

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.

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 Determinatin 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 uM 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.

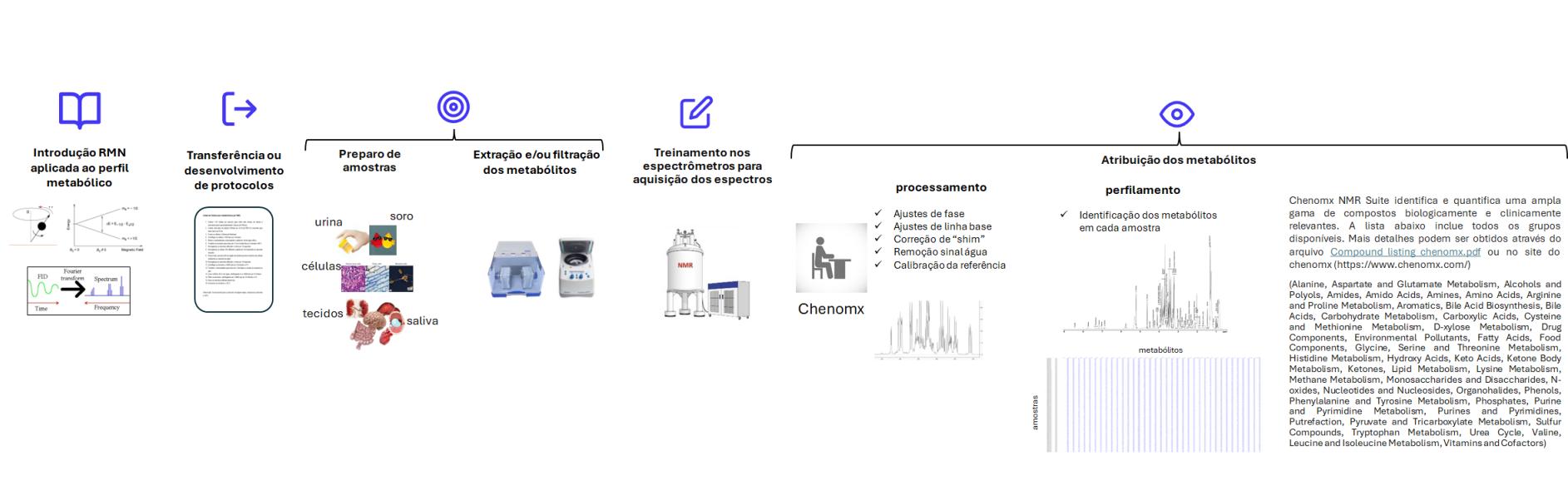
- Configurações estruturais de pequenas moléculas:

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:

METABOLÔMICA



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](#) 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 H₂O 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 µL de soro, centrifugando a 13.000 rpm e a 4°C até passar um volume de aproximadamente 300 µL. 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.