

## Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – RMN

O Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear disponibiliza para a comunidade científica o acesso aos equipamentos da instalação e sua equipe realiza consultorias, colaborações, prestações de serviços e treinamentos profissionais.

As propostas podem ser submetidas em fluxo contínuo através do site SAU online. Em caso de dúvidas, o email do laboratório é: [rmn@lnbio.cnpem.br](mailto:rmn@lnbio.cnpem.br).

Os experimentos disponíveis estão focados na determinação de estruturas e propriedades dinâmicas de proteínas, bem como na caracterização de interações proteína-ligante. Também disponibilizamos metodologia para análise de perfil metabólico de amostras biológicas, bem como avaliação de pequenas moléculas e de compostos poliméricos, como ligninas, dentre outros.

A UTILIZAÇÃO DAS INSTALAÇÕES DEVE SER MENCIONADA EM TODAS AS PUBLICAÇÕES, COMO “AGRADECIMENTOS” AO LNBio, CONFORME ESTABELECIDO NO TERMO DE COMPROMISSO DAS PROPOSTAS DE PESQUISA. AS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE QUALQUER PUBLICAÇÃO E TESES DEVEM SER ENVIADAS À COORDENAÇÃO DO LABORATÓRIO.

Recomendações para preparo de amostras:

### - Estrutura de proteínas

As amostras de proteína devem ser trazidas ao laboratório de RMN já expressas e marcadas isotopicamente, a depender do tipo de experimento. Para marcações isotópicas recomendamos a seguinte referência:

Calcium-Binding Protein Protocols: Volume 2: Methods and Techniques: 173 (Methods in Molecular Biology) 28 October 2010 by Hans J. Vogel (Editor) – Capítulo 20, pag 225 – Structure Determination by NMR – Isotope Labeling, Monica X. Li, David C. Corson and Bryan D, Sykes.

### - Interações por STD

Para interações por STD sugerimos ter uma solução de 100 a 500  $\mu$ M de ligante. A proteína deve estar em uma concentração 100 x menor que o ligante. Sugerimos a referência a seguir para uma melhor compreensão do experimento:

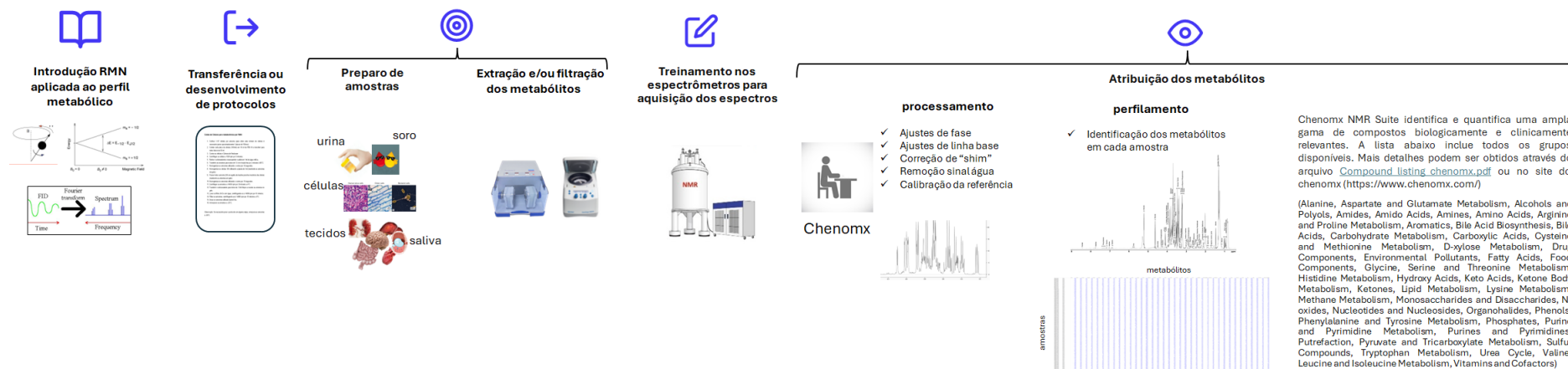
Aldino Viegas, João Manso, Franklin L. Nobrega, and Eurico J. Cabrita, J. Chemical Education. 2011, 88, 990.

### - Configurações estruturais de pequenas moléculas:

Os compostos devem estar puros e dissolvidos em solvente deuterado apropriado. Normalmente, necessitamos de aproximadamente 5 a 20 mg de material, dependendo do tipo de experimento a ser adquirido.

### - Perfil metabólico de amostras biológicas:

Para condução dos experimentos, adotamos o seguinte Pipeline:



1. Inicialmente, marcamos uma reunião com o usuário para entender a proposta e discutirmos sobre o design experimental.
2. Procedemos com uma pequena orientação sobre a Ressonância Magnética Nuclear.
3. Discutimos e auxiliamos no desenvolvimento do melhor protocolo para as amostras a serem analisadas.
4. Instruímos e ajudamos no preparo da amostra, caso haja necessidade.
5. Procedemos e ensinamos os protocolos de aquisição nos espectrômetros.
6. Auxiliamos no processamento e na identificação dos metabólitos, além da criação de planilhas contendo as amostras, metabólitos e concentrações.
7. Trabalhamos com uma biblioteca de metabólitos que pode ser acessada através do link [Compound\\_listing\\_chenomx.pdf](https://www.chenomx.com/) ou no site do chenomx (<https://www.chenomx.com/>).

Possuímos diversos protocolos para os mais diversos tipos de amostras biológicas (soro, urina, tecidos, células, saliva, etc). Os protocolos mais comuns são de Urina e Soro e estão listados abaixo. Para protocolos mais específicos, favor entrar em contato com nossa equipe.

### **Protocolo Urina**

1. Coletar as amostras de urina (5 mL), adicionar 100 uL de azida sódica 0,46% (solução aquosa) e guardar a -80 °C até prosseguir para o item 2.
2. Descongelar as amostras a 4°C e centrifugar a 14000 rpm para remoção de resíduos sólidos (5 a 10 minutos)
3. Separar uma alíquota de 700 a 800 uL da amostra e congelar a -80°C.
4. Trazer a amostra para o Laboratório de RMN do LNBio, separar uma alíquota de 630 uL de urina e adicionar 70 uL de solução tampão fosfato (1M, pH7.4) contendo 5 mM de TSP usado como referência.
5. Centrifugar novamente a solução final (700 uL) a 4000 rpm e analisar por RMN.

### **Protocolo Soro**

1. Lavar filtros da Millipore (Amicon Ultra - Centrifugal Filters – 0.5 mL 3kDa). Esses filtros vêm com glicerol que precisa ser removido antes da filtração do soro da seguinte forma:
  - a. Adicionar 550 µL de H<sub>2</sub>O milli Q em cada filtro.
  - b. Centrifugar por 6 minutos a 13.000 rpm, repetindo este ciclo 7 a 10 vezes.

- c. A cada ciclo, jogar fora a água que permaneceu no filtro e repor a água (há uma marca interna que mostra o nível máximo).
  - d. Dar um spin com o filtro invertido a fim de se eliminar o excesso de água.  
(Obs.: o filtro sempre deve ser mantido úmido para se evitar danos à membrana, por isso, só retire este excesso de água imediatamente antes de se adicionar o soro).
2. Passar estes filtros lavados para eppendorfs novos (estes agora identificados com o nome da amostra que será filtrada).
  3. Filtrar 400 a 500  $\mu\text{L}$  de soro, centrifugando a 13.000 rpm e a 4°C até passar um volume de aproximadamente 300  $\mu\text{L}$ . Esse volume pode demorar de 10 a 50 min. para ser filtrado.
  4. Captar o filtrado e armazenar a -80°C para posterior avaliação por RMN.

- Compostos poliméricos, ligninas, etc:

Os compostos devem estar puros e dissolvidos em solvente deuterado apropriado. Normalmente necessitamos uma faixa de 10 a 40 mg de material dependendo do tipo de experimento a ser adquirido.