

Recomendações para preparo de amostras e utilização do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC)

Preparo de amostras

- **Pureza:** amostras de alta pureza e homogeneidade são essenciais para o sucesso de experimentos biofísicos. Todas as amostras devem ser purificadas de maneira adequada e centrifugadas antes das medições, salvo casos excepcionais.
- **Estabilidade:** as macromoléculas devem permanecer estáveis nas condições de ensaio. A formação de precipitados compromete a qualidade dos dados e pode danificar os equipamentos. Recomenda-se fortemente verificação antes da realização dos ensaios.
- **Concentração:** a concentração das amostras deve ser determinada com precisão, preferencialmente por medidas de absorbância realizadas no próprio laboratório, a fim de garantir resultados quantitativos confiáveis.
- **Escolha do tampão:** Utilize tampões que não apresentem absorção nas regiões espectrais de interesse e que estejam livres de particulados. Mantenha a mesma composição entre amostras, brancos e controles. Certifique-se de que o tampão seja quimicamente inerte, possua força iônica e pH adequado.
- **Confiabilidade:** é sempre recomendável a realização de triplicatas técnicas para cada condição experimental. A repetição assegura a reprodutibilidade dos resultados e reduz o impacto de variações instrumentais ou eventuais erros de manipulação. Inclua também controles adequados no seu planejamento experimental.
- **Qualquer dúvida** em relação à amostra ou ao experimento, favor entrar em contato por e-mail: lec@lnbio.cnpem.br.

Lista de equipamentos

- Espectropolarímetro J-1500 (JASCO)
- Espectrofotômetro V-730 UV/VIS (Jasco)
- Espectrofluorímetro de Multifrequência K2 (ISS)
- Zetasizer Nano ZS90 (Malvern)
- OMNISEC CHR6000 (Malvern)
- Monolith NT.115 (Nanotemper)
- Tycho NT.6 (Nanotemper)
- MicroCal VP-DSC (Malvern)
- OCTET R2 (Sartorius)

Espectropolarímetro J-1500 (JASCO)



A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) refere-se à absorção diferencial de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, fenômeno que resulta da interação da radiação com moléculas assimétricas. Na região de UV distante (180–250 nm), a técnica fornece informações valiosas sobre a estrutura secundária de proteínas. Já no UV próximo (250–320 nm), permite investigar aspectos da estrutura terciária e quaternária, refletindo o ambiente dos resíduos aromáticos e a presença de pontes dissulfeto. A alta sensibilidade do CD possibilita ainda monitorar os efeitos do meio (pH, força iônica, entre outros), bem como alterações conformacionais e interações moleculares. Adicionalmente, por meio de experimentos com variação de temperatura, é possível determinar a temperatura de melting (T_m) e avaliar a estabilidade térmica de macromoléculas.

No LEC temos dois espectropolarímetros Jasco (sendo um modelo J-810 e outro modelo J-1500), acoplados a *Peltier* e banho térmico e diferentes porta-amstras que podem acomodar de 50 μ L a 2000 μ L de amostra.

Aplicações: Determinação de estruturas e eventos assimétricos, determinação da estrutura secundária de proteínas; avaliação da estrutura terciária de proteínas e ácidos nucleicos; determinação da estabilidade de proteínas e DNA, avaliação da estabilidade térmica e a obtenção de impressões digitais espectrais de macromoléculas.

Dicas para preparo de amostras:

- Proteínas, ácidos nucleicos ou moléculas orgânicas, em concentrações de 5 a 50 μ M, com volumes entre 50 μ L e 2 mL. Soluções proteicas devem apresentar absorbância em 280 nm inferior a 1 unidade, preparada em tampão adequado.
- Recomenda-se o uso de tampão fosfato em uma concentração de 20-50 mM, sendo que o tampão Hepes não é recomendado por absorver luz em comprimentos de onda próximos a 200 nm. Se possível, evite sal, detergentes e aditivos. Se tais aditivos forem imprescindíveis, recomenda-se o uso em baixas concentrações, tais como: EDTA: < 1 mM; Sais: < 50 mM; Detergentes: menor concentração possível e desde que não absorvam nos comprimentos de onda utilizados para a análise.
- Alguns reagentes críticos, como DTT, β -mercaptoetanol e imidazol, apresentam absorção de luz e, por isso, não devem estar presentes nas amostras submetidas a experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular.

Sugestão de turnos por experimento:

Em média, um turno para até 10 amostras para obtenção de espectros e um turno por amostra para realização de experimentos de desnaturação térmica.

Espectrofotômetro V-730 UV/VIS (Jasco)



O espectrofotômetro UV-Vis mede a absorção e transmitância de moléculas em solução. Para sua utilização, é necessário que a amostra contenha um cromóforo solubilizado em tampão adequado, que não interfira no processo de absorção. Este instrumento é amplamente empregado na determinação da concentração de macromoléculas, explorando tanto as propriedades intrínsecas de proteínas e ácidos nucleicos quanto ensaios colorimétricos. Além disso, é utilizado em estudos cinéticos de interações moleculares. O equipamento disponível no LEC é um espectrofotômetro Jasco V-730, com feixe duplo, que cobre os comprimentos de onda de 190 a 800nm, acoplado a banho térmico e com porta amostras que variam de 80 μ L a 2 mL de capacidade. Este equipamento não se encontra no site da SAU online, sendo utilizado como apoio para outras técnicas. Para utilizá-lo, entre em contato conosco.

Aplicações: Quantificação de proteínas, ácidos nucleicos em outras macromoléculas, monitoramento da cinética reacional e análise de pureza de soluções.

Dicas para preparo de amostras:

- Evite utilizar altas concentrações de sais ou aditivos, como detergentes e β -mercaptoetanol, pois esses componentes podem alterar os perfis de absorção da molécula de interesse. Caso seja indispensável o uso desses aditivos para garantir a estabilidade da solução, recomenda-se empregá-los em concentrações mínimas.
- A absorbância das soluções deve ser inferior a 1,0 unidade de absorbância no comprimento de onda analisado, de modo a atender às condições da Lei de Lambert-Beer. Soluções com absorbância acima desse limite devem ser devidamente diluídas antes da realização das medidas.

Sugestão de turnos por experimento:

O número de turnos dependerá do tipo de experimento que será realizado.

Espectrofluorímetro de Multifrequência K2 (ISS)



A espectroscopia de fluorescência baseia-se na excitação de elétrons por um feixe de luz, geralmente ultravioleta, que promove a absorção de radiação em determinado comprimento de onda; ao retornarem ao estado fundamental, os elétrons liberam parte da energia absorvida na forma de luz emitida em comprimentos de onda característicos. Trata-se de uma técnica amplamente empregada para investigar a conformação, a dinâmica e as interações de macromoléculas biológicas. Por meio da fluorescência, é possível monitorar alterações estruturais decorrentes de mudanças no ambiente, como variações de pH, temperatura ou presença de ligantes, refletidas no comportamento dos fluoróforos intrínsecos ou extrínsecos. Para usar a fluorescência é necessária uma solução com um fluoróforo, solubilizado em um tampão que não interfira no processo de absorção e emissão de luz. No LEC dispomos de um fluorímetro ISS-K2 acoplado a um banho térmico, polarizadores, monocromadores, diferentes filtros e porta-amostras (para volumes entre 250 μ L a 2 mL), possibilitando ampla gama de desenhos experimentais.

Aplicações: Ensaios de fluorescência intrínseca, investigação da estrutura terciária de proteínas, Avaliação de hidrofobicidade de proteínas, avaliação da estabilidade química e térmica, estudo de interações macromoleculares, experimentos de polarização de fluorescência, Realização de experimento de FRET, análise cinética entre outras.

Dicas para preparo de amostras:

- Proteínas, ácidos nucleicos ou moléculas orgânicas, em concentrações de 5 a 50 μ M, com volumes entre 50 μ L e 2 mL.
- Antes de iniciar o experimento, deverá ser realizado um espectro da amostra e da solução “branco”, para verificar possíveis absorções da amostra e o comprimento de onda de excitação e emissão que será usado.
- Sais, detergente, aditivos como DTT, β -Mercaptoetanol, imidazol podem absorver luz em solução, nos comprimentos de onda de análise, atrapalhando as medidas.

Sugestão de turnos por experimento:

O número de turnos dependerá do tipo de experimento que será realizado.

Zetasizer Nano ZS90 (Malvern)



O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), também conhecido como Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS), é uma técnica amplamente utilizada para determinar o tamanho de partículas em solução. Entre os principais parâmetros obtidos destacam-se o raio hidrodinâmico, que fornece informações sobre o tamanho molecular e o estado oligomérico, e o índice de polidispersividade, que reflete a qualidade da amostra por meio da identificação das diferentes populações presentes em solução. Além disso, o DLS é uma ferramenta essencial para avaliar a estabilidade e a homogeneidade de amostras antes de experimentos específicos, como cristalização de proteínas. No LEC está disponível o equipamento ZetaSizer Nano ZS90, para realização de medidas de DLS em cubetas (a partir de 20 μL de amostra), para soluções com concentrações superiores a 0,1 mg/mL e faixa de tamanho de 0,3 nm à 5 μm . Este equipamento permite ainda a medida de potencial zeta, em cubetas com volume médio de 1 mL.

Aplicações: Determinação de parâmetros hidrodinâmicos de macromoléculas, avaliação de homogeneidade de amostras, medições de potencial zeta e realização de controle de qualidade.

Preparo de amostras:

- Concentrações proteicas entre 0,5 e 1 mg/mL são adequadas para o início dos experimentos. Para proteínas de menor tamanho, podem ser necessárias concentrações mais altas para obter boas leituras.
- É fundamental remover partículas indesejadas da amostra, pois elas podem dispersar luz e comprometer os resultados. Recomenda-se realizar a centrifugação ou a filtração da amostra, conforme as especificações de cada caso

Sugestão de turnos por experimento:

Uma amostra é medida em até 15 minutos.

OMNISEC CHR6000 (Malvern)



A cromatografia de exclusão molecular (SEC), quando acoplada a detectores de espalhamento de luz em múltiplos ângulos (MALS) e de índice de refração (RI), constitui uma técnica analítica de alta precisão para a caracterização de macromoléculas em solução. Esse arranjo permite determinar parâmetros absolutos como massa molecular, distribuição de peso molecular, raio hidrodinâmico e viscosidade intrínseca, sem a necessidade de calibração com padrões. A abordagem integrada possibilita avaliar a homogeneidade e o estado oligomérico de proteínas, além de investigar modificações estruturais, interações intermoleculares e processos de agregação. Suas aplicações abrangem desde o desenvolvimento de biofármacos e o controle de qualidade de proteínas até a caracterização de polímeros sintéticos e naturais. O equipamento disponível no LEC não possui detector UV, mas permite a detecção de amostras por meio de um detector de índice de refração e espalhamento de luz. Conta com sistema de injeção automatizada e porta-amostras climatizado, possibilitando a programação de diferentes condições experimentais, como variação de concentração, força iônica e presença de aditivos. Para as análises, a coluna padrão utilizada é a Superdex 200 Increase 10/300 (Cytiva). Todos os experimentos realizados neste equipamento são realizados pela equipe técnica do LEC.

Aplicações: Determinação do peso molecular absoluto de macromoléculas; análise da distribuição de pesos moleculares; caracterização do tamanho e do grau de ramificação de polímeros; determinação do raio hidrodinâmico de macromoléculas; e avaliação do equilíbrio de oligomerização de proteínas.

Preparo de amostras:

- Para cada corrida são injetados 100 μ L de amostra, com concentração mínima recomendada de 2 mg/mL. É fundamental que as amostras apresentem elevado grau de pureza e estabilidade, a fim de evitar danos ao sistema e garantir a qualidade das medições. A amostra será centrifugada 14 krpm/10 min antes de cada experimento, salve exceções.
- Amostras que possuam mais de uma espécie poderão resultar em determinações imprecisas, caso tais espécies não sejam bem resolvidas na coluna utilizada. Além disso, amostras com coloração podem introduzir desvios nas análises.
- O tampão de corrida deve ser o mesmo tampão da amostra, recomenda-se a realização de uma etapa de diálise. É necessário que o usuário no dia do experimento forneça 1 litro de tampão, filtrado 0,22 μ m. O uso de glicerol no tampão de corrida limita-se à concentração máxima de 5%.

Sugestão de turnos por experimento:

Em média, 1 semana por conjunto de amostras.

Monolith NT.115 (Nanotemper)



A termoforese em microescala (MST) é uma técnica utilizada para quantificar interações biomoleculares, sem a necessidade de imobilização. O instrumento MST detecta o movimento de moléculas fluorescentes ao longo de um gradiente microscópico de temperatura, que reflete mudanças na camada de hidratação molecular, carga ou tamanho. Suas aplicações abrangem desde a análise de ligações de pequenas moléculas até interações proteína-proteína e a formação de complexos multiprotéicos.

O Monolith NT.115, disponível no LEC, utiliza capilares para a realização dos ensaios. Cada experimento requer uma concentração fixa da molécula fluorescente (por exemplo, uma proteína marcada) e concentrações variáveis do titulante (como proteínas ou ligantes). As curvas experimentais podem ser obtidas com apenas 20 μL de amostra por capilar, permitindo a análise de até 16 capilares por ensaio. O sistema dispõe ainda de um software dedicado para processamento e análise dos dados. O agendamento do uso deste equipamento deve ser feito por meio da plataforma SAU Online e os consumíveis deverão ser consultados com a equipe LEC.

Aplicações: Determinação de interações biomoleculares em uma ampla faixa de afinidades. Ele permite a determinação de constantes de dissociação (K_d) entre proteínas, RNA, DNA e pequenas moléculas.

Preparo de amostras:

- O experimento requer aproximadamente 100 nM do analito marcado (proteína, DNA ou RNA) e uma faixa de concentração do ligante que cubra valores em torno do K_d (tipicamente 0,01 a $20 \times K_d$)
- As opções de marcação incluem acoplamento via NHS, tiol ou His-tag. Cada capilar utiliza 20 μL de amostra, e um experimento completo geralmente demanda mais de 26 capilares (2 para verificação inicial de fluorescência, 8 para verificação de ligação e 16 para uma série de titulações). É comum a necessidade de otimização para definir as condições mais adequadas.

Sugestão de turnos por experimento:

Em média, um turno por amostra.

Tycho NT.6 (Nanotemper)



Fluorimetria de Varredura Diferencial em Microescala (nanoDSF) combina fluorescência intrínseca e desnaturação térmica para a caracterização de proteínas. Nesse método, a amostra é inserida em capilares e submetida a aquecimento controlado entre 35–95 °C, enquanto a emissão dos resíduos de triptofano e tirosina é monitorada nos comprimentos de onda de 330 e 350 nm. A razão entre esses sinais permite determinar a temperatura de inflexão (T_i), parâmetro que reflete a transição associada ao processo de desnaturação proteica. A comparação das T_i obtidas em diferentes condições experimentais (como na presença de ligantes, tampões ou aditivos) permite identificar moléculas capazes de interagir com a proteína, avaliar quais sistemas tamponantes ou aditivos aumentam sua estabilidade, além de verificar a similaridade entre diferentes lotes de amostras. O equipamento disponível no LEC permite a análise de até 6 capilares concomitantemente, levando cerca de 3-5 minutos por experimento.

Aplicações: Avaliação da estabilidade térmica, estudo das interações proteína/ligante, triagem de compostos, controle de qualidade de proteínas e determinação das condições ideais de tampão, pH, força iônica e temperatura para trabalho e armazenamento.

Preparo de amostras:

- Por se tratar de um sistema que realiza as medidas de fluorescência baseadas nos resíduos de triptofano e tirosina, é mandatória a existência de tais resíduos nas amostras. Quanto mais resíduos de triptofano e tirosina presentes na amostra, menor será a concentração necessária para realização do experimento. Para moléculas padrão (IgG, por exemplo), a faixa de concentração adequada fica entre 0,010 à 1,0 mg/mL.
- O tampão e moléculas, que poderão ser adicionadas à solução proteica, não podem ter componentes que interfiram com o processo de fluorescência.

Sugestão de turnos por experimento:

10 minutos para até 6 amostras.

MicroCal VP-DSC (Malvern)



A Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) mede as variações de calor associadas ao aumento ou diminuição da temperatura de uma amostra. Em solução, biomoléculas encontram-se em equilíbrio entre os estados nativo e desnaturado. À medida que a temperatura se eleva, o estado desnaturado tende a ser favorecido, permitindo a determinação da temperatura de transição média (T_m), ponto em que 50% das moléculas estão no estado nativo e 50% no desnaturado. Quanto maior o valor da T_m , maior é a estabilidade da macromolécula. O DSC é amplamente utilizado para avaliar a estabilidade de biomoléculas em diferentes condições experimentais ou após tratamentos específicos, além de permitir a determinação da variação na capacidade térmica de desnaturação (ΔC_p). A técnica também contribui para elucidar fatores como interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e entropia conformacional. O LEC dispõe de um calorímetro VP-DSC Microcal, o qual só permite a análise de amostras em solução.

Aplicações: Determinação dos fatores termodinâmicos envolvidos no enovelamento e na estabilidade de macromoléculas, sem a necessidade de marcação ou imobilização.

Preparo de amostras:

- Concentrações típicas de amostra variam entre 0,1 e 10 mg/mL, com volume requerido de aproximadamente 700 μ L para as celas de amostra e de referência."
- As macromoléculas devem ser dialisadas no mesmo tampão utilizado no experimento. Esse tampão deve ser empregado também na cela de referência e em todas as diluições subsequentes. Caso haja risco de formação de agregados, recomenda-se centrifugar ou filtrar a amostra previamente.
- Não é recomendada a utilização de tampão Tris (ou outros contendo aminas primárias) em experimentos de DSC. Como alternativa, deve-se optar por tampões com baixa dependência do pKa em relação à temperatura.
- Aditivos como DTT e TCEP devem ser evitados nas amostras, podendo ser substituídos por β -mercaptoetanol.

Sugestão de turnos por experimento:

Em média, um turno por amostra.

OCTET R2 (Sartorius)



A Interferometria de Biocamadas (BLI) é uma técnica óptica baseada na detecção de alterações no padrão de interferência da luz branca refletida na superfície de um biossensor. Nesse sistema, uma molécula é imobilizada na ponta do sensor, que é então mergulhado em soluções contendo a molécula parceira. A ligação ou dissociação de biomoléculas na extremidade do sensor provoca mudanças mensuráveis na espessura da camada biológica, registradas em tempo real como variações no padrão de interferência. Essa abordagem permite determinar tanto os parâmetros de afinidade (KD) quanto taxas cinéticas de associação (ka) e dissociação (kd), sem necessidade de marcadores fluorescentes. A tecnologia "Dip and Read" elimina a necessidade de sistemas microfluídicos complexos, tornando o método robusto, versátil e compatível com diferentes tipos de amostras, incluindo lisados celulares. No LEC disponibilizamos de um equipamento de 2 canais.

Aplicações: Caracterização de interações proteína-proteína, proteína-DNA/RNA, proteína-peptídeo e proteína-pequenas moléculas. Suas aplicações vão desde a triagem de anticorpos e bibliotecas de fragmentos até estudos de desenvolvimento de biofármacos, análises em ensaios clínicos avançados e controle de qualidade em processos de fabricação.

Preparo de amostras:

- A molécula a ser imobilizada deve estar em concentração adequada para recobrir de forma eficiente o sensor. Tipicamente, 10–50 µg/mL é suficiente, dependendo da química de captura (Protein A, Ni-NTA, Streptavidina, entre outros).
- O Octet R2 utiliza microplacas padrão de 96 poços. Normalmente, são necessários 200 µL por poço para assegurar a correta imersão dos sensores.
- O analito (molécula em solução que interage) deve ser preparado em faixa de concentrações que cubra de 0,01 a 20 × KD estimado, permitindo a construção de curvas de ligação e dissociação confiáveis.
- Frequentemente são usados aditivos como Tween-20 (0,005–0,05%) para reduzir adsorção não específica e BSA (0,1 mg/mL) para bloqueio.

Sugestão de turnos por experimento:

Em média, um turno por amostra.