulação, consumo, liberação e descarte de produtos derivados de OGM. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 dez. 1998. Seção 1, p. 47.

CUNHA, B. A. D. B. da; KOBAYASHI, A. K.; GOMES, A. de P. G.; GAMBETTA, D. de S. R.; MOLINARI, H. B. C.; FÁVARO, L. C. de L.; MARTINS, P. K. **Manual de biossegurança da Embrapa Agroenergia (CQB 345/12)**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015. 35 p. (Embrapa Agroenergia. Documentos, 19).

MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ARIAS, C. A. A.; HUNGRIA, M. **Manual de biossegurança da Embrapa Soja**: Londrina: Embrapa Soja, 2014. 52 p. (Embrapa Soja. Documentos, 354).

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança**: uma abordagem multidisciplinar. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2012. 442 p.

ANEXOS

Anexo 1. Placas sugestivas (Emergência e Segurança)

Sinalização de Emergência

É um conjunto de símbolos com formas e cores diferenciadas que indicam sinalização de aviso, interdição, obrigação, segurança e prevenção de incêndio.



**SAÍDA
DE EMERGÊNCIA**

AVISO

**LAVE AS
MÃOS**



AVISO
PROIBIDO O USO
DE CELULAR
NESTA ÁREA



SEGURANÇA
INFORME SOBRE
ACIDENTES
IMEDIATAMENTE



PERIGO
RISCO DE
CHOQUE ELÉTRICO



Símbolos de segurança



Risco Biológico



Corrosivo



Mutagênico



Nocivo ou Irritante



Inflamável



Tóxico



RISCO BIOLÓGICO

ORGANISMOS:

CLASSE DE RISCO:

RESPONSÁVEL:

CONTATO:

**PROIBIDA A ENTRADA DE PESSOAS NÃO
AUTORIZADAS**

Anexo 2. Procedimentos Operacionais Padrão (POPs)

Preparo de soluções e diluição de reagentes

	Procedimento Operacional Padrão	POP-LABIOTEC-MET-01
		<i>Página:</i> 1 de 6
Preparo de soluções e diluição de reagentes		
<i>Revisão:</i>	00	<i>Emissão:</i> SET/2017
<i>Elaborado por:</i>	Leonária Silva Souza; Ilmarina Campos de Menezes	<i>Aprovado por:</i> Simone de Miranda Rodrigues

1- Objetivo

Estabelecer critérios para o preparo de soluções e diluição de reagentes para a extração de DNA e corante no processo de eletroforese.

2- Área de aplicação

Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GQ	Gestão da Qualidade
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
POP	Procedimento Operacional Padrão

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários, bolsistas e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
<i>Revisão:</i>	00	set/17	<i>Emissão inicial do documento</i>	
<i>Distribuição:</i>	LABGEM	set/17	<i>Laboratório de Genética Molecular</i>	

POP:	POP-LBM-MET-07	2 de 6
Título:	Preparo de soluções e diluição de reagentes	

5- Insumos

- Becker.
- Provetas.
- Espátulas.
- Microtubos de 1,5 mL.
- Tubos tipo falcon de 15 mL, 50 mL.
- Caneta para marcação de microtubos.
- Estante para microtubos.
- Estante para tubos de 15 mL.
- H₂O Milli-Q.
- Água destilada autoclavada.
- Micropipetadores.
- Ponteiras para micropipetadores.
- Balão volumétrico de 10 mL.

6- Descrição

6.1- Preparo de solução tampão de eletroforese TBE (Tris borato EDTA) 5X

Para o preparo de 1.000 mL de uma solução de TBE de concentração 5X, adicionar em um becker:

Tris base (PM 121,14) = 54 g

Ácido bórico = 27,5 g

EDTA 0,5M pH 8 = 20 mL

Homogeneizar em agitador magnético até a dissolução total. Em seguida, ajustar o pH para 8,0. Aferir em proveta adicionando água ultrapura/Milli-Q até o volume final de 1.000 mL.

6.1.1- Diluição de Tampão TBE 5X para TBE 1X

A fórmula utilizada para a preparação de Tampão TBE 1X é:

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, onde:

C_1 – Concentração inicial.

V_1 – Volume da solução inicialmente.

C_2 – Concentração final (desejado).

V_2 – Volume final (desejado).

POP:	POP-LBM-MET-07	3 de 6
Título:	Preparo de soluções e diluição de reagentes	

Ex: Preparo de 1.000 mL de TBE 1X a partir de uma solução estoque 5X

$$5X \cdot V_1 = 1X \cdot 1.000 \text{ mL}$$

5X – corresponde à concentração inicial.

V_1 – corresponde ao volume inicial.

1X – corresponde à concentração desejada da solução .

1.000 – corresponde ao volume final (da solução a 1X).

Resultado:

$$V_1 = 200 \text{ mL}$$

6.2- Preparo de Tampão de Eletroforese TAE 10X

Para o preparo de 1.000 mL de uma solução de TAE de concentração 10X, adicionar em um becker:

Tris Base (PM 121,14) = 48,4 g

Ácido acético = 11,42 mL

EDTA (dissódico PM 372,24) = 7,44 g

Homogeneizar em agitador magnético até a dissolução total. Em seguida, ajustar o pH para 8,0. Aferir em proveta adicionando água ultrapura/Milli-Q até o volume final de 1.000 mL.

6.2.1- Diluição de TAE 10X para TAE 1X

A fórmula utilizada para a preparação de Tampão TAE 1X é:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2, \text{ onde:}$$

C_1 – Concentração inicial.

V_1 – Volume da solução inicialmente.

C_2 – Concentração final (desejado).

V_2 – Volume final (desejado).

Ex: Preparo de 1.000 mL de TAE 1X a partir de uma solução estoque 10X

$$10X \cdot V_1 = 1X \cdot 1.000 \text{ mL}$$

10X – corresponde à concentração inicial.

V_1 – corresponde ao volume inicial.

1X – corresponde à concentração desejada da solução.

1.000 – corresponde ao volume final (da solução a 1X).

Resultado:

$$V_1 = 100 \text{ mL}$$

POP:	POP-LBM-MET-07	4 de 6
Título:	Preparo de soluções e diluição de reagentes	

6.3- Preparo de EDTA 0,5 M – pH 8,0 (1.000 mL)

Em um becker com água autoclavada, adicionar 186,10 g de EDTA. Agitar usando um agitador magnético até a completa dissolução. Ajustar o pH para 8,0 adicionando NaOH (aproximadamente 20 g).

Obs.: O EDTA não se dissolve enquanto o pH de solução não se aproximar de 8,0.

Aferir o volume em uma proveta para 1.000 mL. Dividir o volume em quatro frascos de 500 mL e autoclavar. Armazenar a 4 °C coberto com papel-alumínio.

A Tabela 2 apresenta quantidades diferenciadas de EDTA dissódico e EDTA Free ácido usados considerando diversos volumes.

EDTA dissódico PM 372,24 – $C_{10}H_{16}N_2O_8$
 EDTA Free ácido PM 292,25 – $C_{10}H_{14}N_2O_8Na.2H_2O$

Tabela 2. Soluções mostrando diferentes quantidades de EDTA dissódico e EDTA Free ácido.

Volume	NaOH aprox.	EDTA PM 372,24	EDTA PM 292,25	Completar volume com água destilada
1.000 mL	20 g	186,10 g	146,12	para 1.000 mL
500 mL	10 g	93,05 g	73,06	para 500 mL
250 mL	5 g	46,52 g	36,53	para 250 mL

6.4- Preparo de NaCl 5 M – Cloreto de sódio

Para 500 ml de solução, em um becker, adicionar água destilada e 146,25 g de NaCl. Agitar a solução usando agitador magnético aquecido. Depois de dissolvido, transferir a solução para uma proveta e completar com água destilada até o volume de 500 mL. Em seguida, colocar a solução em frasco com tampa e autoclavar. Armazenar a -20 °C.

6.5- Tris 1 M pH = 8

Para 1.000 mL de solução, em um becker, adicionar água destilada e 121,10 g de Tris-base PM 121,14. Agitar a solução usando agitador magnético. Ajustar o pH para 8,0 com adição de ácido clorídrico (HCl) concentrado.

Em uma proveta de 1.000 mL, completar o volume da solução para 1.000 mL com água destilada. Transferir a solução para um frasco com tampa e autoclavar.

Obs.: O frasco com a solução deve ser envolvido com papel-alumínio e armazenado em geladeira.

6.6- CTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio a 20%

Para 1.000 mL de solução, em um becker, adicionar água destilada e 20 g de CTAB.

POP:	POP-LBM-MET-07	5 de 6
Título:	Preparo de soluções e diluição de reagentes	

Agitar a solução usando agitador magnético aquecido (temperatura de 60 °C a 80 °C). Após a dissolução do CTAB, ajustar o volume para 100 mL com água destilada autoclavada. Armazenar em temperatura ambiente.

6.7- Brometo de etídio 10 mg/mL

É um agente intercalante usado como marcador de ácidos nucleicos em processos de electroforese em gel de agarose, permitindo a visualização do DNA/RNA no gel sob luz ultravioleta.

Para um volume de 10 mL, em um becker específico, reservado e usado exclusivamente para a dissolução desse reagente, adicionar água destilada e 0,1 g de brometo de etídio. Com o auxílio de um agitador magnético, agitar por algumas horas até a dissolução total do corante. Aferir o volume usando uma proveta de 10 mL, exclusiva para esse reagente. Armazenar a solução do reagente em um recipiente de cor escura ou envolvido em papel-alumínio para proteção luminosa.

Obs: O brometo de etídio é um poderoso corante mutagênico e moderadamente tóxico, sendo assim, recomenda-se a utilização de luvas, óculos e máscaras, além de vidrarias e utensílios específicos para o manuseio deste.

6.8- Tampão de carregamento e corantes para eletroforese

6.8.1– Azul de bromofenol

Reagente usado em eletroforese horizontal para monitorar a migração de amostras de ácidos nucleicos em géis de agarose e poliacrilamida (Tabela 3).

Tabela 3. Solução de azul de bromofenol calculada para três volumes, indicando a quantidade de solução de TBE ou TAE usada para o preparo das mesmas.

100 mL	50 mL	10 mL
Pesar 0,42 g de azul de bromofenol	Pesar 0,21 g de azul de bromofenol	Pesar 0,042 g de azul de bromofenol
70 mL de TBE 1X (ou TAE)	35 mL de TBE 1X (ou TAE)	7 mL de TBE 1X (ou TAE)
30 mL de glicerol	15 mL de glicerol	3 mL de glicerol

Obs.: Recomenda-se a utilização de luvas, óculos e máscaras. Após o preparo do corante e armazenamento sob refrigeração a 4 °C.

6.8.2– Tampão xileno cianol

É um corante usado em eletroforese vertical (SSR) para monitorar a migração de amostras de ácidos nucléicos em géis de agarose e poliacrilamida (Tabela 4).

POP:	POP-LBM-MET-07	6 de 6
Título:	Preparo de soluções e diluição de reagentes	

Tabela 4. Solução de azul de bromofenol calculada para dois volumes.

50 mL	10 mL
0,05 g de xilenocianol	0,01 g de xilenocianol
0,05 g de azul de bromofenol	0,01 g de azul de bromofenol
1 mL de EDTA 10 mM pH = 8,0	0,2 mL (ou 200 µL) de EDTA 10 mM pH = 8,0
Completar com formamida até atingir o volume de 50 mL	Completar com formamida até atingir o volume de 10 mL

6.8.3– Tampão SDS

Solução usada na lise celular para extração de ácidos nucleicos.

Para preparar 100 mL de solução de SDS 10%, em um becker, acrescentar 10 g de SDS e 50 mL de água estéril (autoclavada). Homogeneizar em agitador magnético até a total dissolução. Aquecer a 68 °C para dissolver e ajustar pH 7,2 com HCl diluído.

Completar o volume para 100 mL em uma proveta e transferir a solução para um frasco com tampa, autoclavar e armazenar a 4 °C

Obs: **Usar máscaras para pesar o SDS (irritante de mucosa).**

7- Referências

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular Biology**. [S.l.]: J. Wiley, 2003.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Caderno de protocolo do Laboratório de Genética Molecular**. Belém, PA, 2011. Digitado.

Preparo de amostras e extração do DNA vegetal para ensaio de PCR

		Procedimento Operacional Padrão		POP-LABGEM-MET-02	
		<i>Página:</i>		1 de 5	
Preparo de amostras e extração do DNA vegetal para ensaio de PCR					
<i>Revisão:</i>	00		<i>Emissão:</i>	SET/2017	
<i>Elaborado por:</i>	Leonária Silva Souza; Simone de Miranda Rodrigues		<i>Aprovado por:</i>	Elisa Ferreira Moura	

1- Objetivo

Estabelecer critérios para o preparo de amostras e a extração de DNA vegetal para ensaios de PCR direcionado para a caracterização molecular, diversidade genética e outras aplicações.

2- Área de aplicação

Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GQ	Gestão da Qualidade
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
POP	Procedimento Operacional Padrão

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
<i>Revisão:</i>	00	Set/2017	<i>Emissão inicial do documento</i>	
<i>Distribuição:</i>	LABGEM	Set/2017	<i>Laboratório de Genética Molecular</i>	

POP:	POP-LABGEM-MET-02	2 de 5
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA vegetal para ensaio de PCR	

5- Insumos

- Tubos tipo Falcon de 15 ml.
- Caneta para marcação de microtubos.
- Estante para tubos e microtubos.
- Pistilo e gral de porcelana autoclavável.
- Nitrogênio líquido, alternativamente, gelo seco.
- H₂O Milli-Q.
- NaCl 5 M.
- Tris base 1 M, pH 8.
- EDTA 0,5 M pH 8,0.
- CTAB 20%
- Polivinilpirrolidone (PVP).
- Polivinilpolipirrolidone (PVPP).
- TE pH 8,0.
- Hipoclorito de sódio (NaClO) 0,25%.
- Micropipetas.
- Ponteiras para micropipetas.
- Provetas de 50 ml, 100 mL e 1.000 mL.
- Pirex de vidro.

6- Descrição

6.1- Preparo do tampão de extração de DNA vegetal

Para preparar 100 mL de solução extratora, adicionar:

- 48 mL de água ultrapura.
- 10 mL de CTAB a 20%.
- 28 mL de NaCl 5 M.
- 10 mL de Tris base 1 M pH8.
- 4 mL de EDTA 0,5 M pH8.
- 1g de PVP.

Obs: No tampão de extração pode ser acrescentado 2-mercaptoetanol e proteinase K.

POP:	POP-LABGEM-MET-02	3 de 5
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA vegetal para ensaio de PCR	

6.2- Coleta das folhas

As folhas devem ser coletadas pela manhã, nas primeiras horas do dia, dando preferência para as folhas mais jovens. As mesmas devem ser acondicionadas em sacos previamente identificados e conservadas em isopor com gelo em caso de transporte rápido. Para o transporte de folhas a longas distâncias, as folhas devem ser armazenadas em sacos plásticos com sílica gel de baixa granulometria.

6.3- Higienizações das folhas

Para a lavagem e higienização das folhas, usa-se dois pirex de vidro com H₂O destilada e um pirex de vidro com solução de hipoclorito de sódio. As folhas são mergulhadas no primeiro pirex contendo H₂O destilada, mergulhadas no segundo pirex contendo solução de hipoclorito de sódio 10%, e mergulhadas no terceiro pirex contendo H₂O destilada. Em seguida, são secas utilizando papel toalha e usadas para maceração. Tubos falcons de 1,5 mL são identificados com o número da amostra (ex. Amostra **01P01** – tubo 1 que irá conter a folha macerada da amostra 1).

6.3.1- Preparo de solução de Hipoclorito de sódio 0,25%

O NaClO utilizado para assepsia de material vegetal tem a concentração de 0,25%. Pode-se preparar essa concentração a partir de água sanitária que está disponível na concentração de 2,5%.

A fórmula utilizada para a preparação do NaClO 0,25% é:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Ex: Preparação de 100 mL de solução de NaClO a 0,25%

$$2,5\% \times V_1 = 0,25\% \times 100 \text{ mL}$$

2,5% – corresponde à concentração inicial do NaClO (água sanitária comercial).

V₁ – corresponde ao volume inicial.

0,25% – corresponde à concentração desejada da solução .

100 mL – corresponde ao volume final (da solução à 0,25%).

Resultado:

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

É necessário 10 mL de NaClO a 2,5% e 90 mL de água destilada para se obter uma solução de 100mL de NaClO a 0,25%. Para tanto, colocar 10 mL de álcool a 2,5% em uma proveta de 100 mL e completar o volume para 100 mL com água destilada.

6.4- Extração do DNA

6.4.1- Maceração

Em um gral, adicionar 400 g de folhas que serão maceradas utilizando pistilo e N₂ líquido. O tecido não deve descongelar. É necessário o uso de luvas látex para evitar

POP:	POP-LABGEM-MET-02	4 de 5
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA vegetal para ensaio de PCR	

queimaduras na pele e contaminação das amostras. Após as amostras de tecido vegetal estarem maceradas, acrescentar 4 mL do tampão de extração e homogeneizar. Em seguida, transferir para um tubo falcon etiquetado e agitar os tubos no vórtex por cerca de 10 segundos. Colocar os tubos na geladeira até a finalização da maceração de todas as amostras.

6.4.2- Banho-maria

Após adicionar o tampão de extração em todas as amostras, agitar os tubos rapidamente em vórtex, colocar em banho-maria à temperatura de 65 °C, durante 1 hora agitando por inversão a cada 10 minutos.

6.4.3- Adição de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1)

Após retirar as amostras do banho-maria, resfriá-las por 20 minutos antes de adicionar 2 mL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (1:1). Tampar e agitar fortemente para homogeneizar e centrifugar (14.000 RPM, 4 °C, 10 minutos). Retirar e preservar o sobrenadante em outro tubo etiquetado. Acrescentar clorofórmio e usar igual volume do sobrenadante preservado. Tampar e agitar fortemente para homogeneizar e centrifugar (14.000 RPM, 4°C, 10 minutos).

6.4.4- Obtenção do DNA

Após a etapa de centrifugação, retirar o sobrenadante, transferir para os respectivos tubos identificados previamente para cada amostra e acrescentar álcool etílico a 95% resfriado ou álcool isopropílico em volume igual ao do sobrenadante coletado.

Inverter os tubos gentilmente para obtenção do DNA e em seguida colocar a -20 °C por 60 minutos ou *overnight*. Centrifugar durante 10 minutos (4 °C e 14.000 rpm) para precipitar o DNA, sendo observada a formação de *pellet* na parede do tubo falcon. Descartar o sobrenadante. Acrescentar 1 mL de etanol 70% para iniciar o processo de ressuspensão do DNA. Centrifugar durante 10 min (4 °C e 14.000 rpm), descartar o sobrenadante e repetir a lavagem com etanol a 70%. Novamente, descartar o sobrenadante e secar o pellet à temperatura ambiente por um período aproximado de 12 horas.

A fórmula utilizada para a preparação do álcool 70% é:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Ex: Preparação de 1 L de álcool a 70%

$$92,8\% \times V_1 = 70\% \times 1.000 \text{ mL}$$

92,8 – corresponde à concentração inicial do álcool utilizado (álcool comercial).

V₁ – corresponde ao volume inicial.

70 – corresponde à concentração desejada da solução.

1.000 – corresponde ao volume final (da solução à 70%).

Resultado:

$$V_1 = 754,31 \text{ mL}$$

POP:	POP-LABGEM-MET-02	5 de 5
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA vegetal para ensaio de PCR	

É necessário 754,31 mL de álcool a 92,8% e 245,69 mL de água destilada para se obter uma solução de 1.000 mL de álcool a 70%.

Para tanto, colocar 754,31 mL de álcool a 92,8% em uma proveta de 1.000mL e completar para 1.000mL com água destilada.

6.4.5- Ressuspensão do DNA

O *pellet* de DNA deve ser ressuspensionado com 50 µL a 200 µL de solução de TE contendo RNase (10 ug/µL) de acordo com o material vegetal utilizado. Homogeneizar e incubar a 37 °C até dissolver o DNA precipitado durante o tempo necessário, agitando de 10 em 10 minutos.

6.4.6- Armazenamento do DNA

O DNA ressuspensionado deve ser visualizado em gel de agarose 2% para verificar a qualidade, e em seguida quantificado em espectrofotômetro, antes de ser armazenado em caixas para freezer a -80 °C (DNA estoque). Essas amostras de DNA concentradas podem ser estocadas por anos nessas condições.

Obs: As amostras de DNA de trabalho são preparadas diluindo uma amostra do DNA para 10 ng/µL, as quais podem ser usadas em todos os ensaios de PCR para identificação de alelos.

A fórmula utilizada para a preparação de 10 ng/µL é:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Ex: Preparação de 100 µL de DNA a 10 ng/µL

$$1.600 \text{ ng/}\mu\text{L} \times V_1 = 10 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 100 \mu\text{L}$$

1.600 – corresponde à concentração inicial da solução estoque de DNA.

V_1 – corresponde ao volume inicial.

10 – corresponde à concentração desejada da solução.

100 – corresponde ao volume final (da solução a 10 ng/µL).

Resultado:

$$V_1 = 0,625 \mu\text{L}$$

É necessário 0,625 µL da amostra de DNA estoque a 1.600 ng/µL e 99,375 µL de água Mili-Q para se obter uma amostra de DNA de trabalho de 100 µL de DNA a 10 ng/µL. Para tanto, colocar 0,625 µL do DNA estoque a 1.600 ng/µL em um eppendorf de 0,5 mL (= 500 µL), usando micropipeta de 2,0 µL e acrescentar 99,375 µL de água Mili-Q, usando micropipeta de 100 µL. Ressuspender a amostra usando pipeta de 100 µL antes de congelar a -20 °C.

7- Referências

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

Preparo de amostras e extração do DNA de mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*)

	Procedimento Operacional Padrão		POP-LABGEM-MET-03	
			Página: 1 de 4	
Preparo de amostras e extração do DNA de mosca-dos-chifres (<i>Haematobia irritans</i>)				
Revisão:	00	Emissão:	SET/2017	
Elaborado por:	Luciana Gatto Brito	Aprovado por:	Luciana Gatto Brito	

1- Objetivo

Estabelecer critérios para a extração do DNA de amostras de mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*).

2- Área de aplicação

Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GQ	Gestão da Qualidade
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
POP	Procedimento Operacional Padrão

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
Revisão:	00	set/17	Emissão inicial do documento	
Distribuição:	LABGEM	set/17	Laboratório de Genética Molecular	

POP:	POP-LABGEM-MET-03	2 de 4
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA de mosca-dos-chifres (<i>Haematobia irritans</i>)	

5- Insumos

- Placa de Petri.
- Bisturi.
- Pinça.
- Microtubos tipo eppendorf de 1,5 mL.
- Tubos tipo falcon de 15 mL.
- Caneta para marcação de microtubos.
- Estante para microtubos.
- Estante para tubos de 15 mL.
- Pistilo descartável, alternativamente palito de churrasco autoclavado.
- Gelo-seco.
- Nitrogênio líquido.
- H₂O Milli-Q.
- KCl 3 M.
- Tris-Cl, pH 8,5.
- Tris-Cl, pH 8,0.
- Tampão (*buffer*) de isolamento.
- Micropipetadores.
- Ponteiras para micropipetadores.
- Balão volumétrico de 10 mL.

6- Descrição

6.1- Preparo da solução tampão (*buffer*) de extração

Prepare a solução em um balão volumétrico de 10 mL e adicione:

- 1667 µL de KCl 3M
- 600 µL de 1 M Tris-Cl, pH 8,5
- 400 µL de 1 M Tris-Cl, pH 8,0
- 7333 µL de água Milli-Q

POP:	POP-LABGEM-MET-03	3 de 4
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA de mosca-dos-chifres (<i>Haematobia irritans</i>)	

6.2- Preparo de amostras e sexagem das moscas

Os machos são utilizados inteiros, porém as fêmeas devem ter as cabeças cortadas e o corpo descartado (utilizam-se apenas as cabeças no ensaio). Todas as moscas devem ser guardadas em tubos plásticos (sem adição de solventes ou conservantes) e armazenadas em ultrafreezer.

6.2.1- Separar as mosca-dos-chifres coletadas por sexo, machos (olhos juntos) e fêmeas (olhos separados). As moscas provenientes de bioensaios fenotípicos de avaliação da resistência aos pesticidas realizados a campo devem ser separadas em susceptível (S) ou resistente (R) ao princípio testado. São consideradas susceptíveis as moscas que não sobreviverem ao ensaio, as quais devem ser selecionadas e rapidamente congeladas em N₂ líquido em tubo criogênico devidamente identificado. As moscas sobreviventes à exposição ao pesticida em teste são consideradas resistentes, e também devem ser separadas e mortas por exposição ao frio para posterior congelamento em N₂ líquido em tubo criogênico devidamente identificado.

6.2.2- Colocar os tubos plásticos identificados que armazenam as moscas (S ou R) para resfriar com a tampa aberta por pelo menos 5 minutos no ultrafreezer antes de colocar as moscas.

6.2.3- Pré-resfriar a placa de Petri onde será feita a sexagem das moscas por 1 ou 2 minutos em N₂ líquido (ou gelo-seco). Realizar a sexagem rapidamente.

6.2.4- Rapidamente transferir os machos e as cabeças das fêmeas para os tubos identificados, visando ao armazenamento das moscas, e colocar os frascos no ultrafreezer para ficarem estocados até o momento da extração do DNA.

6.3- Extração do DNA

6.3.1- Identificar os microtubos de 1,5 mL com o número do tubo, sexo e número da mosca (ex.: 1F1 – tubo 1 contendo fêmeas provenientes do bioensaio 1) e colocar todos os tubos que armazenarão as moscas para pré-resfriamento em gelo-seco ou N₂ líquido por 1 a 2 minutos.

6.3.2- Colocar N₂ líquido em um recipiente e realizar a imersão dos pistilos que são utilizados para esmagar as moscas.

6.3.3- Colocar todos os microtubos de 1,5 mL, cada tubo deve conter apenas um único indivíduo, machos inteiros ou a cabeça das fêmeas, contendo as moscas no N₂ líquido. Rapidamente remover os tubos do N₂ líquido e esmagar as moscas com o pistilo gelado por aproximadamente 15 segundos.

6.3.4- Recolocar o microtubo com a mosca esmagada no N₂ líquido, adicionar 25 µL do *buffer* (tampão) de extração de DNA e esmagar novamente as moscas com o pistilo gelado por mais 15 segundos. Remover e descartar o pistilo. Observar se não há gotículas do *buffer* aderidas ao pistilo. Caso haja, passar o pistilo gentilmente pela parede do tubo para remover a maior quantidade possível do *buffer*.

6.3.5- Retornar as amostras para o N₂ líquido ou gelo-seco.

6.3.6- Após o preparo de todas as amostras, rapidamente centrifugar as mesmas (14.000 RPM, 4 °C, 4 minutos) e colocá-las em banho-maria (80 °C, 2 a 3 minutos). Após este período, colocar as amostras no ultrafreezer (-80 °C) para que sejam propriamente

POP:	POP-LABGEM-MET-03	4 de 4
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA de mosca-dos-chifres (<i>Haematobia irritans</i>)	

armazenadas por tempo indeterminado.

6.3.7- No momento de utilização das amostras, as mesmas devem ser centrifugadas a 14.000 RPM, 4 °C, 5 minutos.

6.3.8- Transferir 1 µL do sobrenadante para um tubo identificado contendo 9 µL de água ultrapura para PCR. As amostras de DNA diluídas na proporção 1:10 são utilizadas em todos os ensaios de PCR para a identificação do perfil genotípico das populações em relação à resistência ao pesticida avaliado.

6.3.9- Armazenar as amostras de DNA diluídas a -20 °C por no máximo 1 semana.

Obs.: Amostras não diluídas podem permanecer estocadas por tempo indeterminado quando armazenadas em ultrafreezer.

7- Referências

GUERRERO, F. D. **Horn fly multiplex PCR protocol**. Kerrville: Livestock Insects Research Laboratory, USDA, 2010.

GUERRERO, F. D.; KUNZ, S. E.; KAMMLAH, D. Screening of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) populations for pyrethroid resistance-associated sodium channel gene mutations by using a polymerase chain reaction assay. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 710-715, 1998.0

Preparo de amostras e extração do DNA de larvas do carrapato de bovinos para ensaio de PCR de mutação de alelo

	Procedimento Operacional Padrão	POP-LABGEM-MET-04
		Página: 1 de 3
Preparo de amostras e extração do DNA de larvas de carrapato de bovinos para ensaio de PCR de mutação de alelo		
Revisão:	00	Emissão: SET/2017
Elaborado por:	Luciana Gatto Brito	Aprovado por: Luciana Gatto Brito

1- Objetivo

Estabelecer critérios para a extração do DNA de amostras de larvas individualizadas do carrapato-dos-bovinos (*Rhipicephalus microplus*).

2- Área de aplicação

Este documento se aplica aos Laboratórios de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GQ	Gestão da Qualidade
LABGEM	Laboratório de Biologia Molecular
POP	Procedimento Operacional Padrão

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
Revisão:	00	Set/17	Emissão inicial do documento	
Distribuição:	LABGEM	Set/17	Laboratório de Biologia Molecular	

POP:	POP-LABGEM-MET-04	2 de 3
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA de larvas de carrapato de bovinos para ensaio de PCR de mutação de alelo	

5- Insumos

- Placa de Petri.
- Pinça.
- Microtubos tipo Eppendorf de 1,5 mL.
- Caneta para marcação de microtubos.
- Estante para microtubos.
- Pistilo descartável, alternativamente palito de churrasco autoclavado.
- Nitrogênio líquido, alternativamente gelo-seco.
- H₂O Milli-Q.
- KCl 3 M.
- Tris-Cl, pH 8,5.
- Tris-Cl, pH 8,0.
- Micropipetadores.
- Ponteiras para micropipetadores.
- Balão volumétrico de 10 mL.
- Gral.

6- Descrição

6.1- Preparo de solução tampão (*buffer*) de extração

Prepare a solução em um balão volumétrico de 10 mL e adicione:

- 1667 µL de KCl 3 M
- 600 µL de 1 M Tris-Cl, pH 8,5
- 400 µL de 1 M Tris-Cl, pH 8,0
- 7333 µL de água Milli-Q

6.2- Preparo de larvas de *Rhipicephalus microplus*

6.2.1- Identificar os tubos de 1,5 mL com o número do tubo e número da larva de *Rhipicephalus microplus* (ex. 1L1 – tubo 1 contendo larva estocada no tubo 1).

6.2.2- Colocar no gelo-seco ou N₂ líquido para resfriar.

6.2.3- Colocar N₂ líquido, ou gelo-seco, em um recipiente e pré-resfriar as placas de Petri que serão utilizadas para separar as larvas submetidas à extração de DNA.

POP:	POP-LABGEM-MET-04	3 de 3
Título:	Preparo de amostras e extração do DNA de larvas de carrapato de bovinos para ensaio de PCR de mutação de alelo	

Colocar as larvas na placa e rapidamente transferir cada larva para um microtubo também pré-resfriado. Larvas que não são avaliadas devem rapidamente retornar para uma situação de armazenamento em ultrafreezer (-80 °C).

6.3- Extração do DNA

6.3.1- Colocar N₂ líquido ou gelo-seco em um gral para realizar o pré-resfriamento dos pistilos que são utilizados para esmagar as larvas.

6.3.2- Colocar todos os tubos contendo as larvas no N₂ líquido ou gelo-seco.

6.3.3- Esmagar as larvas com o pistilo gelado por aproximadamente 15 segundos. Não retirar o tubo do gelo-seco ou do N₂ líquido (se necessário, utilizar luvas para evitar queimaduras na pele nesta etapa).

6.3.4- Remover o tubo com o pistilo de dentro do gelo-seco ou N₂ líquido, adicionar 25 µL do *buffer* (tampão) de extração de DNA e esmagar novamente a larva com o pistilo gelado por mais 15 segundos. Remover e descartar o pistilo. Observar se não há gotículas do *buffer* aderidas ao pistilo, caso haja, passar o pistilo gentilmente pela parede do tubo para remover a maior quantidade possível do *buffer*.

6.3.5- Retornar os tubos para o N₂ líquido ou gelo-seco.

6.3.6- Após o preparo de todas as amostras, rapidamente centrifugar as mesmas em microcentrífuga por 30 segundos e colocá-las em banho-maria (80 °C, por 2 a 5 minutos).

6.3.7- As amostras que correspondem à larva de carrapato imersa em tampão de extração devem ser armazenadas em ultrabaixa temperatura por tempo indeterminado.

6.3.8- No momento de utilização das amostras, as mesmas devem ser centrifugadas a 14.000 RPM, 4 °C, 5 minutos.

6.3.9- Transferir 1 µL do sobrenadante para um tubo identificado contendo 9 µL de água ultrapura para PCR. As amostras de DNA diluídas na proporção 1:10 são utilizadas em todos os ensaios de PCR para a identificação do perfil genotípico das populações em relação à resistência ao pesticida avaliado.

6.3.9- Armazenar as amostras de DNA diluídas a -20 °C por no máximo 1 semana.

Obs.: Amostras não diluídas podem permanecer estocadas por tempo indeterminado quando armazenadas em ultrafreezer.

7- Referências

GUERRERO, F. D. **Tick sodium channel mutation PCR assay**. Kerrville: Livestock Insects Research Laboratory, USDA, 2010.

JAMROZ, R. C.; GUERRERO, F. D.; PRUETT, J. H.; OEHLER, D. D.; MILLER, R. J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 5, p. 685–695, 2000.

Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega

	Procedimento Operacional Padrão		POP-LABGEM-MET-05	
			Página: 1 de 12	
Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega				
Revisão:	00	Emissão:	SET/2017	
Elaborado por:	Luciana Gatto Brito	Aprovado por:	Luciana Gatto Brito	

1- Objetivo

Estabelecer critérios para o preparo de amostras de tecidos para ensaios da PCR que necessitem da obtenção de RNA para posterior transcrição reversa utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega cat numbers Z3100, Z3101, Z3105. Este procedimento se aplica à obtenção de RNA a partir de tecidos animais e também para pool de larvas e fêmeas ingurgitadas (teleóginas) individualizadas livres de conteúdo sanguíneo secundário.

2- Área de aplicação

Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GQ	Gestão da Qualidade
LABGEM	Laboratório de Biologia Molecular
POP	Procedimento Operacional Padrão
GTG	Tiocianato de Guanidina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
ALN	Água Livre de Nucleases - <i>Nuclease-Free Water</i>
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
DEPC	Dietil pirocarbonato
BME	β -mercaptoetanol
RLA	RNA Lysis Buffer
RWA	RNA Wash Solution
DSA	DNase Stop Solution

	Cód.	Data	Descrição	Visto
Revisão:	00	set/17	Emissão inicial do documento	
Distribuição:	LABGEM	set/17	Laboratório de Genética Molecular	

POP:	POP-LABGEM-MET-05	2 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários e colaboradores.

5- Insumos

- Placa de Petri.
- Pinça.
- Microtubos tipo eppendorf de 1,5 mL.
- Caneta para marcação de microtubos.
- Estante para microtubos.
- Balança analítica ou semianalítica.
- Pistilo plástico descartável lavado com água DEPC e autoclavado.
- Gelo-seco.
- H₂O Milli-Q DEPC 1%.
- Álcool etílico 70% diluído com H₂O Milli-Q DEPC 1%.
- β Mercaptoetanol (β Me).
- Micropipetadores livres de RNase.
- Microcentrifuga refrigerada.
- Workstation.
- Racks.
- Tubos tipo falcon de 50 mL.
- Proveta 100 mL.
- Ponteiras para micropipetadores livres de RNase .
- Gral.

6- Descrição

6.1- Capacidade de processamento do kit

O kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) foi desenvolvido e otimizado para a extração de RNA total a partir de tecidos, sangue ou células de cultura com um amplo espectro de níveis de expressão de RNA. Para um tecido rico em RNA, tais como fígado de rato, 30 mg de tecido fresco podem ser processados por extração. Quando se utiliza um tecido tal como pulmão, que tem uma baixa relação de RNA em relação à massa do tecido, até 60 mg de tecido podem ser processados por extração (Tabelas 2 e 3).

Amostras de tecido ou de RNA em excesso não devem ser processadas, uma vez que poderá ocorrer o entupimento da membrana de filtração, resultando em um RNA de baixa qualidade.

POP:	POP-LABGEM-MET-05	3 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

O volume máximo do lisado que pode ser processado por cada membrana é de 175 µl. Para quantidades maiores de lisado, é necessário executar várias extrações para fornecer a quantidade desejada de RNA total. As quantidades máximas de amostra recomendada estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Quantidades recomendadas de tecidos ou células para preparo dos lisados.

Amostra	Peso Máximo do tecido/Nº de células por 175 µl de <i>buffer</i> (tampão) de lise	Peso Máximo do tecido/Nº de células por 1 mL de <i>buffer</i> (tampão) de lise
Fígado	30 mg	171 mg
Rim	20 mg	114 mg
Músculo	30 mg	85 mg
Baço	15 mg	342 mg
Coração	60 mg	342 mg
Cérebro	60 mg	342 mg
Pulmão	60 mg	342 mg
Cultura Celular	1×10^5 - 5×10^6	$5,7 \times 10^8$ - $2,8 \times 10^7$

Tabela 3. Quantidades médias de RNA total isolado a partir de tecidos e células.

Amostra	Peso Máximo do tecido/ Nº de células por 175 µl de <i>buffer</i> (tampão) de lise	Média de obtenção (ug)	Média de obtenção/ mg de tecido (ug)	Média A260/ A230	Média A260/ A280
Pâncreas	30 mg	100	3,5	2,2	1,9
Coração	60 mg	16	0,27	1,8	2,1
Pulmão	60 mg	36	0,6	2,0	2,1
Bactéria	$\sim 1 \times 10^9$	36	NA	1,6	2,0
Fungo	$\sim 4 \times 10^7$	19	NA	1,7	2,1
Planta	30 mg	4,6	0,15	1,4	2,0
Cultura Celular	1×10^5 - 5×10^6	51	NA	2,0	2,1

Os valores mostrados na Tabela 3 representam médias de resultados obtidos em ensaios realizados pela Promega. O rendimento é dependente do tipo de tecidos, da cultura e do estado metabólico da amostra. As médias apresentadas para as amostras listadas são resultado de pelo menos seis determinações.

6.2- Aplicações subsequentes

O RNA purificado com o kit *SV Total RNA Isolation System* é adequado para muitas aplicações em biologia molecular, incluindo RT-PCR, *microarrays* e *Northern blot hybridizations*. Para mais informações sobre aplicações posteriores, consulte os guias

POP:	POP-LABGEM-MET-05	4 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

Promega Protocols and Applications (ver referência) e *Promega RNA Applications* (ver referência) obtidos no site da Promega.

⊙ Para garantir a qualidade de todas as análises posteriores à extração de RNA, é importante continuar a proteger as amostras da ação de RNases usando luvas, assim como, utilizando soluções e tubos de centrifuga livre de RNase.

6.3- Isolamento e purificação de RNA

Para obter os melhores resultados a partir deste kit, utilizar amostras frescas para a extração de RNA. Quanto mais antiga é a amostra, menor será o rendimento na obtenção do RNA total. Se necessário, congelar as amostras em nitrogênio líquido imediatamente após serem colhidas e armazená-las a -70 °C para uso futuro.

Amostras homogêneas no tampão *RNA Lysis Buffer* (RLA) podem ser armazenadas a -20 °C ou -70 °C. Para amostras raras de tecidos, sugere-se que uma porção de cada amostra seja reservada e mantida a -70 °C, para substituir amostras caso ocorram perdas durante o processo de extração e purificação do RNA. Devido à toxicidade dos produtos químicos utilizados no processo de obtenção de RNA e à abundância de RNases, usar luvas durante todos os procedimentos de lise e purificação.

6.3.1- Preparo de Soluções

Antes de iniciar o protocolo de isolamento com o kit *SV Total RNA Isolation System*, quatro soluções devem estar preparadas, como descrito a seguir.

Nota: Ao longo deste documento, *RNA Lysis Solution* (RLA), *RNA Wash Solution* (RWA) e *DNase Stop Solution* (DSA) referem-se às soluções fornecidas com o sistema de isolamento de SV RNA total. Uma vez preparadas como descrito abaixo, essas soluções são referidas como: *RNA Lysis Buffer*, *RNA Wash Solution* e *DNase Stop Solution*.

1. *DNase I Solution*

Solução	Etapas de Preparação	Notas
<i>DNase I</i>	Adicionar água livre de nucleases (fornecida com o kit) na quantidade indicada em cada frasco de <i>DNase I</i> liofilizada.	Delicadamente misturar agitando o frasco de solução. Não vortexar a solução. Recomenda-se dividir a <i>DNase</i> hidratada em alíquotas de trabalho (por exemplo, em 5-10 alíquotas de mesmo volume) utilizando-se microtubos estéreis e RNase-free. Um total de 5 µl de <i>DNase I</i> reidratada é necessário por purificação de RNA. Estocar as alíquotas de <i>DNase I</i> reidratada a -20 °C.

POP:	POP-LABGEM-MET-05	5 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

- ✓ **Nunca vortexar a solução de *DNase I***
- ✓ **Não congelar e descongelar as aliquotas de *DNase I* rehidratadas mais do que três vezes.**

2. RNA Lysis Buffer (RLA)

Solução	Etapas de Preparação	Notas
RNA Lysis Buffer (Cat.# Z3100)	Adicionar 1 mL de β -mercaptoetanol (BME) para 50 mL da solução <i>RNA Lysis Buffer</i> (RLA).	Após adicionar o β -mercaptoetanol (BME) marcar o frasco para indicar que esse passo de adição foi realizado. Armazenar o <i>RNA Lysis Buffer</i> (RLA) a 4 °C. Manter o frasco bem fechado entre os usos.

3. RNA Wash Solution (RWA)

Solução	Etapas de Preparação	Notas
RNA Wash Solution (Cat.# Z3100)	Adicionar 100 mL de etanol 95% no frasco contendo 58,8 mL da solução concentrada <i>RNA Wash Solution</i> (RWA).	Após adicionar o etanol, marcar o frasco para indicar que esse passo de adição foi realizado. A solução RWA é estável a 22-25 °C, quando mantido bem fechado o frasco.

4. DNase Stop Solution (DSA)

Solução	Etapas de Preparação	Notas
DNase Stop Solution (Cat.# Z3100)	Adicionar 8 mL de etanol 95% no frasco contendo 5,3 mL da solução concentrada <i>DNase Stop Solution</i> (DSA).	Após adicionar o etanol marcar o frasco para indicar que esse passo de adição foi realizado. A solução <i>DNase Stop</i> é estável a 22-25 °C, quando mantido bem fechado o frasco.

POP:	POP-LABGEM-MET-05	6 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

6.3.2- Preparo dos lisados a partir de amostras de tecido (≤ 30 mg)

Este protocolo é para o processamento de pequenas amostras de tecido. Em geral, a massa de tecido a ser lisado e homogeneizado em **175 μ l de RNA Lysis Buffer** deve ser **≤ 30 mg**. Pesos podem ser ajustados de acordo com os tecidos (ver Tabela 2 para as recomendações de peso de entrada para os diferentes tipos de tecido).

1. Transferir 175 μ l de *RNA Lysis Buffer* (adicionado com BME) para um microtubo estéril, no qual será acondicionada a amostra de tecido a ser lisada. Usar pipetas RNase-free e luvas para reduzir as chances de contaminação por RNase.

2. Pesar o tubo contendo o *RNA Lysis Buffer* e registrar seu peso.

3. Rapidamente cortar o tecido em pedaços pequenos utilizando uma lâmina ou pistilo estéril, congelar em nitrogênio líquido e moer em gral com pistilo mergulhado em nitrogênio líquido. Transferir o nitrogênio líquido e o tecido macerado para um tubo estéril de tamanho adequado e que permita que o nitrogênio líquido evapore. Imediatamente transferir o tecido macerado para o tubo contendo 175 μ l de *RNA Lysis Buffer*. Homogeneizar por inversão.

4. Pesar o tubo contendo o tecido + o *RNA Lysis Buffer*. Calcular a massa de tecido, subtraindo o peso obtido no Passo 2 deste novo peso. Em geral, a razão entre a massa de tecido e o *RNA Lysis Buffer* deve ser de aproximadamente 30 mg/175 μ l mas podem ser ajustados de acordo com o tecido (ver Tabela 2 para as recomendações das razões massa de tecido: *RNA Lysis Buffer* de acordo com a natureza da amostra). Se necessário, adicionar *RNA Lysis Buffer* sobre a amostra até que se alcance a razão.

Nota: Algumas amostras lisadas contêm uma grande quantidade de ácido nucleico, restos celulares e proteínas, os quais fazem com que o lisado torne-se muito espesso. Se depois da adição do *RNA Lysis Buffer* a amostra estiver demasiadamente viscosa para ser pipetada facilmente, diluir a amostra com *RNA Lysis Buffer* adicional **antes** de adicionar o *RNA Dilution Buffer* do Passo 5. Adicionar a quantidade mínima de *RNA Lysis Buffer* necessária para facilitar a pipetagem do lisado. O volume máximo de lisado que pode ser processado por cada membrana de filtração é de 175 μ l. Para grandes volumes, utilizar membranas de filtração adicionais. Para tecidos com baixos níveis de RNA, lisados mais concentrados podem ser utilizados, desde que o lisado possa ser pipetado.

5. Adicionar 350 μ l de *RNA Dilution Buffer* (azul) a 175 μ l do lisado. Misturar invertendo 3-4 vezes. Colocar em banho-maria ou bloco de aquecimento a 70 °C durante 3 minutos. Períodos de incubação mais longos do que 3 minutos podem comprometer a integridade do RNA.

6. Centrifugar durante 10 minutos a 12.000-14.000 x g.

6.3.3- Purificação de RNA por centrifugação (*spin*)

Usar luvas e abrir o pacote com cuidado. Remover uma coluna *spin* (coluna de centrifugação) e um tubo de coleta para cada amostra a ser processada. Não é necessário tampar as colunas de centrifugação, simplesmente remover as tampas dos microtubos realizando um movimento de torção; as tampas são projetadas para se

POP:	POP-LABGEM-MET-05	7 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

separarem das colunas de centrifugação. Se as tampas forem utilizadas no momento da centrifugação das colunas, **elas devem ser fechadas** durante os passos de centrifugação. Rotular os tubo de coleta e alocar o conjunto tubo de coleta + coluna de centrifugação em um rack apropriado para microtubos. Por isso, é importante marcar os tubos de amostras para manter a identidade das mesmas durante todo o processo. Usar luvas ao manusear os tubos.

1. Transferir a solução sobrenadante clarificada do lisado para um novo microtubo por pipetagem. Evitar tocar nos restos alocados no fundo do tubo.

⊗ A transferência de uma pequena quantidade de detritos peletizados não é prejudicial para a purificação de RNA. Algumas vezes, os detritos irão formar uma camada sólida no topo do sobrenadante. Basta empurrar esta camada para o lado do tubo com o auxílio da ponteira antes de pipetar o sobrenadante. O volume de sobrenadante deve ser de aproximadamente 500 µl, mas dependerá da quantidade de massa de tecido lisado.

2. Adicionar 200 µl de etanol 95% ao sobrenadante clarificado, e misturar pipetando 3-4 vezes. Transferir esta mistura para a coluna de filtração (*Spin Column Assembly*). Centrifugar a 12.000-14.000 x g durante 1 minuto.

3. Retirar a cesta de centrifugação (*Spin Basket*) do tubo coletor e descartar o líquido contido no tubo de coleta. Colocar a coluna de filtração de volta no tubo de coleta. Verificar se a *RNA Wash Solution* foi diluída com etanol como descrito no **item 6.3.1** Adicionar 600 µl de *RNA Wash Solution* à coluna de filtração (*Spin Column Assembly*). Centrifugar a 12.000-14.000 x g durante 1 minuto.

4. Esvaziar o tubo de coleta (*Collection Tube*) como realizado anteriormente e colocá-lo em um rack. **Para cada isolamento a ser realizado, preparar o mix de incubação com DNase que contém: Yellow Core Buffer - 40 µl; 0,09 M de MgCl₂ - 5 µl; DNase I enzyme – 5 µl.** Por exemplo, e nesta ordem: utilizar um tubo estéril e pipetar com cuidado para preparar somente a quantidade de mix de incubação de DNase I a ser utilizado de acordo com o número de amostras a serem extraídas. **Misturar por pipetagem suave (nunca utilizar vórtex).** Manter a DNase I em gelo para um lento descongelamento. Aplicar 50 µl do mix de incubação de DNase I, imediatamente após o preparado, na cesta de centrifugação (*Spin Basket*) alocada em um tubo de coleta. Certificar-se de que a solução está totalmente em contato com a membrana. A solução de incubação é amarela para tornar mais fácil sua visualização.

⊗ **Atenção:** Nunca misturar as soluções *Yellow Core Buffer* e 0,09 M MgCl₂ antes do Passo 4. Tanto o *Yellow Core Buffer* quanto a solução 0,09 MgCl₂ devem ser armazenadas separadamente e misturados somente no momento da realização de cada bateria de extração de RNA.

5. Incubar durante 15 minutos a 20-25 °C. Após esta incubação, adicionar 200 µl de *DNase Stop Solution* (de acordo com as instruções de preparo do **item 6.3.1**; verificar se foi adicionado o etanol) na cesta de centrifugação (*Spin Basket*) e centrifugar a 12.000-14.000 x g durante 1 minuto. Não há necessidade de esvaziar o tubo de coleta antes do próximo passo.

6. Adicionar 600 µl de *RNA Wash Solution* (com etanol adicionado) e centrifugar a 12.000-14.000 x g durante 1 minuto.

POP:	POP-LABGEM-MET-05	8 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

7. Esvaziar o tubo de coleta, e adicionar 250 µl de *RNA Wash Solution* (com etanol adicionado). Centrifugar em alta velocidade durante 2 minutos.

8. Se você ainda não tiver feito isso, retirar a tampa da *Spin Basket* fazendo um movimento de torção.

9. Para cada amostra, utilizar um microtubo de 1,5 ml com tampa para a eluição. Transferir a *Spin Basket* do tubo de coleta para o tubo de eluição e adicionar 100 µl de H₂O Nuclease-Free à membrana. Certificar-se de cobrir completamente a superfície da membrana com a água. Colocar a *Spin Basket Assemblies* na centrífuga com as tampas dos tubos de eluição voltadas para fora. Centrifugar a 12.000-14.000 x g durante 1 minuto. Retirar a *Spin Basket* e descartar. Tampar o tubo de eluição contendo o RNA purificado e armazenar a -70 °C.

Nota: Volumes de eluição menores que 100 µL não são recomendados. Se o RNA precisar ser concentrado, a amostra pode ser seca sob vácuo e ressuspensa em um volume menor de água. Se há a necessidade de uma máxima recuperação de RNA, uma segunda eluição deverá ser feita utilizando-se um segundo tubo estéril onde será adicionado novamente 100 µl de H₂O Nuclease-Free, procedendo-se nova centrifugação a 12.000-14.000 x g durante 1 minuto. Dependendo da quantidade de tecido de entrada e dos níveis de expressão de RNA, essa segunda eluição pode obter uma quantidade adicional de 10-20% de RNA.

7- Determinação do rendimento e da qualidade de RNA

7.1- Rendimento e pureza

O SV Total RNA Isolation System pode ser usado para obtenção de RNA intacto a partir de uma variedade de tecidos e fontes celulares. O rendimento de RNA total obtido pode ser determinado por espectrofotometro a 260 nm, no qual uma unidade de absorvância (A260) é igual a 40 µg de RNA fita simples/mL. A pureza também pode ser estimada por espectrofotometria a partir das absorvâncias relativas a 230 nm, 260 nm e 280 nm (isto é, A260/A280 e A260/A230).

O RNA isolado com SV Total RNA Isolation System é substancialmente livre de DNA e proteínas contaminantes e pode ser utilizado diretamente para uma série de técnicas. O RNA puro irá exibir uma razão A260/A280 de 2,0. No entanto, deve-se notar que, devido às variações entre as diferentes fontes de extração e na forma e velocidade em que o protocolo é realizado, espera-se a obtenção de RNA com intervalos de relações A260/A280 entre 1,7 e 2,1. Se o RNA apresenta uma razão inferior a 1,7, consulte o **item 8** para identificar as possíveis causas e obter sugestões para melhorar a pureza do RNA. A Tabela 3 apresenta os rendimentos representativos e proporções A260/A280 de RNA total isolado a partir de um número de diferentes fontes celulares e tecidos utilizando o *SV Total RNA Isolation System*. Utilizando-se o protocolo proposto, o RNA normalmente exibirá uma razão A260/A230 de 1,8 a 2,2. A baixa relação A260/A230 pode indicar contaminação por guanidina que poderá prejudicar os processos posteriores que necessitem de RNA total de boa qualidade para sua execução.

Se quantidades suficientes de RNA foram obtidas, pode-se determinar a integridade do RNA purificado por electroforese em gel desnaturante de agarose. Vários métodos

POP:	POP-LABGEM-MET-05	9 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

são adequados para este propósito utilizando formaldeído ou glioal como o agente de desnaturação. A proporção de RNAs ribossomais eucarióticos 28S e 18S deve ser aproximadamente de 2:1 por coloração com brometo de etídio, indicando que não houve degradação do RNA bruto. Em amostras de RNA degradadas, a relação 28S:18S estará invertida, uma vez que a degradação do RNA ribossomal 28S apresenta a característica de quando degradado, assumindo uma conformação 18S-like.

8- Solução de problemas

8.1- Espectrométricos

Problemas	Possíveis causas e comentários
Baixa relação A260/A280	Baixas relações A260/A280 ocorrem tipicamente devido à contaminação por proteína. Vários métodos podem ser utilizados para a remoção de contaminantes de proteína em soluções de RNA. O método mais simples é executar uma extração com fenol:clorofórmio. A extração orgânica costuma produzir uma maior relação A260/A280. No entanto, é muito provável que tenhamos uma perda de RNA total de até 40% quando comparado com a extração com o kit.
Baixa relação A260/A230	Baixas relações A260/A230 são tipicamente devidas à contaminação por tiocianato de guanidina. Ao RNA precipitado deve ser adicionado NaCl para uma concentração final de 0,1 M. Adicionar 2,5 volumes de etanol. Incubar durante 30 minutos a -20 °C. Recolhe-se o RNA por centrifugação a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Ressuspender o RNA em H ₂ O Nuclease-Free.
	Os tecidos ou células lisadas que foram congeladas (-20 °C ou -70 °C) podem ter sua quantidade de RNA total diminuída. Para um desempenho ideal, purificar o RNA assim que o lisado é preparado.
	A qualidade da amostra pode comprometer a extração de RNA. Amostras que não foram homogeneizadas ou congeladas imediatamente após a extração podem ter a quantidade de RNA total diminuídas, assim como a integridade também estará reduzida. Congelar tecidos imediatamente em nitrogênio líquido ou armazenar a -70 °C, caso as amostras não possam ser processadas imediatamente. Amostras homogeneizadas devem ser armazenadas a -20 °C ou -70 °C.
	A capacidade de ligação da membrana na coluna de extração foi excedida. Se o lisado contém uma maior quantidade de RNA que a capacidade da coluna, o excesso de RNA será retirado durante os passos de lavagem. Quando a recuperação máxima é de essencial importância, dividir a amostra e executar múltiplas purificações. Reunir as soluções de RNA resultantes e determinar o rendimento total obtido.

POP:	POP-LABGEM-MET-05	10 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

Baixo rendimento de RNA (baixa A260)	O homogeneizado diluído pode não ter sido aquecido a 70 °C tal como descrito no passo 5 do item 6.3.2. A solução contendo o RNA deve ser aquecida a 70 °C por 3 minutos para a recuperação ideal do RNA total. As falhas na etapa de aquecimento da solução irão resultar em um baixo rendimento de extração.
	O protocolo pode não ter sido realizado corretamente, ou podem ter sido utilizados os reagentes incorretos. O <i>SV Total RNA Isolation System</i> é um kit de múltiplos passos e que exige que reagentes corretos sejam utilizados em uma correta ordem. Isto assegura que o RNA permanecerá ligado à membrana durante o processo de purificação. Tampões e soluções do kit <i>Wizard® Plus SV DNA Purification System</i> não são compatíveis com este sistema e não devem ser usados.
	O etanol pode não ter sido adicionado à <i>Dnase Stop Solution</i> ou ao <i>RNA Wash Solution</i> . Prepare as soluções conforme as instruções do item 6.3.1 antes de iniciar os procedimentos.
	Deixou-se aquecer as amostras durante a homogeneização. Deve-se trabalhar o mais rapidamente. Todas as amostras devem ser mantidas em gelo durante todas as etapas de processamento. Use a solução RNA Lysis Buffer gelada para a homogeneização, pois assim melhorará o rendimento e estabilidade, uma vez que o aquecimento da amostra sempre é um problema. Verifique se a área do homogeneizador está devidamente coberta com lisado durante a homogeneização.

8.2- Formação de espuma no lisado

Alguns homogeneizadores geram espuma quando os tecidos são homogeneizados. Deixar a espuma se instalar antes da pipetagem. Somente homogeneizar até que os fragmentos de tecido visíveis sejam eliminados.

8.3- Baixa reprodutibilidade entre amostras

* Ocorreu decantação do lisado. A decantação do lisado limpo pode produzir quantidades variáveis de recuperação e pouca reprodutibilidade. O desempenho ideal com boa reprodutibilidade é alcançado pipetando-se a quantidade total do lisado limpo.

* O homogeneizado diluído pode não ter sido aquecido a 70 °C. A mistura deve ser aquecida a 70 °C por 3 minutos para uma recuperação ótima do RNA total. Erros relacionados ao aquecimento da mistura resultarão em rendimentos diminuídos.

8.4- Entupimento das colunas de centrifugação

* O lisado está muito concentrado. Se o lisado homogeneizado for difícil de pipetar com facilidade, o lisado celular está muito concentrado e o tampão de diluição de RNA não irá efetivamente limpar o lisado. A concentração de RNA variará entre os tecidos dependendo de sua função. Se o lisado for muito viscoso, simplesmente diluir com o

POP:	POP-LABGEM-MET-05	11 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

tampão de lise de RNA antes de adicionar tampão de diluição de RNA. **Usar apenas 175 µl de lisado por preparação.**

* *Pellet* foi desestruturado após a limpeza do lisado. Pipetar com cuidado o lisado limpo depois do passo de centrifugação. Evitar manipular o pellet que contém as proteínas precipitadas e os detritos celulares.

8.5- Rastro de DNA genômico observado ao realizar PCR

* A reação pode conter uma quantidade muito grande de *template*. Reduzir a entrada total de RNA para 50-100 ng na PCR de controle. Geralmente, o produto do RNA específico será visualizado a partir de um *template* de 50 ng de RNA total para uma RT-PCR.

* A amostra pode conter muito DNA genômico. Deve-se reduzir a quantidade inicial de tecido para a obtenção do homogeneizado. Na maioria das extrações de RNA a contaminação por DNA genômico não será um problema se a quantidade inicial do material de extração for de 30 mg ou menos por preparação. Para amostras de tecido renal, não exceder 20 mg de amostra por preparação, e para amostras de baço, não exceder 15 mg de tecido por preparação. Para células cultivadas, não exceder 5×10^6 células por preparação.

* Quando se utilizam as quantidades de tecido recomendadas para o uso no sistema, a maioria das amostras de RNA purificadas não apresentarão contaminação por DNA genômico em RT-PCR. Contudo, os tecidos ou culturas densas podem conter também muito DNA para ser eliminado. Se a contaminação por DNA é um problema em uma amostra, recomendamos a utilização de um tratamento com DNase a partir do RNA (Cat. # M6101) seguido de extração de fenol:clorofórmio.

8.6- Contaminação de DNA genômico

* A enzima DNase I pode estar inativa. Ressuspender e armazenar a DNase liofilizada de acordo com as instruções do kit. Não congelar-descongelar a DNase mais de três vezes depois da enzima ter sido reidratada.

* $MgCl_2$ ou DNase I não foi adicionado ao tampão *Yellow Core*. Para cada isolamento a ser realizado, preparar a incubação DNase adicionando 40 µl de tampão de *Yellow Core*, 5 µl de $MnCl_2$ 0,09 M e 5 µl de enzima DNase I em um tubo estéril imediatamente antes da utilização. Preparar uma solução de incubação DNase nova para cada conjunto de isolamentos de RNA. Nunca vortexar esta solução.

* A solução DNase I não está em pleno contato com a membrana durante a digestão. Inspeccionar visualmente para garantir que a solução DNase I cobre completamente as membranas durante a digestão do DNA. A solução é amarela para facilitar sua visualização.

* O passo da DNase foi omitido ou não realizado corretamente. O passo da DNase deve ser realizado para eliminar a possibilidade do DNA contaminar o sistema.

8.7- Lisado muito viscoso que não possibilita uma fácil pipetagem

* O lisado inicial é muito viscoso. Diluir o lisado com RNA Lysis Buffer.

POP:	POP-LABGEM-MET-05	12 de 12
Título:	Extração de RNA utilizando o kit SV total RNA Isolation System – Promega	

* O lisado torna-se muito viscoso enquanto está acondicionado no gelo. Brevemente, re-homogenizar a amostra para "picar" o DNA genômico. A re-homogenização de lisados pode resultar em menores rendimentos de RNA; portanto, apenas re-homogenizar quando necessário.

8.8- A coluna de centrifugação não filtra quando se utiliza o vácuo

A pressão de vácuo é insuficiente. Uma pressão de vácuo >15 polegadas de mercúrio é necessária para usar o protocolo de vácuo. Se a coluna de centrifugação não for efetivamente limpa usando o protocolo de vácuo, mudar para o protocolo de centrifugação e prosseguir a extração.

8.9- Degradação de RNA

A enzima RNase foi introduzida durante o manuseio. Usar vidrarias, soluções e plásticos descartáveis tratados com DEPC para manipulação e armazenamento do RNA. Use luvas o tempo todo. A utilização da enzima RNase após a eluição irá degradar o RNA.

9- Referências

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Greene Publishing Associates: J. Wiley, 1993.

CHIRGWIN, J. M.; PRZYBYLA, A. E.; MACDONALD, R. J.; RUTTER, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry**, v. 18, n. 24, p. 5294–5299, 1979.

EXPRESSION Analysis In: PROTOCOLS and Applications Guide. Madison: Promega Corporation, 2005.

LEHRACH, H.; DIAMOND, D.; WOZNEY, J. M.; BOEDTKER, H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical re-examination. **Biochemistry**, v. 16, n. 21, p. 4743–4751, 1977.

MCMASTER, G. K.; CARMICHAEL, G. G. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 4835–4838, 1977.

REAL GENOMICS. **Total RNA Extraction Kit**: Protocol Book. Disponível em: <http://www.lifebiomedical.com/uploads/2/4/7/2/24727678/rna_extraction_kityrb_yrbm_yr_t_yrp_yrpm_protocol_v2013.pdf>. Acesso em: 08 out. 2017.

Purificação de produto de PCR – Invitrogen_Life Technologies

		Procedimento Operacional Padrão		POP-LABGEM-MET-06	
				<i>Página:</i> 1 de 4	
Purificação de produto de PCR - Invitrogen_Life Technologies					
<i>Revisão:</i> 00		<i>Emissão:</i> SET/2017			
<i>Elaborado por:</i> Luciana Gatto Brito		<i>Aprovado por:</i> Luciana Gatto Brito			

1- Objetivo

Estabelecer critérios para a purificação de produtos de amplificação de ácidos nucleicos para posterior sequenciamento usando o kit PureLink PCR purification Kit Invitrogen_Life Technologies - Cat No K310001. Os procedimentos de purificação são indicados para purificar até 40 µg de DNA fita dupla.

2- Área de aplicação

Este documento se aplica ao Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GQ	Gestão da Qualidade
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
POP	Procedimento Operacional Padrão

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
<i>Revisão:</i>	00	Set/17	<i>Emissão inicial do documento</i>	
<i>Distribuição:</i>	LABGEM	Set/17	<i>Laboratório de Genética Molecular</i>	

POP:	POP-LABGEM-MET-06	2 de 4
Título:	Purificação de produto de PCR - Invitrogen_Life Technologies	

5- Insumos

- Microtubos para PCR de 200 µL.
- Caneta para marcação de microtubos.
- Estante para microtubos.
- Isopropanol 100%.
- Etanol 96-100%.
- H₂O Milli-Q.
- Micropipetadores livres de RNase.
- Microcentrífuga refrigerada ≥ 10.000 g.
- Workstation.
- Racks.
- Ponteiras para micropipetadores livres de RNase.
- Tampão de Ligação HC (B2* ou B3**).
- Tampão de lavagem (W1).
- Tampão de eluição (E1).
- Colunas spin do kit.
- Tubo coletor do kit.
- Tubos de eluição do kit.

*Tampão de ligação HC B2 para purificação de fragmentos de PCR entre 100 pb e 12 kb.

** Tampão de ligação HC B3 para remover *primers*, dímeros ou produtos de amplificação inespecíficos de PCR menores que 300 pb. Este tampão reduz a recuperação de fragmentos entre 300 pb a 600 pb e facilita que fragmentos menores que 300 pb se liguem às colunas do kit.

6- Procedimentos

6.1- Antes da purificação

- a) Manter o volume de PCR entre µL 50 e 100 µL.
- b) Manter uma alíquota (10 µL) antes da purificação para verificação do amplicon no gel de agarose.
- c) Pipetar o tampão de eluição (E1) no centro da coluna e incube por 1 minuto.
- d) Acrescentar 10 mL de Isopropanol 100% ao tampão de ligação (B2) e 64 mL de Etanol 96-100% ao tampão de lavagem (W1).
- e) Após a adição do isopropanol e do etanol aos tampões, estocar em temperatura

POP:	POP-LABGEM-MET-06	3 de 4
Título:	Purificação de produto de PCR - Invitrogen_Life Technologies	

ambiente.

6.2- Ligação do DNA

- a) Acrescentar 4 volumes do tampão de ligação (B2) a 1 volume do produto de PCR (50 µL a 100 µL). Misturar bem.
- b) Utilizar a coluna hidratada (incubada no passo 6.1.c) acoplada a um novo tubo coletor do kit.
- c) Acrescentar a mostra com o tampão de ligação (6.2.a) na coluna.
- d) Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 10.000 g por 1 minuto.
- e) Descartar o filtrado e colocar a coluna spin dentro do tubo coletor.

6.3- Lavagem do DNA

- a) Acrescentar 650 µL do tampão de lavagem (W1) na coluna.
- b) Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 10.000 g por 1 minuto.
- c) Descartar o filtrado do tubo coletor e colocar a coluna dentro do tubo novamente.
- d) Centrifugar em temperatura ambiente a coluna a uma velocidade máxima por 2 a 3 minutos para remover qualquer resíduo do tampão de lavagem.
- e) Descartar o tubo coletor.
- f) Preservar a coluna spin para o próximo procedimento.

6.4- Eluição do DNA

- a) Colocar a coluna spin (passo 6.3.f) em um novo tubo de 1,7 mL fornecido pelo kit.
- b) Preparar a coluna spin acrescentando 50 µL de tampão de eluição ou H₂O Milli-Q no centro da coluna.
- c) Incubar a coluna à temperatura ambiente por 1 minuto.
- d) Centrifugar a coluna à velocidade máxima por 2 minutos.
- e) Para a eluição do produto de PCR purificado, deve-se remover e descartar a coluna. O volume de eluição recuperado é de aproximadamente 48 µL.
- f) Estocar o produto de PCR purificada a -20 °C para posterior utilização.

6.5- Avaliação do rendimento

- a) Para estimar o rendimento da purificação, realizar uma eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação purificado e da alíquota do produto não purificado (passo 6.1 b).
- b) Comparar a intensidade da banda do produto de PCR purificado com os fragmentos do marcador padrão de DNA (Figura 1 e 2).

POP:	POP-LABGEM-MET-06	4 de 4
Título:	Purificação de produto de PCR - Invitrogen_Life Technologies	

Exemplo da quantidade de DNA recuperado e da remoção dos *primers*

Tampão de ligação B2

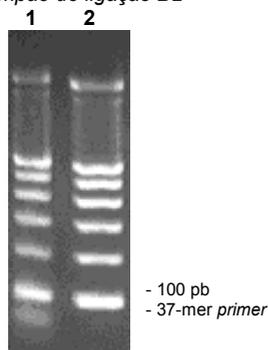


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos de amplificação purificados utilizando-se o tampão de ligação B2. Linha 1 – produto de amplificação; linha 2 – marcador de peso molecular de 100 pares de base.

Tampão de ligação B3

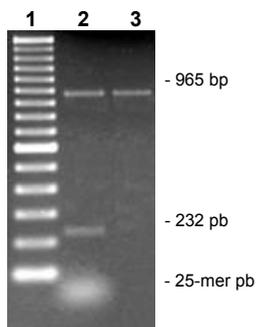


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos de amplificação purificados utilizando-se o tampão de ligação B3. Linha 1 – marcador de peso molecular de 100 pares de base; linhas 2 e 3 – produto de amplificação de amostras purificadas.

c) Após a eletroforese em gel de agarose, escolher as amostras mais puras e fazer a quantificação espectrométrica das amostras.

7- Referências

PURELINK® PCR Purification Kit: for rapid, efficient purification of PCR products. Carlsbad: Life Technologies, 2011. 14 p.

Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* utilizando kit pGEM - T Easy Vector System Promega

	Procedimento Operacional Padrão		POP-LABGEM-MET-07	
			<i>Página:</i> 1 de 17	
Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM -T Easy Vector System Promega				
<i>Revisão:</i>	00	<i>Emissão:</i>	SET/2017	
<i>Elaborado por:</i>	Luciana Gatto Brito	<i>Aprovado por:</i>	Luciana Gatto Brito	

1- Objetivo

Estabelecer critérios para o procedimento de clonagem e transformação de células competentes utilizando kit comercial pGEM-T Easy Vector System II Promega_Cat Number A1360, A1380, A3600 eA3610.

2- Área de aplicação

Metodologia apresentada no POP a ser iniciada no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GQ	Gestão da Qualidade
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
POP	Procedimento Operacional Padrão

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
<i>Revisão:</i>	00	Set/17	<i>Emissão inicial do documento</i>	
<i>Distribuição:</i>	LABGEM	Set/17	<i>Laboratório de Genética Molecular</i>	

POP:	POP-LABGEM-MET-07	2 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM -T Easy Vector System Promega	

5- Insumos

- Microtubos para PCR de 200 µL.
- Caneta para marcação de microtubos.
- Estante para microtubos.
- H₂O Milli-Q.
- Vórtex.
- Banho-maria.
- Micropipetadores.
- Microcentrifuga refrigerada ≥ 10.000 g.
- Termociclador.
- Sistemas de eletroforeses.
- Workstation.
- Racks.
- Ponteiras para micropipetadores livres de RNase.
- Kit de purificação de produtos de PCR.
- Placas com meio LB com ampicilina / IPTG / X-Gal (duas placas por reação de ligação + duas placas para determinar a eficiência de transformação).
- Meio SOC.
- Agrose.
- Marcador de pares de base.

6- Procedimentos

6.1- Pré-clonagem

- a) Realizar duas PCRs (Reação em Cadeia da Polimerase) com volume de 50 µL usando os *primers* de interesse.
- b) Aplicar cerca de 10 µL do produto da PCR em gel de agarose a 1-3% para verificar o produto de amplificação.

6.2- Ligação do DNA utilizando o sistema pGEM

- a) Centrifugar brevemente os tubos de pGEM®-T ou pGEM®-T Easy Vector e DNA Control Insert para coletar o conteúdo na parte inferior dos tubos.
- b) Configurar as reações de ligação como descrito na Tabela 2.

POP:	POP-LABGEM-MET-07	3 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

Nota: Usar tubos de 0,5 mL conhecidos por possuir baixa capacidade de ligação ao DNA. Vortexar o tampão de ligação rápido (*Rapid Ligation Buffer*) 2X vigorosamente antes de cada uso.

Tabela 2. Reações de ligação.

Componente da reação	Reação padrão	Controle positivo	Controle da reação
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5,0 µl	5,0 µl	6,0 µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Produto da PCR	X µl*	-	-
DNA Inseto Controle	-	2,0 µl	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Água ultrapura para completar o volume final	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl

*Taxa molar do produto da PCR: podem ser necessárias a otimização e a quantificação do inseto.

c) Misturar as reações usando micropipeta. Incubar as reações durante 1 hora à temperatura ambiente. Alternativamente, para a obtenção de um número máximo de transformantes, as reações devem ser incubadas a 4 °C *overnight*.

Obs.:

1. Usar apenas a T4 DNA Ligase fornecida com o sistema pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector para executar a ligação. Outras preparações comerciais de T4 DNA ligase podem conter atividades exonuclease, o que pode remover as desoxitimidinas terminais do vetor.
2. O tampão de Ligação Rápida 2X (*2X Rapid Ligation Buffer*) contém ATP, que se degrada durante as flutuações de temperatura. Evite múltiplos ciclos de congelamento-descongelamentos e a exposição do tampão a mudanças frequentes de temperatura preparando alíquotas de uso único do tampão (*buffer*).
3. Tempos de incubação mais longos aumentarão o número de transformantes. Geralmente, a incubação *overnight* a 4 °C produz um número máximo de transformantes.
4. A eletroforese do produto da PCR em gel de agarose antes da realização da reação de ligação é importante para verificar se a reação produziu o produto desejado. O produto da PCR a ser ligado pode ser purificado a partir do gel de agarose ou purificado diretamente do produto de amplificação por PCR. Em

POP:	POP-LABGEM-MET-07	4 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

qualquer uma das situações deve-se utilizar kit de purificação específico. A purificação das reações antes da ligação é recomendada para remover dímeros de *primers* e outros produtos indesejados da reação, assim como para melhorar a eficiência da ligação. Deve-se evitar ao máximo a exposição dos produtos da PCR à radiação ultravioleta a fim de evitar a formação de dímeros de pirimidina.

6.3- Otimização do Inseto:Vetor

a) Os sistemas pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector foram otimizados usando uma relação molar 1:1 da amostra Controle de Inseto de DNA para os vetores. No entanto, as proporções de 8:1 a 1:8 também foram utilizadas com sucesso. Se experimentos iniciais com o produto da PCR apresentarem problemas, será necessário a otimização da relação. Taxas de 3:1 a 1:3 fornecem bons parâmetros iniciais.

b) A concentração de produto da PCR deve ser estimada através da utilização de padrões de massa de DNA (preferencialmente de 1 kb) ou através de ensaio com fluorescência. Os vetores pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector possuem aproximadamente 3 kb e são fornecidos com uma concentração de 50 ng/μl.

Para calcular a quantidade apropriada de produto da PCR (inserção) para incluir na reação de ligação, usar a seguinte equação:

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho (kb) do inseto}}{\text{tamanho (kb) do vetor}} \times \text{relação inseto:vetor} = \text{quantidade (ng) do inseto}$$

Exemplo do cálculo para obtenção da relação inseto: vetor

Quanto de produto da PCR purificado de 0,5 kb deve ser adicionado para a ligação na qual 50 ng de vetor de 3,0 kb será utilizado, sendo a razão inseto:vetor utilizada de 3:1, qual a relação molar adequada?

$$\frac{50 \text{ ng} \times 0,5 \text{ kb do inseto}}{3,0 \text{ kb do vetor}} \times \frac{3}{1} = 25 \text{ ng do inseto}$$

Caso os parâmetros utilizados fossem de 1:1 da relação inseto:vetor, seriam necessários 8,3 ng de um inseto de DNA de 0,5 kb.

Obs.: Pode-se utilizar a calculadora Biomath (www.promega.com/biomath/) para determinar a quantidade necessária do inseto de DNA. O tamanho do vetor pGEM®-T é de 3000 pb e o tamanho do vetor pGEM®-T Easy é de 3015 pb.

POP:	POP-LABGEM-MET-07	5 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

6.4- Transformações usando sistema pGEM®-T: Reação de Ligação

a) Use células competentes de alta eficiência ($\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g de DNA) para as transformações.

b) Ligação de fragmentos com uma cauda terminal de base única pode ser ineficiente, por isso é essencial usar células com uma eficiência de transformação de 1×10^8 ufc/ μ g de DNA (ou superior) para obter um número razoável de colônias. Recomenda-se o uso de JM109 High Efficiency Competent Células (Cat. L2001). Essas células são fornecidas com os sistemas pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector II.

c) Outras linhagens de células competentes podem ser utilizadas, porém, devem ser compatíveis com o sistema de seleção por cores azul/branco e padrão de seleção padrão por ampicilina.

Obs.: O uso de células competentes de alta eficiência (por exemplo, células XLTM Gold® Ultracompetent) pode resultar em um maior *background* de colônias azuis.

d) Se forem utilizadas células competentes, exceto as Células Competentes de Alta Eficiência JM109 fornecidas pela Promega, é importante que seja seguido o protocolo de transformação apropriado para a linhagem celular utilizada. A seleção para transformantes deve ser em meio LB / ampicilina / IPTG / X-Gal (Protocolo em Anexo no final deste POP). Para obter melhores resultados, placas contendo o meio preparadas a mais de 1 mês não devem ser utilizadas.

e) O genótipo JM109 é *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rK -, mK +), *relA1*, *supE44*, Δ (lac-pro AB), [F', *traD36*, *proAB*, *lac*^F Z Δ M15].

6.5- Protocolo de Transformação

a) Preparar duas placas LB / ampicilina / IPTG / X-Gal para cada reação de ligação, além de duas placas para determinar a eficiência de transformação. As placas com o meio de crescimento devem ser estabilizadas à temperatura ambiente.

b) Centrifugar os tubos contendo as reações de ligação para coletar o conteúdo na parte inferior. Adicionar 2 μ l de cada reação de ligação a um tubo de polipropileno estéril (17 \times 100 mm) ou a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que deve ser mantido em gelo. Preparar outro tubo com plasmídeo não cortado de 0,11 ng para determinar a eficiência de transformação das células competentes, o qual também deve ser mantido em gelo.

c) Retirar uma alíquota congelada de células competentes de alta eficiência e realizar o descongelamento em banho de gelo por cerca de 5 minutos. Misturar as células suavemente. Evitar a pipetagem excessiva, uma vez que as células são extremamente frágeis.

POP:	POP-LABGEM-MET-07	6 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM -T Easy Vector System Promega	

d) **Transferir cuidadosamente** 50 µl de células para cada tubo preparado no passo b (usar 100 µl de células para determinação de eficiência de transformação).

e) **Misturar suavemente** os tubos e colocá-los em banho de gelo por 20 minutos.

f) Proceda o choque térmico das células por 45-50 segundos em banho-maria exatamente a 42 °C (**não agitar**).

g) Voltar imediatamente os tubos para o gelo por 2 minutos.

h) Adicionar 950 µl de meio SOC à temperatura ambiente aos tubos contendo as células transformadas com as reações de ligação e 900 µl de meio SOC para o tubo contendo as células transformadas com o plasmídeo não cortado (o caldo LB pode ser substituído, mas o número de colônia pode ser menor).

i) Incubar sob agitação (~150 rpm) durante 90 minutos a 37 °C.

j) Distribuir 100 µl de cada transformação em cada uma placas contendo meio de crescimento LB / ampicilina / IPTG / X-Gal. Para o controle da transformação, recomenda-se uma diluição 1:10 com meio SOC para o plaqueamento. Se um número maior de colônias é desejado, as células podem ser sedimentadas por centrifugação a 1.000 x g durante 10 minutos, ressuspender em 200 µl de Meio SOC e utilizar 100 µl em cada uma das placas.

l) Incubar as placas *overnight* (16-24 horas) a 37 °C. Do plaqueamento de 100 µl da reação de transformação espera-se obter aproximadamente 100 colônias por placa, sendo esta eficiência referente à utilização de células competentes com 1×10^8 cfu/µg de DNA.

m) O uso de células competentes de alta eficiência pode resultar em um maior *background* (número) de colônias. Incubações mais longas ou o armazenamento das placas com meio de crescimento a 4 °C (após a incubação *overnight* a 37 °C) pode ser usado para facilitar o aparecimento das colônias de cor azul. As **colônias brancas geralmente contêm os insertos**; no entanto, insertos do DNA alvo também podem estar presentes nas colônias azuis.

Obs.:

1. A utilização de tubos maiores (17×100 mm) de polipropileno, tipo falcon (Falcon™ Cat. # 2059) aumenta a eficiência da transformação. Os tubos de alguns fabricantes propiciam a ligação do DNA na parede e devem ser evitados.

2. As colônias que contêm atividade da β-galactosidase podem crescer menos em relação às células que não possuem esta atividade. Após o crescimento *overnight*, as colônias azuis podem ser menores do que as colônias brancas, que apresentam aproximadamente 1 mm em diâmetro.

3. A cor azul ficará mais escura se, após a incubação *overnight*, as placas

POP:	POP-LABGEM-MET-07	7 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

passarem por um novo período de incubação *overnight* a 4 °C.

Exemplo: *Cálculo de Eficiência de Transformação*

Depois de 100 µl de células competentes serem transformadas com 0,1 ng de DNA de plasmídeo não cortado, adiciona-se a reação de transformação 900 µl de meio SOC (0,1 ng de DNA/ml). A partir desse volume, uma diluição 1:10 com meio SOC (0,01 ng de DNA/ml) é feita e 100 µl desta diluição é transferida para cada uma das duas placas (0,001 ng de DNA/100 µl). Se forem obtidas 200 colônias (média de duas placas), qual é a eficiência de transformação?

$$\frac{200 \text{ cfu}}{0,001 \text{ ng}} = 2 \times 10^5 \text{ cfu/ng} = 2 \times 10^8 \text{ cfu/}\mu\text{g DNA}$$

6.6- Seleção dos insertos transformados

1. A clonagem bem-sucedida de um inserto utilizando o sistema pGEM® interrompe a sequência de codificação da β-galactosidase, o que permite que os clones recombinantes sejam identificados por seleção por coloração em placas indicadoras.

2. No entanto, as características dos produtos de PCR clonados nos vetores podem afetar significativamente a proporção de colônias azuis:brancas obtidas.

3. Normalmente, os clones que contêm produtos da PCR produzem colônias brancas, mas as colônias azuis podem também conter o fragmento do produto de PCR que foram clonados *in frame* (enquadrado) com o gene *lacZ*. Tais fragmentos são geralmente múltiplos de 3 pares de bases de comprimento (incluindo a extremidade 3'-A) e não contêm os códons de parada *in frame*.

4. Há relatos de fragmentos de DNA de até 2 kb que foram clonados *in frame* e produziram colônias azuis.

5. Mesmo que seu produto da PCR não seja um múltiplo de 3 bases de comprimento, o processo de amplificação pode introduzir mutações (deleções ou mutações pontuais) que podem resultar em colônias azuis.

6. O Controle de Inseto de DNA fornecido com os sistemas pGEM® é um fragmento de DNA de 542 pb do vetor pGEM®-luc (Cat. # E1541). Esta sequência foi mutada para conter vários códons de parada em todas as seis regiões de leitura abertas, o que garante um baixo *background* de colônias azuis na reação de controle.

7. Resultados obtidos com o Controle de Inseto de DNA podem não ser representativos daqueles alcançados com seu produto da PCR.

POP:	POP-LABGEM-MET-07	8 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

7- pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector: Sequências, sítios de multiclonagem e mapa circular

7.1- Sítios de sequência e multiclonagem do vetor pGEM®-T

O vetor pGEM®-T é derivado do vetor pGEM®-5Zf (+) (GenBank® N° de Acesso X65308). O vetor pGEM®-T foi criado linearizando o vetor pGEM®-5Zf (+) com EcoRV na base 51 adicionando-se uma Tem em ambos os extremos 3'. O site EcoRV não será recuperado após a ligação vetor:inserto (Figura 1).

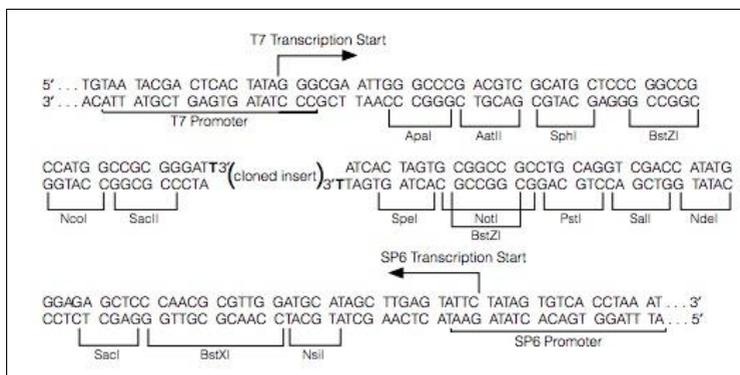
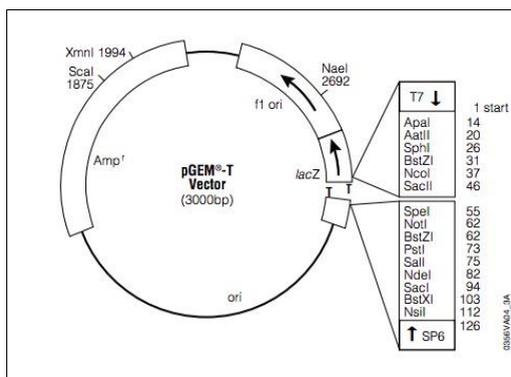


Figura 1. O promotor e a sequência de clonagem múltipla do vetor pGEM®-T. A sequência superior corresponde ao RNA sintetizado pela RNA polimerase T7. A sequência inferior corresponde ao RNA sintetizado pelo RNA polimerase SP6.

7.2- Mapa do vetor pGEM®-T e pontos de referência das sequências



POP:	POP-LABGEM-MET-07	9 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

Pontos de referência da sequência de vetores pGEM®-T:

Sítio de iniciação da transcrição da T7 RNA polimerase	1
Região de clonagem múltipla	10-113
Promotor da SP6 RNA polimerase (-17 a +3)	124-143
Sítio de iniciação da transcrição da SP6 RNA polimerase	126
Sítio de ligação da sequência reversa do <i>primer</i> pUC/M13	161-177
Códon de iniciação <i>lacZ</i>	165
Operon <i>lac</i>	185-201
Região de codificação de β -lactamase	1322-2182
Região phage f1	2365-2820
Sequências do operon <i>lac</i>	2821–2981, 151–380
Sítio de ligação da sequência dianteira do <i>primer</i> pUC/M13	2941–2957
Promotor da T7 RNA polimerase (-17 a +3)	2984–3

Nota: Uma única digestão com o BstZI irá liberar inserções clonadas no vetor pGEM®-T. Digestões duplas também podem ser usadas para liberar inserções. Iso esquizômeros da BstZI incluem EagI e Eco52I.

7.3- Sítios de sequência e multi-clonagem do pGEM®-T Easy Vector

A sequência do pGEM®-T Easy Vector está disponível em: www.promega.com/vectors/.

O pGEM®-T Easy Vector foi linearizado na base 60 com EcoRV e uma T foi adicionada em ambas as extremidades 3'. O site EcoRV não será recuperado após a ligação vetor:inserto (Figura 2).

POP:	POP-LABGEM-MET-07	10 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

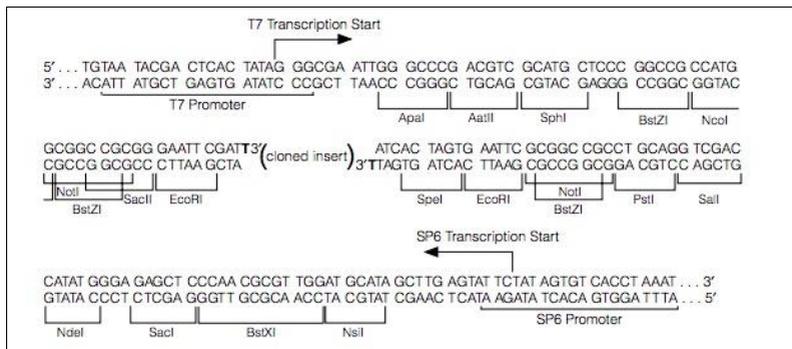
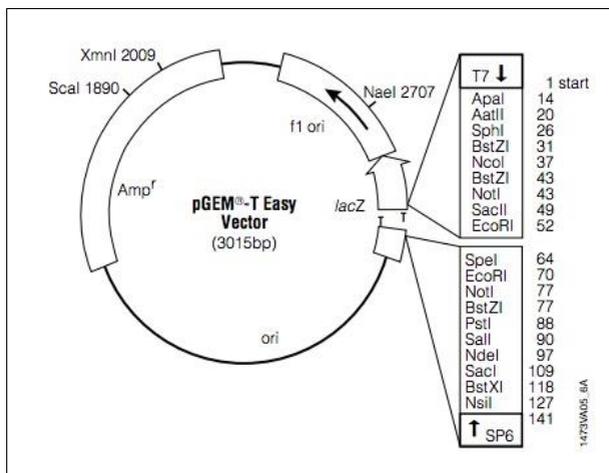


Figura 2. Promotor e sequência de clonagem múltipla do pGEM®-T Easy Vector. A sequência superior corresponde ao RNA sintetizado pela T7 RNA polimerase. A sequência inferior corresponde ao RNA sintetizado pela SP6 RNA polimerase.

7.4- Mapa do vetor pGEM®-T Easy e pontos de referência das sequências



POP:	POP-LABGEM-MET-07	11 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

Pontos de referência da sequência de vetores pGEM®-T Easy:

Sítio de iniciação da transcrição da T7 RNA polimerase	1
Região de clonagem múltipla	10-128
Promotor da SP6 RNA polimerase (-17 a +3)	139-158
Sítio de iniciação da transcrição da SP6 RNA polimerase	141
Sítio de ligação da sequência reversa do <i>primer</i> pUC/M13	176-197
Códon de iniciação <i>lacZ</i>	180
Operon <i>lac</i>	200-216
Região de codificação de β -lactamase	1337-2197
Região phage f1	2380-2835
Sequências do operon <i>lac</i>	2836–2996, 166–395
Sítio de ligação da sequência dianteira do <i>primer</i> pUC/M13	2949–2972
Promotor da T7 RNA polimerase (-17 a +3)	2999–3

Nota: (1) Os insertos podem ser sequenciados usando o *primer Promoter SP6* (Cat. # Q5011), o *primer Promoter T7* (Cat. # Q5021), *primer PUC/M13 Forward* (Cat. # Q5601), ou *primer pUC/M13 Reverse* (Cat. # Q5421). (2) Uma única digestão com o BstZI (Cat.# R6011) ou Not I (Cat.# R6431) irá liberar inserções clonadas no vetor pGEM®-T Easy. Digestões duplas também podem ser usadas para liberar inserções. Iso esquizômeros da BstZI incluem EagI e Eco52I.

8- Possíveis problemas

Problema	Causa e comentários
Não há colônias	Ocorreu um problema com a reação de transformação ou as células perderam a competência. <i>Background</i> de vetores não digeridos e o vetor T caudado não religado devem produzir 10-30 colônias azuis independentes da presença de DNA de inserção. Verificar o

POP:	POP-LABGEM-MET-07	12 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM -T Easy Vector System Promega	

	<p><i>background</i> do controle.</p> <p>Usar células competentes de alta eficiência ($\geq 1 \times 10^9$ cfu/μg de DNA). Testar a eficiência transformando as células com um plasmídeo não cortado que permite a seleção de antibióticos, como o vetor pGEM®-5Zf (+). As células a 1×10^8 cfu/μg de DNA geralmente produzem 100 colônias. Portanto, você não verá colônias de células que sejam $< 1 \times 10^7$ cfu/μg de DNA.</p>
Menos de 10% de colônias brancas com inserto de DNA controle	<p>Diluição incorreta da 2X Rapid Ligation. O tampão T4 de DNA-ligase do kit está a uma concentração de 2X. Use 5 μl em 10 μl reação.</p>
	<p>Se o número total de colônias for alto, mas há poucas ou nenhuma colônia branca, as células competentes podem ser de alta eficiência ($\geq 1 \times 10^9$ cfu/μg), mas pode haver um problema de ligação. Aproximadamente 1.000 colônias podem ser obtidas a partir da ligação de controle positivo usando células que são 10^9 cfu/μg de DNA, com 70-90% de colônias brancas. Se a ligação for subótima ou falhar, o número total de colônias será alto (até 300 células a 1×10^9 cfu/μg), mas a quantidade de colônias brancas será baixa ou zero.</p>
	<p>A reação de ligação falhou. O tampão Ligase pode ter DNA com pouca atividade. O tampão de Ligação Rápida 2X contém ATP, que se degrada durante as flutuações de temperatura. Evitar múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento fazendo alíquotas de uso único do <i>buffer</i>. Usar um frasco fresco de <i>buffer</i>. Para testar a atividade da ligase e do tampão, configurar uma ligação com ~20 ng de marcadores de DNA (por</p>

POP:	POP-LABGEM-MET-07	13 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM -T Easy Vector System Promega	

	<p>exemplo, marcadores Lambda DNA/HindIII, Cat. # G1711). Comparar o DNA ligado e não ligado em um gel e verificar se os fragmentos foram religados em material de alto peso molecular.</p> <p>As extremidades T foram removidas, permitindo uma frágil ligação dos vetores com a extremidade frouxa, o que dá origem a mais colônias azuis do que brancas. Evitar a introdução de nucleases, o que pode degradar as extremidades em T. Usar apenas a T4 DNA Ligase fornecida com o sistema, a qual foi testada para uma mínima atividade exonuclease. Além disso, usar água estéril, livre de nuclease.</p>
Menos de 60% de colônias brancas com DNA controle de Inserção	<p>Diluição inadequada do tampão de Ligação Rápida (<i>Rapid Ligation Buffer</i>). O tampão de Ligação Rápida é fornecido com uma concentração de 2X. Usar 5 µl em uma reação de 10 µl</p> <p>As extremidades em T foram removidas, permitindo uma ligação frouxa das extremidades do vetor e dando origem a colônias mais azuis do que brancas. Evitar a introdução de nucleases, o que pode degradar as extremidades em T. Usar apenas a T4 DNA Ligase fornecida com o sistema, que foi testada para uma mínima atividade exonuclease.</p>
	<p>A temperatura de ligação está muito alta. Temperaturas mais altas (> 28 °C) dão origem a um aumento do <i>background</i> (colônias azuis) e menos colônias recombinantes.</p>
	<p>Diluição inadequada do tampão de Ligação Rápida (<i>Rapid Ligation Buffer</i>). O tampão de Ligação Rápida é fornecido com uma concentração de 2X. Usar 5 µl em uma reação de 10 µl.</p>

POP:	POP-LABGEM-MET-07	14 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM -T Easy Vector System Promega	

Baixo número ou não crescimento de colônias brancas contendo o produto da PCR	A incubação para a ligação não foi suficientemente longa. Resultados ótimos são vistos com um tempo de ligação <i>overnight</i> .
	A ligação fracassou devido a uma inibição de algum componente do produto de PCR. Misturar alguns dos produtos de PCR com a ligação de controle positivo para determinar se existe um inibidor. Se for indicado um inibidor, repurificar o fragmento de PCR.
	O produto de PCR não está ligando porque não há extremidades 3'-A. Nem todas as DNA polimerases termostáticas criam uma saliência 3'-A. Os fragmentos de corte contudente podem ser subsequentemente submetidos ao tratamento com uma polimerase apropriada e dATP.
	O produto de PCR não pode ser ligado devido à formação de dímeros de pirimidina formados por exposição excessiva a UV. Este é um problema comum com DNA purificado a partir do gel. Não há como corrigir esta falha; o DNA deve ser refeito. A exposição a ondas UV curtas deve ser limitada tanto quanto possível. Usar uma placa de vidro entre o gel e a fonte UV para diminuir a superexposição a UV. Se possível, apenas visualizar o produto de PCR usando uma fonte UV de onda longa.
	O fragmento de PCR é inserido, mas não está interrompendo o gene lacZ. Se houver um maior número de colônias azuis resultantes da ligação do fragmento de PCR do que no <i>background</i> controle, algumas dessas colônias azuis podem conter inserção. Remover as colônias azul e azul pálido.

POP:	POP-LABGEM-MET-07	15 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM -T Easy Vector System Promega	

	<p>A relação inserto:vetor não é a ideal. Verificar a integridade e a quantidade do seu fragmento de PCR por análise de gel. Otimizar a relação inserto:vetor.</p> <p>Pode haver dímeros de <i>primers</i> presentes no produto de PCR purificado. Os dímeros de <i>primers</i> ligam-se ao vetor pGEM®, mas podem não ser vistos após a análise da digestão por restrição em gel devido ao seu pequeno tamanho. O vetor parece não conter inserção. Mais colônias azuis podem ser vistas com a ligação do que nas placas controle de <i>background</i>. O fragmento de PCR deve ser purificado a partir do gel.</p> <p>Múltiplos produtos de PCR podem ter sido gerados e clonados no vetor pGEM®. Purificar o fragmento de PCR de interesse a partir do gel.</p> <p>O DNA foi reorganizado. Verificar uma série de clones para ver se o rearranjo é aleatório. Se assim for, o clone de interesse deve estar presente e pode ser identificado pela triagem de vários clones. Se o mesmo rearranjo for encontrado em todos os clones, o uso de uma deformação bacteriana deficiente (por exemplo, células SURE®) pode reduzir os eventos de recombinação.</p>
A reação de ligação do produto da PCR produz apenas colônias brancas (sem colônias azuis)	<p>A ampicilina está inativa, permitindo que as células sensíveis à ampicilina cresçam. Verificar se as placas de ampicilina são feitas corretamente e usadas dentro de um mês. Testar a atividade da ampicilina nas placas, com e sem ampicilina, utilizando um clone sensível à ampicilina.</p> <p>A estirpe bacteriana (por exemplo, JM109) perdeu seu episoma F', ou a cepa bacteriana utilizada não é</p>

POP:	POP-LABGEM-MET-07	16 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

	compatível com a seleção azul/branco. Verificar o <i>background</i> do controle. Se essas colônias não são azuis, as células podem ter perdido o episoma F' (assumindo que lac I ^q ZΔM15 está localizado no F' na cepa transformada e placas apropriadas foram usadas). Certificar se de que as células estão preparadas adequadamente para uso com o sistema.
	As placas são incompatíveis com a seleção azul/branco. Verificar o <i>background</i> do controle. Se essas colônias não forem azuis, verificar se as placas possuem ampicilina/IPTG/X-Gal e estão recém-preparadas. Se houver alguma dúvida sobre a qualidade das placas, refazer as placas com novos meios de crescimento.
Não há clones suficientes que contenham o produto da PCR de interesse	Fragmento da PCR com uma cauda A-insuficiente. Após a purificação do produto da PCR de interesse, criar uma reação de cauda-A. Limpar a amostra e prosseguir com o protocolo.
	A relação inserto:vetor não está ideal. Verificar a integridade e a qualidade do seu fragmento da PCR por análise do gel. Otimizar a relação inserto:vetor.
	Múltiplos produtos da PCR são gerados e clonados no vetor pGEM®-. Purificar o fragmento da PCR de interesse a partir do gel.

9- Referências

TECHNICAL manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Instructions for Use of Products. Madison: Promega Corporation, 2015. 28 p.

POP:	POP-LABGEM-MET-07	17 de 17
Título:	Clonagem e transformação de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> utilizando kit pGEM-T Easy Vector System Promega	

Anexo

1. Composição de *Buffers* e Soluções

1. IPTG Solução estoque (0.1M)

- 1.2 g IPTG.

Adicionar água ultrapura até se completar um volume final de 50 mL. Filtrar, esterilizar e estocar a 4 °C.

2. X-Gal (2 mL)

- 100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside.

Dissolver em 2 mL de N, N'-dimetilformamida. Tampar com papel alumínio e armazenar a - 20 °C.

3. Meio LB (por litro)

- 10 g Bacto®-tripton.
- 5 g de extrato de levedura Bacto®.
- 5 g de NaCl.

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH.

4. Preparo das placas de Petri com meio LB com ampicilina

Adicionar 15 g de ágar a 1 L de meio LB. Autoclave. Promover o resfriamento do meio até 50 °C antes de adicionar ampicilina a uma concentração final de 100 ug/ml. Despejar 30-35 ml do meio em placas de Petri de 85 mm de diâmetro. Deixar o ágar endurecer. Armazenar a 4 °C por até 1 mês ou à temperatura ambiente por até 1 semana.

5. Placas de placas de Petri com meio LB com ampicilina / IPTG / X-Gal

Fazer as placas LB com ampicilina conforme descrito no item 5; em seguida, adicionar IPTG 0,5 mM e 80 µg/ml de X-Gal e despejar nas placas. Alternativamente, 100 µl de IPTG de 100mM e 20 µl de X-Gal a 50 mg/ml podem ser espalhados sobre a superfície de uma placa de Petri contendo meio LB-ampicilina. As placas devem ser incubadas por 30 minutos a 37 °C antes da utilização.

Preparo de soluções desinfetantes utilizadas em atividades de rotina

	Procedimento Operacional Padrão		POP-LABIOTEC-MET-08	
			<i>Página:</i> 1 de 4	
Preparo de soluções desinfetantes utilizadas em atividades de rotina				
<i>Revisão:</i>	00	<i>Emissão:</i>	SET/2017	
<i>Elaborado por:</i>	Ilmarina Campos de Menezes	<i>Aprovado por:</i>	Simone de Miranda Rodrigues	

1- Objetivo

Estabelecer critérios para o preparo de soluções desinfetantes para assepsia de material vegetal, superfícies e ambientes.

2- Área de aplicação

Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GL	Gay Lusac
LABIOTEC	Laboratório de Biotecnologia
POP	Procedimento Operacional Padrão

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários, bolsistas e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
<i>Revisão:</i>	00	set/17	<i>Emissão inicial do documento</i>	
<i>Distribuição:</i>	LABIOTEC	set/17	<i>Laboratório de Biotecnologia</i>	

POP:	POP-LBM-MET-08	2 de 4
Título:	Preparo de soluções desinfetantes utilizadas em atividades de rotina	

5- Insumos

- Proveta (com graduação dependente do volume final da solução).
- Becker.
- Álcool etílico comercial 92,8 °GL.
- Hipoclorito de sódio (2,5% ou 10%).
- Água destilada.

6- Descrição

6.1- Preparo de álcool a 70%

O álcool utilizado para assepsia de material vegetal e assepsia em geral tem a concentração de 70%. Podemos preparar essa concentração a partir do álcool comercial que está disponível na concentração de 92,8 °GL.

A fórmula utilizada para a preparação do álcool 70% é:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Ex: Preparação de 1L de álcool a 70%

$$92,8\% \times V_1 = 70\% \times 1.000 \text{ mL}$$

92,8 – corresponde à concentração inicial.

V_1 – corresponde ao volume inicial.

70 – corresponde à concentração desejada da solução .

1.000 – corresponde ao volume final (da solução à 70%).

Resultado:

$$V_1 = 754,31 \text{ mL}$$

É necessário 754,31 mL de álcool a 92,8% e 245,69 mL de água destilada para se obter uma solução de 1.000 mL de álcool a 70%.

Para tanto, colocar 754,31 mL de álcool a 92,8% em uma proveta de 1 L e completar para 1.000 mL com água destilada.

Definição da solução: Líquido altamente inflamável, límpido e incolor, odor característico, estável sob condições normais de temperatura e pressão, pH 6,5 – 9,0. Risco de explosão (Álcool 92,8%).

Armazenamento: Armazenar em local ventilado e identificado, evitar locais com sol, chuva e altas temperaturas. Deve ficar afastado de produtos químicos incompatíveis.

POP:	POP-LBM-MET-08	3 de 4
Título:	Preparo de soluções desinfetantes utilizadas em atividades de rotina	

Como manipular: O produto deve ser manuseado obedecendo às normas e procedimentos de higiene industrial e segurança do trabalho de acordo com a legislação em vigor. Caso seja manuseado a altas temperaturas, vapores ou névoas podem ser liberados e requerem uma boa ventilação do local de trabalho. Utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs).

Risco de manipulação: A manipulação deverá ser feita longe de fonte de calor, chamas, fogo e faíscas. O contato prolongado com o produto causa irritação respiratória, náusea, cefaleia e tontura.

Em caso de contato com a pele: Enxágue com água em quantidade abundante.

Obs.: Para mais informações, consultar a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos do produto (FISQP).

6.2- Preparo de hipoclorito de sódio (NaClO)

O hipoclorito de sódio na forma comercial pode vir na apresentação de 2,5% de cloro ativo ou podemos ter também o produto de forma mais concentrada chegando a 10%. Dependendo da solução a ser utilizada e da concentração necessária de trabalho, pode-se optar por uma das duas formas comerciais indicadas acima.

A fórmula utilizada para a preparação de NaClO 1% é:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Para a preparação de 1.000 mL de solução a 1% a partir do produto comercial a 2,5%

$$2,5 \times V_1 = 1 \times 1.000$$

$$V_1 = 1 \times 1.000 / 2,5$$

$$V_1 = 400 \text{ mL}$$

Para 1.000 mL de solução de hipoclorito de sódio a 1% devemos colocar em uma proveta 400 mL de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e completar com 600 mL de água.

Definição da solução: Líquido de coloração amarelada, odor pungente, penetrante e irritante, produto não inflamável, pH 12,0.

Armazenamento: O local de armazenamento deve ter piso impermeável e ventilação exaustora. Manter o produto em recipientes bem fechados e devidamente identificados, em local fresco, seco e bem ventilado, distante de fontes de calor e ignição.

Como manipular: O produto deve ser manuseado obedecendo às normas e procedimentos de higiene industrial e segurança do trabalho de acordo com a legislação em vigor. Utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs).

Risco de manipulação: O produto reage com ácidos, liberando gás cloro irritante às vias respiratórias. Pode causar queimaduras graves à pele. Pode causar cegueira. A manipulação deverá ser feita evitando exposição ao sol e proximidade à fonte de calor, evitar respirar o vapor produzido pelo produto.

Em caso de contato com a pele: Em caso de contato com a pele ou olhos, lave imediatamente a região com água em abundância por no mínimo 15 minutos.

POP:	POP-LBM-MET-08	4 de 4
Título:	Preparo de soluções desinfetantes utilizadas em atividades de rotina	

Obs.: Para mais informações consultar a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos do produto (FISQP).

7- Referências

MUNDO EDUCAÇÃO. **Mundo Educação – Educação, Vestibular, ENEM, Trabalhos Escolares**. Disponível em: <<https://mundoeducacao.bol.uol.com.br>>. Acesso em: 11 set. 2017.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, agentes e solventes: padronização, preparação, purificação com indicadores de segurança e de descarte de produtos químicos**. São Paulo. Blucher, 2007. 754 p.

Desinfestação de material vegetal (rizoma de banana, *Musa* sp.) para inoculação *in vitro*

	Procedimento Operacional Padrão	POP-LABIOTEC-MET-09
		<i>Página:</i> 1 de 5
Desinfestação de material vegetal (rizoma de bananeira, <i>Musa</i> sp.) para inoculação <i>in vitro</i>		
<i>Revisão:</i> 00		<i>Emissão:</i> SET/2017
<i>Elaborado por:</i> Ilmarina Campos de Menezes		<i>Aprovado por:</i> Simone de Miranda Rodrigues

1- Objetivo

Estabelecer critérios e detalhar etapas para desinfestação de material vegetal (rizoma de bananeira *Musa* sp.) para iniciar o processo de propagação *in vitro*.

2- Área de aplicação

Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
LABIOTEC	Laboratório de Biotecnologia
POP	Procedimento Operacional Padrão
MS	Murashige & Skoog

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários, bolsistas e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
<i>Revisão:</i>	00	set/17	<i>Emissão inicial do documento</i>	
<i>Distribuição:</i>	LABIOTEC	set/17	<i>Laboratório de Biotecnologia</i>	

POP:	POP-LABIOTEC-MET-09	2 de 5
Título:	Desinfestação de material vegetal (rizoma de bananeira, <i>Musa sp.</i>) para inoculação <i>in vitro</i>	

5- Insumos

- Câmara de fluxo Laminar (vertical ou horizontal).
- Etiquetas.
- Material autoclavado para limpeza da câmara: papel toalha e/ou algodão, borrifador contendo álcool 70% .
- Material autoclavado para manipulação: pinças, cabos de bisturi, lâminas de bisturi, lamparina com álcool etílico (92 °GL), tubos para centrifugação tipo Falcon de 45 mL, placas de Petri, becker, espátulas, frascos de vidro de 300 mL, tipo maionese, contendo meio de cultura MS.
- Material para assepsia: álcool a 70%, solução de hipoclorito de sódio em diversas concentrações dependendo do material vegetal (concentração de 2,5%, 1,5%, 1%), água autoclavada em frascos de vidro.
- Material vegetal: segmento de folha, segmento de caule, sementes.
- Material para inoculação: frascos de vidro de 300 mL, tipo maionese, contendo meio de cultura MS.

6- Descrição

- Inicialmente fazer a higienização das mãos com água e sabão e, em seguida, com álcool a 70%. Retirar relógio, pulseiras, anéis e outros adereços de mãos e braços; vestir jaleco.
- **O procedimento deve ser feito em câmara de fluxo laminar.**
- Fazer a higienização da câmara de fluxo laminar com auxílio de papel toalha ou algodão autoclavado e álcool 70% com auxílio de borrifador. Borrifar álcool nas paredes laterais da câmara de fluxo laminar e espalhar em toda a superfície da parede com auxílio de papel toalha ou algodão. Por último, limpar a superfície horizontal onde será feito o trabalho de assepsia do material vegetal.
- Colocar todo o material da atividade dentro da câmara de fluxo laminar, sempre borrifando álcool 70% em todos os utensílios.
- Distribuir estrategicamente o material dentro da câmara de fluxo laminar sempre

POP:	POP-LABIOTEC-MET-09	3 de 5
Título:	Desinfestação de material vegetal (rizoma de bananeira, <i>Musa sp.</i>) para inoculação <i>in vitro</i>	

tomando cuidado de separar a fonte de álcool e fogo.

Obs.: Higienizar as mãos com álcool 70% todas as vezes que retirá-las de dentro da câmara de fluxo laminar.

- O início da assepsia do material vegetal deve ser realizado fora da câmara de fluxo laminar. O material deve ser lavado em água corrente por alguns minutos, esse tempo pode ser estendido dependendo do material vegetal. De um modo geral, tecidos ou órgãos mais tenros devem ter um menor tempo de lavagem, já sementes ou tecidos mais lenhosos devem ter um tempo de exposição maior na lavagem inicial. Durante esta etapa, pode ser utilizado sabão neutro para retirar de forma mais eficiente sujeira ou contaminantes que possam estar no tecido/órgão manipulado.

Obs.: Esta etapa da assepsia varia muito com o protocolo de cada laboratório e as práticas são adotadas conforme o material de trabalho.

Assepsia de rizoma de banana

- Inicialmente é necessário fazer a seleção da planta doadora de rizoma com características agrônomicas desejáveis e com bom aspecto fitossanitário.

- O explante de bananeira geralmente utilizado é do tipo “chifre”, devendo ser retirada com auxílio de cavadeira reta (ferro de cova), que constituirá o explante (Figura 1).



Figura 1. Retirada do rizoma (explante).
Foto: Oriel Lemos

POP:	POP-LABIOTEC-MET-09	4 de 5
Título:	Desinfestação de material vegetal (rizoma de bananeira, <i>Musa sp.</i>) para inoculação <i>in vitro</i>	

Pré-asepsia

Esta etapa deve ser realizada na bancada do laboratório.

- É feita a retirada das folhas e bainhas foliares e redução do tamanho do rizoma (explante) para 35 cm de comprimento e lavagem em água corrente para retirar os contaminantes superficiais.
- Corte das bainhas foliares e redução do tamanho do rizoma para 20 cm (Figura 2), lavagem em água corrente e imersão em fungicida (Benlate ou Derosal a 0,2%) durante 30 minutos. Após esse período, retirar os rizomas da solução de fungicida e deixar secar em ambiente ventilado por 15 horas.



Figura 2. Limpeza e redução do rizoma para pré-asepsia.
Fotos: Ilmarina Campos

- Reduzir novamente, com cortes, o tamanho do rizoma/bainhas foliares (explante) para 9 cm. Colocar os explantes em frascos de vidro de 300 mL, tipo maionese, contendo álcool 70% por 1 minuto. Seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 minutos.

Assepsia

Esta etapa deve ser realizada em câmara de fluxo laminar.

- Após a assepsia com hipoclorito, os explantes devem ser lavados com água destilada autoclavada por cinco vezes.

POP:	POP-LABIOTEC-MET-09	5 de 5
Título:	Desinfestação de material vegetal (rizoma de bananeira, <i>Musa</i> sp.) para inoculação <i>in vitro</i>	

- O preparo dos explantes deve ser feito individualmente em placa de Petri, onde são reduzidos, cortando-se tanto rizoma quanto bainha até atingir um tamanho de aproximadamente 2,5 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, quando serão inoculados em meio de cultura MS (Figura 3).



Figura 3. Explante inoculado em meio de cultura MS.
Fotos: Ilmarina Campos

7- Referências

LEMOS, O. F. de. **Embriogênese somática em três cultivares de bananeira (*Musa* spp. grupos AAA e AAB)**. 1984. 149 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

Desinfestação de material vegetal (pimenteira-do-reino, *Piper nigrum* L.) para inoculação *in vitro*

	Procedimento Operacional Padrão		POP-LABIOTEC-MET-10	
			Página: 1 de 4	
Desinfestação de material vegetal (pimenteira-do-reino, <i>Piper nigrum</i> L.) para inoculação <i>in vitro</i>				
Revisão:	00	Emissão:	SET/2017	
Elaborado por:	Ilmarina Campos de Menezes	Aprovado por:	Simone de Miranda Rodrigues	

1- Objetivo

Estabelecer critérios e detalhar etapas para desinfestação de material vegetal (sementes de pimenteira-do-reino *Piper nigrum* L.) para iniciar o processo de propagação *in vitro*.

2- Área de aplicação

Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental.

3- Simbologia, terminologia, siglas e definições

Tabela 1. Siglas e definições.

Siglas	Definições
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
LABIOTEC	Laboratório de Biotecnologia
POP	Procedimento Operacional Padrão
MS	Murashige & Skoog

4- Responsabilidades

Pesquisadores, analistas, assistentes, estagiários, bolsistas e colaboradores.

	Cód.	Data	Descrição	Visto
Revisão:	00	set/17	Emissão inicial do documento	
Distribuição:	LABIOTEC	set/17	Laboratório de Biotecnologia	

POP:	POP-LABIOTEC-MET-10	2 de 4
Título:	Desinfestação de material vegetal (pimenteira-do-reino, <i>Piper nigrum</i> L.) para inoculação <i>in vitro</i>	

5- Insumos

- Câmara de fluxo laminar (vertical ou horizontal).
- Etiquetas.
- Material autoclavado para limpeza da câmara: papel toalha e/ou algodão, borrifador contendo álcool 70%.
- Material autoclavado para manipulação: pinças, cabos de bisturi, lâminas de bisturi, lamparina com álcool etílico (92 °GL), tubos para centrifugação tipo falcon de 45 mL, placas de Petri, becker, espátulas, frascos tipo maionese.
- Material para assepsia: álcool a 70%, solução de hipoclorito de sódio em diversas concentrações dependendo do tipo do tecido vegetal (concentração de 2,5%, 1,5%, 1%), água autoclavada em frascos de vidro.
- Material vegetal: segmento de folha, segmento de caule, sementes.
- Material para inoculação: frascos de vidro de 300 mL, tipo maionese, contendo meio de cultura MS.

6- Descrição

- Inicialmente fazer a higienização das mãos com água e sabão e em seguida com álcool a 70%. Retirar relógio, pulseiras, anéis e outros adereços de mãos e braços; vestir jaleco.

- O procedimento deve ser feito em câmara de fluxo laminar.

- Fazer a higienização da câmara de fluxo laminar com auxílio de papel toalha ou algodão autoclavado e álcool 70% com auxílio de borrifador. Borrifar álcool nas paredes laterais da câmara de fluxo laminar e espalhar em toda superfície da parede com auxílio de papel toalha ou algodão. Por último, limpar a superfície horizontal onde será feito o trabalho de assepsia do material vegetal.

- Colocar todo o material da atividade dentro da câmara de fluxo laminar, sempre borrifando álcool 70% em todos os utensílios.

- Distribuir estrategicamente o material dentro da câmara de fluxo laminar sempre tomando cuidado de separar a fonte de álcool e fogo.

Obs.: Higienizar as mãos com álcool 70% todas as vezes que retirá-las de dentro da câmara de fluxo laminar.

POP:	POP-LABIOTEC-MET-10	3 de 4
Título:	Desinfestação de material vegetal (pimenteira-do-reino, <i>Piper nigrum</i> L.) para inoculação <i>in vitro</i>	

- O início da assepsia do material vegetal deve ser realizado fora da câmara de fluxo laminar. O material deve ser lavado em água corrente por alguns minutos, esse tempo pode ser estendido dependendo do material vegetal. De um modo geral, tecidos ou órgãos mais tenros devem ter um menor tempo de lavagem, já sementes ou tecidos mais lenhosos devem ter um tempo de exposição maior na lavagem inicial. Durante esta etapa, pode ser utilizado sabão neutro para retirar de forma mais eficiente sujeira ou contaminantes que possam estar no tecido/órgão manipulado.

Obs.: Esta etapa da assepsia varia muito com o protocolo de cada laboratório e as práticas são adotadas conforme o material de trabalho.

Assepsia de sementes de pimenteira-do-reino

Pré-assepsia

- Após a coleta em campo, frutos maduros de pimenteira-do-reino são trazidos para o laboratório, onde são despolidos e lavados em água corrente, conforme descrição acima.

- Após a lavagem, as sementes devem ficar imersas em um becker contendo hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% *overnight*. Após esse período, as sementes devem ser lavadas novamente em água corrente.

Assepsia

- Em câmara de fluxo laminar, as sementes devem ser mergulhadas em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 1,5% por 15 minutos, seguido de cinco lavagens com água destilada autoclavada. As sementes devem ser transferidas para placas de Petri e inoculadas em frascos contendo meio de cultura MS.

7- Referências

LEMOS, O. F.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. C. de; POLTRONIERI, M. C. **Uso das técnicas de biologia celular para a produção vegetal de espécies da Amazônia**. 1999. 71 p.

POP:	POP-LABIOTEC-MET-10	4 de 4
Título:	Desinfestação de material vegetal (pimenteira-do-reino, <i>Piper nigrum</i> L.) para inoculação <i>in vitro</i>	

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, agentes e solventes: padronização, preparação, purificação com indicadores de segurança e de descarte de produtos químicos.** São Paulo: Blucher, 2007. 754 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1998. v. 2, 864 p.

Embrapa

Amazônia Oriental

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



CGPE 14292