
SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	IX
PREFÁCIO	XI

CAPÍTULO 1

PRINCÍPIOS DE ESPECTROSCOPIA (<i>Malson Neilson de Lucena</i>)	1
1.1 Fundamentação Teórica	1
1.1.1 Instrumentos para a Espectrometria Óptica . . .	4
1.2 Procedimento Experimental	6
1.2.1 Material	7
1.2.2 Protocolo	7
Referências	9

CAPÍTULO 2

TITULAÇÃO DE AMINOÁCIDOS (<i>Malson Neilson de Lucena e Amanda Tomie Ouchida</i>)	11
2.1 Fundamentação Teórica	11
2.2 Procedimento Experimental	14
2.2.1 Material	14
2.2.2 Protocolo	15
Referências	17

CAPÍTULO 3

CROMATOGRAFIA (<i>Lara Aparecida Buffoni de Campos Carneiro</i>)	19
3.1 Fundamentação Teórica	19
3.1.1 Cromatografia de Afinidade	21
3.1.2 Cromatografia de Troca Iônica	22
3.1.3 Filtração em Gel	24
3.1.4 Cromatografia em Fase Reversa	26
3.1.5 Cromatografia em Papel	28
3.2 Procedimento Experimental	30
3.2.1 Separação de Peptídeos por Cromatografia em Fase Reversa	30
3.2.2 Separação e Identificação de Aminoácidos por Cromatografia em Papel	31
Referências	33

CAPÍTULO 4

SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS (<i>Lara Aparecida Buffoni de Campos Carneiro</i>)	35
4.1 Fundamentação Teórica	35
4.2 Procedimento Experimental	39
4.2.1 Materiais	39
4.2.2 Procedimento	39
Referências	42

CAPÍTULO 5

DOSAGEM PROTEICA: PRINCÍPIOS E MÉTODOS (<i>Renato Graciano de Paula</i>)	43
5.1 Fundamentação Teórica	43
5.2 Métodos para Dosagem Proteica	44
5.2.1 Espectroscopia Usando UV Visível	44
5.2.2 Método do Biureto	45
5.2.3 Método de Lowry	47

5.2.4	Método do Ácido Bicinconínico (BCA)	51	
5.2.5	Método de Bradford.	54	
5.2.6	Considerações Finais	56	
	Referências	58	
 CAPÍTULO 6			
AValiação Estrutural Molecular na Engenharia de Proteínas (<i>Matheus Pinto Pinheiro e Malson Neilson de Lucena</i>)			63
6.1	Fundamentação Teórica	63	
6.2	Procedimento Experimental	66	
6.2.1	Busca de Estruturas Tridimensionais de Interesse	66	
6.2.2	Análises Estruturais	70	
6.2.3	Modelagem Molecular	73	
	Referências	76	
 CAPÍTULO 7			
ELETROFORESE DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOTTING (<i>Fernanda Gomes Cardoso e Silveli Suzuki Hatano</i>)			79
7.1	Fundamentação Teórica	79	
7.1.1	Eletroforese de Proteínas	79	
7.1.2	Western Blotting	83	
7.2	Procedimento Experimental	85	
7.2.1	SDS-PAGE 10 %	85	
7.2.2	Western Blotting	87	
	Referências	90	
 CAPÍTULO 8			
ZIMOGRAMA: UMA FERRAMENTA PARA O ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (<i>Renato Graciano de Paula</i>)			91
8.1	Fundamentação Teórica	91	
8.2	Procedimento Experimental	94	
8.2.1	Soluções e Tampões	94	
8.2.2	Preparo das Amostras e Corrida dos Géis	96	
	Referências	97	

CAPÍTULO 9**ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL**

<i>(Wellington Ramos Pedersoli e Renato Graciano de Paula)</i>	101
9.1 Fundamentação Teórica	101
9.1.1 Eletroforese	101
9.1.2 Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)	102
9.1.3 Separação por Ponto Isoelétrico	103
9.2 Procedimento Experimental	104
9.2.1 Preparo da Amostra	104
9.2.2 Reidratação Passiva das Tiras de IPG	106
9.2.3 Focalização Isoelétrica (IEF)	107
9.2.4 Segunda Dimensão	107
9.2.5 Eletroforese em Gel Diferencial (<i>Difference Gel Electrophoresis</i> – DIGE)	114
9.2.6 Digitalização dos Géis e Análise das Imagens ..	116
Referências	117

CAPÍTULO 10**ANÁLISE PROTEÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS: MARCAÇÃO ISOTÓPICA POR SILAC E FRACIONAMENTO**

<i>(Mariana Lopes Grassi)</i>	121
10.1 Fundamentação Teórica	121
10.2 Procedimento Experimental	126
10.2.1 Marcação Isotópica em Meio SILAC	126
10.2.2 Fracionamento Subcelular	126
Referências	128

CAPÍTULO 11

<i>(Malson Neilson de Lucena)</i>	131
11.1 Fundamentação Teórica	131
11.2 Procedimento Experimental	134
11.2.1 Efeito da Concentração de Enzima sobre a Velocidade da Reação	136
11.2.2 Efeito do Tempo de Incubação da Enzima com o Substrato	137

11.2.3	Efeito do pH sobre a Velocidade da Reação .	138
11.2.4	Efeito da Concentração de Substrato sobre a Velocidade da Reação Determinação do K_M .	141
11.2.5	Efeito dos Inibidores sobre a Velocidade da Reação.	143
	Referências	149

CAPÍTULO 12

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DE INTERESSE

BIOTECNOLÓGICO (*Malson Neilson de Lucena, Simone de Carvalho Peixoto,*

Ana Cláudia Vici, Fernanda Dell Antonio Facchini e Alexandre Maller). 151

12.1	Introdução.	151
12.1.1	Amilases.	154
12.1.2	Fosfatases	155
12.1.3	Lipases.	156
12.1.4	Celulases	157
12.1.5	Xilanases	158
12.2	Procedimento Experimental	159
12.2.1	Dosagem de Açúcares Redutores pelo Método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) . .	159
12.2.2	Dosagem da Atividade por Coloração com Iodo – Método de FUWA (1954)	163
12.2.3	Determinação da Atividade Fosfatásica	164
12.2.4	Dosagem da Atividade Lipolítica	165
	Referências	168

CAPÍTULO 13

ESTUDO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL (*Fernanda Gomes Cardoso*). 173

13.1	Fundamentação Teórica	173
13.2	Procedimento Experimental	175
13.2.1	Produção de Esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> e Purificação de Mitocôndrias.	175
13.2.2	Ensaio de Respiração Mitocondrial.	178

13.2.3	Medida do Potencial de Membrana	
	Mitocondrial	181
	Referências	183

CAPÍTULO 14

METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

	<i>(Mariana Lopes Grassi e Amanda Tomie Ouchida)</i>	185
14.1	Fundamentação Teórica	185
14.2	Procedimento Experimental	190
14.2.1	Determinação de EROs em Células pela Sonda 5-(e -6) -clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil ester (CM-H ₂ DCF-DA)	190
14.2.2	Níveis de Glutathiona Oxidada (GSSG) e Reduzida (GSH)	192
14.2.3	Peroxidação Lipídica	193
	Referências	195

CAPÍTULO 15

EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA *(Alice Maria de Magalhães*

Ornelas; Renato Graciano de Paula; Enyara Rezende Moraes e Lizandra

	<i>Guidi Magalhães)</i>	199
15.1	Fundamentação Teórica	199
15.1.1	Extração de RNA – Método do Tiocianato de Guanidina-Fenol-Clorofórmio	199
15.1.2	Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA.	200
15.1.3	Síntese de cDNA	202
15.2	Procedimento Experimental	204
15.2.1	Isolamento de RNA em Tecidos (adaptado de SAMBROOK; RUSSEL, 2001)	205
15.2.2	Isolamento de RNA de Células em Cultivo e Células Sanguíneas (adaptado de SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).	207
15.2.3	Protocolo para Corar Bandas em Géis de Agarose	208

15.2.4	Purificação do RNA Total por Tratamento com DNase	209
	Referências	210

CAPÍTULO 16

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE: PRINCÍPIOS GERAIS

	<i>(Renato Graciano de Paula e Leticia Magalhães Arruda)</i>	211
16.1	Fundamentação Teórica	211
16.2	Procedimento Experimental	216
16.2.1	Extração de DNA Genômico de Bactérias Adaptado de Kalia <i>et al.</i> (1999)	216
16.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase	217
	Referências	218

CAPÍTULO 17

PCR EM TEMPO REAL: FUNDAMENTOS PARA A ANÁLISE

	DEEXPRESSÃO GÊNICA <i>(Renato Graciano de Paula; Alice Maria de Magalhães Ornelas e Enyara Rezende Moraes)</i>	221
17.1	Fundamentação Teórica	221
17.1.1	PCR em Tempo Real	221
17.2	Procedimento Experimental	224
17.2.1	Purificação do Produto de PCR	225
17.2.2	Padronização da Concentração dos <i>Primers</i> ..	225
17.2.3	Definição da Concentração Ótima dos <i>Primers</i> ..	227
17.2.4	Confecção de Curva-padrão e Otimização da Concentração Ótima de cDNA	230
17.2.5	Análise dos Dados	237
	Referências	239

CAPÍTULO 18

FUSÃO GÊNICA VIA PCR: *OVERLAP*PCR *(Leticia Magalhães Arruda)*. 241

18.1	Fundamentação Teórica	241
18.2	Procedimento Experimental	244
	Referências	247

CAPÍTULO 19**CLONAGEM GÊNICA E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE**

PROTEÍNAS (<i>Silveli Suzuki Hatano</i>)	249
19.1 Fundamentação Teórica	249
19.1.1 Clonagem Gênica	249
19.1.2 Expressão Heteróloga de Proteínas	251
19.2 Procedimento Experimental	255
19.2.1 Clonagem Gênica	255
19.2.2 Expressão Heteróloga	257
Referências	260

MINICURRÍCULO DOS AUTORES	263
--	------------