

AMGEN® Biotech Experience

Descoberta científica na sala de aula
Brasil

FUNDAMENTOS DA BIOTECNOLOGIA



SEQUÊNCIA DE ENGENHARIA GENÉTICA RESUMIDA

Guia do Professor

www.amgenbiotechexperience.com

AMGEN® Foundation

AGRADECIMENTOS

A fundação Amgen Foundation e o Education Development Center (EDC) agradecem à equipe do programa Amgen Biotech Experience (ABE), aos educadores revisores e aos educadores-piloto por suas valiosas sugestões e considerações: Tracy Bailey-Gates, Tara Bennett Bristow, Ann Cortina, Anu Deshpande, Carol Fujita, Anne Gundry, Martin J. Ikkanda, Wendie Johnston, Mary Liu, Grace Montgomery, Alia Qatarneh, Todd Ryan, Christina Schramm, Lisa Sequeira, Karin Steinhauer, Karen Stephens, Sherry Tsai, David Upegui, Amy Welch, Wendy Wooten e Jo Wu.

Agradecemos também à empresa Takara Bio USA, Inc. e à Universidade da Califórnia San Diego, que permitiram o uso do gene fluorescente vermelho *tdTomato* neste programa.

Por fim, queremos expressar nossa gratidão às equipes anteriores e atuais da Amgen, cujo comprometimento e valiosas contribuições permitiram que o programa permanecesse relevante e alinhado com as práticas atuais do setor.

HISTÓRIA DO PROGRAMA

OS PIONEIROS DO AMGEN BIOTECH EXPERIENCE

“Os pioneiros abrem o caminho para as gerações futuras.”

— Autor desconhecido

Embora o programa Amgen Biotech Experience alcance quase 100 mil estudantes e 1500 educadores todos os anos, seu início foi despretensioso. Tudo começou com um grupo de cientistas e educadores que compartilhavam a paixão por transmitir seu conhecimento aos estudantes.

Em 1989, o biólogo molecular Bruce Wallace, o diretor-executivo científico Steve Elliott (hoje aposentado) e outros colaboradores da Amgen acreditaram que a empresa poderia ser um instrumento para o desenvolvimento profissional de educadores das escolas de Ensino Médio locais, a fim de aprimorar o ensino da ciência. Eles convidaram os educadores de Biologia para participar de um programa de estágio no verão.

Curioso, Hugh Nelson, educador de uma escola de Ensino Médio na cidade de Thousand Oaks, Califórnia, EUA, aceitou o convite. Nelson começou a aprender os procedimentos utilizados pela Amgen para desenvolver produtos biológicos e trabalhou com um cientista da Amgen para ajustar uma série de atividades de laboratório para estudantes do Ensino Médio. A Amgen concordou em fornecer os equipamentos e os componentes químicos para ensinar os procedimentos de laboratório nas escolas de Ensino Médio locais.

Dois anos depois, a Amgen lançou o programa escolar oficial nas escolas do Condado de Ventura, Califórnia, EUA. Nos dois primeiros anos após o lançamento, 1300 estudantes de 12 escolas locais participaram do programa.

“As atividades de laboratório colocam os estudantes em contato com a realidade da ciência moderna”, afirma Nelson. “Precisamos de dinheiro para fazer experimentos e a Amgen financiou esse programa importante e transformador. Meu fascínio pelo programa continua o mesmo desde 1989.”

Em 1999, Marty Ikkanda, professor universitário de Ciências Biológicas, da faculdade Pierce College, em Woodland Hills, Califórnia, EUA, foi convidado para revisar o currículo do programa e deixá-lo parecido com suas aulas da faculdade. O programa revisado foi lançado em 20 escolas no ano letivo seguinte, alcançando 30 escolas até o final do ano.

“Os educadores relatam não haver problemas de faltas nas atividades de laboratório de biotecnologia da Amgen”, afirma Ikkanda, que se aposentou do programa em 2013. “É uma forma fantástica de promover o interesse dos estudantes pela ciência.”

Em 2005, com o aumento do interesse dos educadores de Biologia de outras comunidades, a Amgen Foundation, o principal braço filantrópico da Amgen, firmou parceria com o Professor Ikkanda para expandir o programa. Por muitos anos, o programa foi levado a novas comunidades da Amgen nos Estados Unidos e na Europa.

Em 2013, a Amgen Foundation uniu forças com o Education Development Center, uma organização sem fins lucrativos com vasta experiência no ensino da ciência, para abrir um escritório com o objetivo de apoiar e fortalecer o programa. O programa continuou se expandindo por novas comunidades da Amgen em todo o mundo.

Uma colaboração que começou há quase trinta anos inspirou o compromisso contínuo de cientistas e educadores de compartilhar seu conhecimento e paixão pela ciência. A Amgen Foundation tem orgulho de continuar apoiando um programa que está mais forte do que nunca, preparado para levar a biotecnologia do mundo real a uma nova geração de educadores e estudantes. “Esse espírito pioneiro é o que distingue a Amgen”, declara Eduardo Cetlin, presidente da Amgen Foundation. “Seremos eternamente gratos aos colaboradores que estiveram conosco no início, firmando as raízes desse programa poderoso.”

Acesse o site da ABE em www.amgenbiotechexperience.com.

ÍNDICE

VISÃO GERAL DO CURRÍCULO	8
Introdução	8
Conteúdo do currículo do programa ABE	9
Visão geral do conteúdo	11
Relações com o currículo de ciências biológicas	13
Relações com os padrões acadêmicos	14
Conhecimento e habilidades prévias	21
Avaliação do aprendizado do estudante	21
Segurança de laboratório	22
Preparação de materiais	24
Informações adicionais de ensino	34
INTRODUÇÃO AO PROGRAMA	37
Visão geral	38
Preparação	39
Metodologia de ensino	39
Sessão 1	39
Sessão 2	40
CAPÍTULO 1: ALGUMAS FERRAMENTAS DA ÁREA	42
Visão geral	43
Preparação	45
Metodologia de ensino	49
Sessão 1	49
Sessão 2	53
Conhecimento científico: Movimento dos corantes na eletroforese em gel	57
Sessão 3 (opcional)	58

CAPÍTULO 2A: COMO COMEÇAR A CLONAR UM GENE	61
Visão geral	62
Preparação	64
Metodologia de ensino	66
Sessão 1	66
Conhecimento científico: por que incluir bacterianos nos plasmídeos?	69
Sessão 2 (opcional)	69
Sessão 3	71
Conhecimento científico: enzimas de restrição	72
Sessão 4	73
Conhecimento científico: os componentes do plasmídeo pARA-R	78
CAPÍTULO 4A: COMO CONFIRMAR QUE VOCÊ TEM UM PLASMÍDEO RECOMBINANTE	80
Visão geral	81
Preparação	82
Metodologia de ensino	86
Sessão 1	86
Sessão 2	88
Sessão 3	92
CAPÍTULO 5A: COMO INSERIR PLASMÍDEOS RECOMBINANTES NAS BACTÉRIAS	95
Visão geral	96
Preparação	98
Metodologia de ensino	100
Sessão 1	100
Conhecimento científico: o dogma central da biologia molecular e a transcriptase reversa	102
Sessão 2	104
Sessão 3	110

CAPÍTULO 6: COMO CONSEGUIR O QUE PRECISAMOS	113
Visão geral	114
Preparação	116
Metodologia de ensino	119
Sessão 1	119
Sessão 2 (opcional)	121
Conhecimento científico: insulina recombinante	125
Sessão 3	125
ANEXOS	128
Laboratório 1.3: como examinar a precisão de uma micropipeta	130
Vamos clonar o gene: diagrama do plasmídeo	131
Vamos clonar o gene: sequência do DNA humano	132
Laboratório 4A: diagrama da escada de DNA	133
Previsões do crescimento bacteriano	134
APÊNDICE À EDIÇÃO BRASILEIRA	135

VISÃO GERAL DO CURRÍCULO

INTRODUÇÃO

Integrar o programa Amgen Biotech Experience (ABE) em suas aulas é uma oportunidade única e valiosa para você e seus alunos. O material desta seção oferece recursos para promover o conhecimento científico e a prática dos estudantes, além de apontar o modo como ele é aplicado no mundo real. Você vai trabalhar os três pilares do currículo: o quê?, por quê? e como?, ou seja, conteúdo de ciências, princípios e práticas de ensino e aprendizagem e considerações práticas para implementar o curso. A leitura desta seção, antes de começar, vai aprimorar o seu ensino, proporcionando uma melhor experiência de aprendizagem aos estudantes.

Os laboratórios do programa ABE reproduzem algumas das etapas importantes realizadas pela indústria da biotecnologia farmacêutica na fabricação de medicamentos (proteínas terapêuticas) para o tratamento de várias doenças. A biotecnologia fornece as ferramentas e técnicas para a pesquisa farmacêutica moderna e o desenvolvimento de fármacos, por isso é essencial que os futuros cidadãos tenham conhecimento dessa área. Técnicas de biotecnologia comuns são empregadas para desenvolver uma ampla variedade de produtos, incluindo a insulina (que salva vidas), uma enzima que aumenta as vitaminas do arroz e até uma vacina para humanos expressa em uma planta. Os laboratórios se concentram nessas técnicas para que os estudantes compreendam melhor as ferramentas da biotecnologia e comecem a pensar no impacto potencial dessa indústria em nosso futuro. Além disso, a participação neste programa pode deixar os estudantes mais motivados a entender conceitos científicos e, eventualmente, até se tornarem cientistas.

As experiências de laboratório deste programa são de extrema importância no ensino da ciência, porque oferecem oportunidades de tornar a ciência “real” e relevante para os estudantes, além de permitir que eles utilizem ferramentas e técnicas profissionais da biotecnologia para explorar questões científicas.

Experiências de laboratório eficazes podem:

- aumentar a compreensão dos estudantes sobre os conteúdos e conceitos científicos fundamentais;
- ajudar os estudantes a desenvolver habilidades científicas e o raciocínio lógico;
- aumentar a compreensão dos estudantes acerca da complexidade e da ambiguidade na pesquisa científica;
- permitir que os estudantes desenvolvam habilidades acadêmicas, interpessoais e intrapessoais importantes para ter sucesso no futuro, inclusive resolução de problemas, pensamento crítico e trabalho em equipe.

CONTEÚDO DO CURRÍCULO DO PROGRAMA ABE

Na Sequência de engenharia genética resumida, os estudantes trabalham com uma molécula de DNA recombinante, que é uma combinação de elementos genéticos procarióticos e eucarióticos. O componente procariótico é composto de um plasmídeo bacteriano modificado e seus elementos de controle: origem da replicação, gene de resistência à ampicilina e o operon arabinose. Já o elemento eucariótico é um gene da anêmona-do-mar, *Discosoma sp.* O gene codificador dessa proteína é chamado de gene da proteína fluorescente vermelha (rfp, do inglês red fluorescent protein). O gene rfp codifica a proteína fluorescente mutante, PFM, uma molécula extensivamente usada em pesquisas (observe que a proteína PFM é chamada de RFP no Guia do Estudante).

Depois que os estudantes aprendem sobre o plasmídeo de DNA recombinante, eles o utilizam para transformar a *Escherichia coli* (*E. coli*). As células transformadas são espalhadas sobre a superfície de uma placa de ágar com ampicilina e arabinose, um monossacarídeo formado por cinco carbonos necessários para a expressão do gene rfp. As colônias de bactérias que expressam o gene rfp vão ter uma cor vermelha (ou rosa brilhante). Se os estudantes forem realizar o Laboratório 6, opcional, as células de uma dessas colônias vermelhas serão transferidas para uma cultura em um meio líquido e as células serão colhidas e lisadas (destruídas) para liberar a proteína fluorescente vermelha (RFP) na solução. Essa solução será fracionada em uma coluna de cromatografia e a RFP será purificada (separada) das outras proteínas presentes no lisado celular com base na hidrofobicidade.

O processo de produção de uma proteína terapêutica humana é muito semelhante, embora as colônias de bactérias recombinantes não possam ser identificadas pela expressão de RFP. Ao produzir uma proteína terapêutica humana, é necessária outra etapa: as colônias que crescem na placa com ampicilina precisam ser cultivadas em uma placa com outro antibiótico, a tetraciclina. O gene da tetraciclina é rompido quando o gene humano é introduzido, e as bactérias das colônias recombinantes não vão sobreviver na placa com tetraciclina. As células das colônias que não são capazes de sobreviver nas placas de tetraciclina serão cultivadas e lisadas para liberar a proteína terapêutica humana, que será purificada¹.

Ao completar a sequência de aulas da ABE, os estudantes terão uma compreensão mais clara de como usar as técnicas do DNA recombinante para introduzir novos genes em um organismo e fazê-lo produzir novas proteínas. O uso de um gene de uma anêmona-do-mar para expressar a proteína fluorescente vermelha mostra como o mesmo processo pode ser usado com um gene humano para produzir proteínas para uso terapêutico, como a insulina ou o hormônio do crescimento.

O programa ABE inclui muitas sequências de laboratórios para abordar uma variedade de situações em sala de aula. Nas quatro sequências, os estudantes fazem a leitura introdutória e o primeiro conjunto de atividades de laboratório. A **Tabela VG.1**, a seguir, apresenta cada uma das sequências de laboratórios do ABE.

¹ N do E: Essa dinâmica é possível, pois apenas uma amostra das bactérias da colônia é transposta para a placa com tetraciclina. Se essas células morrerem, é sinal de que a colônia original contém o gene humano e são as células dessa colônia original que serão cultivadas e, posteriormente, lisadas.

Tabela VG.1: Possíveis sequências de laboratórios ABE e conteúdo trabalhado em cada uma

Sequência	Conteúdo	Nº de sessões
Sequência de engenharia genética resumida (16 a 18 sessões)	Introdução: os estudantes leem sobre as indústrias da biotecnologia e biofarmacêutica.	2
	Laboratório 1: os estudantes aprendem a usar duas ferramentas de laboratório básicas da biotecnologia: micropipetas e eletroforese em gel	2 a 3
	Laboratório 2A: os estudantes aprendem como os plasmídeos são criados. No laboratório, os estudantes usam enzimas de restrição para criar fragmentos de DNA com o gene <i>rfp</i> .	3 a 4
	Laboratório 4A: os estudantes verificam se têm o plasmídeo recombinante correto.	3
	Laboratório 5A: os estudantes transformam a bactéria usando o plasmídeo recombinante e, em seguida, cultivam a bactéria transformada.	3
	Laboratório 6 (opcional): os estudantes extraem e purificam a proteína produzida na bactéria pelo gene <i>rfp</i> .	3
Sequência de engenharia genética completa (18 a 20 sessões)	Introdução: os estudantes leem sobre as indústrias da biotecnologia e biofarmacêutica.	2
	Laboratório 1: os estudantes aprendem a usar duas ferramentas de laboratório básicas da biotecnologia: micropipetas e eletroforese em gel	2 a 3
	Laboratório 2: os estudantes aprendem como os plasmídeos são criados. No laboratório, eles produzem um plasmídeo com o gene <i>rfp</i> .	3 a 4
	Laboratório 3: os estudantes ligam o plasmídeo.	2
	Laboratório 4: os estudantes verificam se têm o plasmídeo recombinante correto.	3
	Laboratório 5: os estudantes transformam a bactéria usando o plasmídeo recombinante e, em seguida, cultivam a bactéria transformada.	3
	Laboratório 6 (opcional): os estudantes extraem e purificam a proteína produzida na bactéria pelo gene <i>rfp</i> .	3
Foco na sequência de bactérias (12 a 14 sessões)	Introdução: os estudantes leem sobre as indústrias da biotecnologia e biofarmacêutica.	2
	Laboratório 1: os estudantes aprendem a usar duas ferramentas de laboratório básicas da biotecnologia: micropipetas e eletroforese em gel	2 a 3
	Laboratório 5B: os estudantes aprendem como os plasmídeos são criados. No laboratório, eles adicionam um plasmídeo com o gene <i>rfp</i> à bactéria, criando um organismo geneticamente modificado. Eles cultivam a bactéria.	5 a 6
	Laboratório 6 (opcional): os estudantes extraem e purificam a proteína produzida na bactéria pelo gene <i>rfp</i> .	3
Introdução à sequência de biotecnologia (4 a 5 sessões)	Introdução: os estudantes leem sobre as indústrias da biotecnologia e biofarmacêutica.	2
	Laboratório 1: os estudantes aprendem a usar duas ferramentas de laboratório básicas da biotecnologia: micropipetas e eletroforese em gel.	2 a 3

SUGESTÕES DE TEMPO PARA ENSINO DA ABE

Dado o curto período de tempo que você pode ficar com o kit, concluir a sequência completa dos laboratórios ABE durante esse período pode ser desafiador. Uma dica: com a Sequência de engenharia genética resumida, opte por concluir a Introdução ao programa antes de receber o kit.

VISÃO GERAL DO CONTEÚDO

A seção Visão geral do currículo descreve o conteúdo científico do currículo que deve ser idealmente trabalhado com os estudantes durante o programa ABE. Pode ser que você receba o kit em um período no qual esteja ensinando outro conteúdo (de ecologia ou evolução, por exemplo) ou que você use essas atividades de laboratório com outros cursos além de Biologia. Por isso, é muito importante contextualizar e estabelecer relações com o currículo de Ciências durante as experiências de laboratório.

IDEIA PRINCIPAL

As proteínas codificadas pelo DNA são responsáveis pelos traços dos seres vivos:



PERGUNTA PRINCIPAL

Qual é a relação entre os genes, as proteínas e as características de um organismo?

PERGUNTAS SECUNDÁRIAS

1. Como a expressão de um gene resulta nas características de um organismo?
2. Qual é a relação entre as proteínas e as características?
3. Como as informações são codificadas no DNA?
4. Como essas informações são decodificadas?
5. Qual é o produto da mensagem decodificada?
6. Como esse produto resulta em características?
7. Quais são as consequências para um organismo se o produto for alterado ou não for gerado?
8. Como os organismos podem ser modificados para fabricar produtos proteicos diferentes e adquirir novas características?

OBJETIVOS DE APRENDIZAGEM

- Entender que todas as informações necessárias para que os organismos se mantenham vivos são codificadas no arranjo dos nucleotídeos em seu DNA.

- Entender que a codificação e decodificação do DNA é a mesma em todos os organismos, o que possibilita a expressão de um gene humano por uma bactéria.
- Entender que os processos de transcrição e tradução facilitam a transferência de informações do DNA para as proteínas.
- Entender que as características dos organismos são determinadas pela expressão de genes específicos no DNA.
- Entender como a expressão gênica é regulada.
- Entender como as funções proteicas são responsáveis pelas características de um organismo.
- Reconhecer que uma mudança na sequência do DNA pode alterar a função de uma proteína e, conseqüentemente, as características de um organismo.
- Compreender como as bactérias podem ser modificadas geneticamente para fabricar novos produtos.
- Entender a relação recíproca entre a pesquisa científica básica e o desenvolvimento tecnológico: compreender que as descobertas dos plasmídeos, das enzimas de restrição e das ligases em pesquisas básicas levaram à criação das ferramentas e técnicas da biotecnologia. Por sua vez, as ferramentas e técnicas da biotecnologia estão permitindo que os cientistas se aprofundem nas pesquisas sobre os genes e a função dos produtos deles na célula.
- Compreender a importância do uso de controles nas investigações científicas.

RESULTADOS DA APRENDIZAGEM

Depois de concluir o programa, os estudantes serão capazes de:

- Descrever a relação entre o DNA, os genes, as proteínas e as características ou traços.
- Explicar como as informações são transferidas do DNA para as proteínas por meio dos processos de transcrição e tradução.
- Explicar como a expressão dos genes em uma célula determina os traços de um organismo.
- Descrever como as características dos organismos (traços) resultam da atividade proteica.
- Descrever como a perda ou o ganho de função proteica pode alterar os traços de um organismo.
- Discutir como os organismos podem ser geneticamente modificados para adquirir novos traços.
- Descrever a função das ferramentas biológicas, como os plasmídeos, enzimas de restrição e DNA ligase, no processo de engenharia genética.
- Fornecer exemplos de como a engenharia genética pode ser usada para resolver problemas médicos.
- Mostrar o processo de produção de um plasmídeo recombinante.

RELAÇÕES COM O CURRÍCULO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

A seguir, apresentamos algumas sugestões de onde integrar adequadamente os laboratórios ABE ao fluxo conceitual das aulas de Ciências.

Capítulo 1	Relações com o currículo	Conteúdo
1	Habilidades de laboratório	<ul style="list-style-type: none">• Uso de micropipetas• Uso da eletroforese em gel
2A	<ul style="list-style-type: none">• Estrutura do DNA• Genes e DNA• Função das enzimas	<ul style="list-style-type: none">• Estrutura básica do DNA• Princípios e uso da engenharia genética• Relação entre genes e DNA• Como as enzimas funcionam• Enzimas de restrição
4A	Universalidade do DNA	Visualização do DNA
5A	<ul style="list-style-type: none">• Universalidade da expressão gênica• Transcrição• Tradução• Atividade proteica• Estrutura da célula bacteriana• Variáveis e controles	<ul style="list-style-type: none">• Visão geral da biologia: DNA → Proteína → Traço• Processo de expressão gênica• Todos os organismos expressam genes da mesma forma• Colônias x células individuais
6	<ul style="list-style-type: none">• Crescimento bacteriano• Estrutura e função das proteínas• Biomoléculas• Mutação• Evolução	<ul style="list-style-type: none">• Crescimento exponencial, fase lag e fase de declínio• Enovelamento de proteínas• Bioquímica• Mutação do gene <i>rfp</i>• Razão evolutiva para a fluorescência

RELAÇÕES COM OS PADRÕES ACADÊMICOS

RELAÇÕES COM O CONTEÚDO BÁSICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

O programa ABE está em conformidade com muitos dos padrões científicos para a próxima geração estabelecidos pelo Next Generation Science Standards (NGSS) e com a iniciativa Common Core State Standards (CCSS), criada para estabelecer padrões científicos para o ensino básico nos Estados Unidos.

E no Brasil?²

Os currículos estaduais e livros didáticos de Biologia produzidos em nosso país têm como ponto de partida a Base Nacional Comum Curricular (BNCC) e compartilham muitos dos elementos de ensino de genética apresentados nas propostas internacionais. Assim, a Amgen Biotech Experience se aproxima do contexto nacional, a partir de pontos comuns entre os temas essenciais trabalhados e por meio de um conjunto de práticas que podem ser adicionados aos materiais e currículos brasileiros.

A biologia explorada pelos estudantes no programa é fundamental para a aprendizagem de Ciências e Tecnologia. Os estudantes aprendem o conteúdo, adquirem proficiência em práticas científicas e compreendem ideias centrais de várias disciplinas. Além disso, eles exploram a leitura e a escrita científica, que atende aos padrões do CCSS para o ensino básico de linguagem e letramento científico.

Os símbolos a seguir indicam quando um conceito é introduzido, desenvolvido de forma mais completa ou complementado³:

* = Introduzido

** = Desenvolvido

*** = Complementado

² Inserção do editor.

³ N. do E.: A análise em relação à BNCC é apresentada no apêndice, ao final do livro.

PADRÕES CIENTÍFICOS PARA A PRÓXIMA GERAÇÃO (NGSS)

Expectativas de desempenho	Capítulo					
	Introdução	1	2A	4A	5A	6
HS-LS1. De moléculas a organismos: estruturas e processos						
HS-LS1-1. Elaborar uma explicação fundamentada em evidências sobre como a estrutura do DNA determina a estrutura das proteínas, que realizam funções vitais essenciais por meio de sistemas de células especializadas.	*	*	**		***	
HS-LS1-6. Elaborar e revisar uma explicação fundamentada em evidências sobre como o carbono, o hidrogênio e o oxigênio das moléculas de açúcar podem se combinar com outros elementos para formar os aminoácidos e/ou outras moléculas grandes com base de carbono.			*			***
HS-LS3. Hereditariedade: herança e variação de características						
HS-LS3-1. Fazer perguntas para esclarecer as relações entre o papel do DNA e dos cromossomos na codificação das instruções responsáveis pelas características transmitidas de pais para filhos.			*		***	
HS-LS3-2. Confirmar e argumentar, com base em evidências, como as variações genéticas hereditárias podem resultar de (1) combinações genéticas através da meiose, (2) erros viáveis que ocorrem durante a replicação e/ou (3) mutações causadas por fatores ambientais.						
HS-LS4 Evolução biológica: unidade e diversidade						
HS-LS4-4. Elaborar uma explicação baseada em evidências de como a seleção natural leva à adaptação das populações.			**		**	
HS-LS4-5. Avaliar as evidências que confirmam que mudanças nas condições ambientais podem resultar em (1) aumento do número de indivíduos de algumas espécies, (2) surgimento de novas espécies ao longo do tempo e (3) extinção de outras espécies.			**	*	*	

PADRÕES CIENTÍFICOS PARA A PRÓXIMA GERAÇÃO (NGSS)

Práticas científicas	Capítulo					
	Introdução	1	2A	4A	5A	6
Fazer perguntas a partir da análise de modelos ou de uma teoria para esclarecer relações.		*	**	**	**	***
Desenvolver e utilizar modelos						
Utilizar modelos (inclusive matemáticos e computacionais) para gerar dados para corroborar explicações e prever fenômenos, analisar sistemas e resolver problemas.			*		*	
Planejar e realizar investigações						
Planejar e realizar uma investigação individual ou coletiva para produzir dados que sirvam de base para evidências e para o delineamento do estudo; decidir os tipos, a quantidade e a precisão dos dados necessários para realizar medições confiáveis, considerar limitações relacionadas à precisão dos dados (p. ex., número de ensaios, custos, riscos, tempo) e refinar o delineamento do estudo de acordo com essas premissas.			*		**	
Elaborar explicações e desenvolver soluções						
Elaborar uma explicação baseada em evidências válidas e confiáveis coletadas de várias fontes (inclusive as próprias investigações dos estudantes, modelos, teorias, simulações, revisões por pares) na hipótese de que as teorias e leis que descrevem o mundo natural operam hoje da mesma forma que operavam no passado e continuarão operando da mesma forma no futuro.			*	**	**	***
Argumentar com base em evidências						
Elaborar e defender uma afirmação baseada em evidências sobre o mundo natural que reflita tanto o conhecimento científico quanto as evidências geradas pelos estudantes.			*	**	**	***

PADRÕES CIENTÍFICOS PARA A PRÓXIMA GERAÇÃO (NGSS)

Conceitos transversais	Capítulo					
	Introdução	1	2A	4A	5A	6
Padrões						
Padrões de formas e eventos orientam a organização e a classificação, além de promover questionamentos sobre as relações e os fatores que os influenciam.	*					
Causa e efeito: mecanismo e explicação						
Os eventos podem ter causas simples ou multifacetadas. Na ciência, é importante investigar e explicar as relações causais e os mecanismos por meio das quais elas são mediadas. Esses mecanismos podem ser testados em vários contextos e utilizados para prever e explicar eventos em novos contextos.			*		**	
Escala, proporção e quantidade						
Ao considerar fenômenos, é essencial reconhecer o que é relevante em diferentes medidas de tamanho, tempo e energia, reconhecendo também como as variações na escala, proporção ou quantidade afetam a estrutura ou o desempenho de um sistema.			*	**		
Sistemas e modelos sistêmicos						
Ao estabelecer limites e explicar um modelo para o sistema estudado, você fornece as ferramentas necessárias para compreender, testar e aplicar as ideias na ciência e na engenharia.			*	*		
Estrutura e função						
A forma e a subestrutura de um objeto ou ser vivo determinam muitas de suas propriedades e funções.	*	*	***	***	**	***
Estabilidade e variações						
Tanto para sistemas naturais quanto para os criados pelo homem, as condições de estabilidade e os fatores determinantes das taxas de variação ou evolução de um sistema são elementos essenciais de estudo.						*

PADRÕES CIENTÍFICOS PARA A PRÓXIMA GERAÇÃO (NGSS)

Ideias disciplinares centrais	Capítulo					
	Introdução	1	2A	4A	5A	6
LS1.A: Estrutura e função						
Os sistemas de células especializadas dos organismos ajudam a executar funções vitais essenciais.	*	*				
Todas as células têm informações genéticas na forma de moléculas de DNA. Os genes são regiões no DNA com instruções que codificam a formação de proteínas, que por sua vez realizam a maioria do trabalho das células.	*	*	**	**	***	***
LS1.C: Organização da matéria e fluxo de energia nos organismos						
As moléculas de açúcar contêm carbono, hidrogênio e oxigênio. Suas estruturas de hidrocarbonetos são usadas para produzir aminoácidos e outras moléculas com base de carbono que podem se unir a moléculas maiores (como as proteínas ou DNA) e ser usadas, por exemplo, para formar novas células.		*	**			***
LS3.A: Herança de características						
Cada cromossomo é formado por uma única molécula de DNA muito longa, e cada gene no cromossomo é um segmento específico desse DNA. As instruções para a formação das características das espécies estão presentes no DNA. Todas as células de um organismo têm o mesmo conteúdo genético, mas os genes usados (expressos) pelas células podem ser regulados de maneiras diferentes. Nem todo DNA codifica uma proteína; alguns segmentos de DNA estão envolvidos em funções reguladoras ou estruturais, e outros não têm uma função conhecida até o momento.	*	*	**	**	***	
LS3.B: Variação de características						
Na reprodução sexuada, às vezes os cromossomos podem trocar seções durante o processo de meiose (divisão celular), criando novas combinações genéticas e, assim, mais variação genética. Embora a replicação do DNA seja rigorosamente regulada e extremamente precisa, podem ocorrer erros que vão resultar em mutações, que também são fontes de variação genética. Fatores ambientais também podem causar mutações nos genes, e as mutações viáveis são herdadas.					*	
Os fatores ambientais também afetam a expressão das características e, conseqüentemente, afetam a probabilidade de ocorrências de características em uma população. Assim, a variação e a distribuição de características dependem de fatores tanto genéticos quanto ambientais.			*			

PADRÕES CIENTÍFICOS PARA A PRÓXIMA GERAÇÃO (NGSS)

Ideias disciplinares centrais	Capítulo					
	Introdução	1	2A	4A	5A	6
LS4.B: Seleção natural						
As características que afetam positivamente a sobrevivência têm maior probabilidade de ser reproduzidas, então são mais comuns na população.			*		*	
LS4.C: Adaptação						
A seleção natural leva à adaptação, ou seja, gera uma população dominada por organismos com anatomia, fisiologia e comportamentos mais adaptados à sobrevivência, que sejam capazes de se reproduzir em um ambiente específico. Ou seja, o diferencial de sobrevivência e reprodução dos organismos em uma população com uma característica hereditária vantajosa promove um aumento da proporção de indivíduos nas gerações futuras que têm a característica e uma diminuição da proporção de indivíduos que não têm a característica.			**		**	

PADRÕES CIENTÍFICOS PARA O ENSINO BÁSICO (CCSS)

Leitura e escrita	Capítulo					
	Introdução	1	2A	4A	5A	6
RST.11-12.9: Sintetizar informações coletadas em fontes variadas (p. ex., textos, experimentos, simulações) para compreender um processo, fenômeno ou conceito de forma coerente, resolvendo informações conflitantes quando possível.		*	*	**	**	***
WHST.9-12.1: Escrever argumentos com foco em conteúdos específicos das disciplinas.			*	**	**	***
WHST.9-12.9: Identificar evidências em textos informativos para corroborar análises, reflexões e pesquisas.		*	**	**	**	***

RELAÇÕES COM AS PRINCIPAIS COMPETÊNCIAS PARA O SÉCULO 21⁴

O programa ABE oferece aos estudantes muitas oportunidades de desenvolver as Principais Competências para o Século 21 nos domínios cognitivo e interpessoal.

Domínio cognitivo	Capítulo					
	Introdução	1	2A	4A	5A	6
Processos e estratégias cognitivas						
Pensamento crítico				**	**	***
Resolução de problemas			*	**	**	***
Análise			*	**	**	***
Raciocínio/argumentação		*	**	**	**	***
Interpretação		*	**	**	**	***
Conhecimento						
Comunicação oral e escrita		*	**	**	**	***
Escuta ativa		*	**	**	**	***

Domínio interpessoal	Capítulo					
	Introdução	1	2A	4A	5A	6
Trabalho em equipe e colaboração						
Comunicação		*	**	**	**	***
Colaboração		*	**	**	**	***
Trabalho em equipe		*	**	**	**	***
Habilidades interpessoais		*	**	**	**	***

⁴ National Research Council. (2012). *Education for life and work: Developing transferable knowledge and skills in the 21st century*. Washington, DC: The National Academies Press.

CONHECIMENTO E HABILIDADES PRÉVIAS

Os laboratórios do programa ABE podem ser utilizados em qualquer aula de Biologia com uma adaptação mínima. No entanto, os estudantes no início de um curso de introdução à Biologia podem ter pouco conhecimento de alguns conceitos científicos relacionados a essas atividades de laboratório e, portanto, vão necessitar de mais apoio para estabelecer essas conexões. Sugerimos que você ensine esses conceitos à medida que os estudantes forem precisando deles, em vez de ensiná-los todos de uma vez antes de começar o programa. No início de cada capítulo neste guia, você encontra uma lista dos conhecimentos prévios necessários para as atividades que serão trabalhadas.

Estudantes com pouca experiência em laboratórios de ciências vão necessitar de mais tempo e orientações para ter uma experiência segura e eficaz.

AVALIAÇÃO DO APRENDIZADO DO ESTUDANTE

Você pode avaliar o aprendizado dos estudantes ao longo do programa, à medida que forem participando das discussões com a turma e respondendo às perguntas dos laboratórios. As perguntas PARE E PENSE da seção *Métodos das atividades de laboratório* foram desenvolvidas para fazer com que os estudantes reflitam sobre aquela situação naquele momento. Essas perguntas também oferecem a você um panorama do aprendizado à medida que eles realizam as investigações.

Ao final do programa ABE, você pode realizar uma avaliação final, usando as perguntas sugeridas a seguir (as possíveis respostas a cada pergunta estão em itálico):

1. Explique o objetivo, os produtos, as ferramentas e o processo de engenharia genética.
O objetivo da engenharia genética é abordar a necessidade de tratar doenças que resultam da falta de uma proteína funcional. Os produtos associados à engenharia genética são as proteínas funcionais. As ferramentas associadas à engenharia genética são os plasmídeos, as enzimas de restrição e as bactérias. O processo de engenharia genética envolve a transferência de um gene humano para um plasmídeo, inserindo o plasmídeo em uma bactéria, clonando o plasmídeo e purificando a proteína fabricada pela bactéria.
2. Consulte a Figura 2A.4 na página 33 do Guia do Estudante. Em que momento desse processo você usaria a pipetagem e a eletroforese em gel?
A pipetagem é usada em todas as etapas e a eletroforese em gel é usada para confirmar se a digestão pela enzima de restrição funcionou e se houve a produção do plasmídeo recombinante correto.
3. Como a célula usa as instruções no DNA para fabricar proteínas?
A transferência de informações do DNA para a proteína ocorre em duas etapas: transcrição e tradução. A transcrição é a cópia do gene do DNA para o RNA mensageiro (RNAm). A tradução é a síntese da proteína usando o RNAm.
4. Por que é importante que os cientistas que trabalham com biotecnologia tenham um conhecimento profundo da Biologia e das habilidades de laboratório?
Para fabricar um produto a partir de um gene, os cientistas precisam ter conhecimento científico sobre doenças genéticas, DNA e processos celulares a fim de determinar os procedimentos laboratoriais. Esses procedimentos exigem também domínio de habilidades de laboratório.
5. Neste programa, você aprendeu como cientistas modificam um plasmídeo bacteriano adicionando um gene humano para produzir proteínas terapêuticas humanas. Como esse processo ajuda no tratamento de doenças genéticas?
As pessoas com carência de proteínas humanas podem usar as proteínas produzidas pelas bactérias para tratar os sintomas de suas doenças.

6. Antes de a insulina humana ser produzida pela engenharia genética, as pessoas usavam a insulina extraída do pâncreas do boi e do porco, que é semelhante (mas não exatamente igual) à insulina humana. Quais podem ser os benefícios da insulina geneticamente modificada em comparação à insulina extraída do pâncreas do boi e do porco?
A insulina geneticamente modificada tem as seguintes vantagens em comparação à insulina extraída do boi e do porco: (1) é mais fácil obter em grandes quantidades, (2) é exatamente igual à insulina humana, então tem menor probabilidade de causar uma reação adversa e (3) não envolve preocupações éticas relacionadas ao uso de animais.
7. Quais são os possíveis riscos associados ao uso de células bacterianas para produzir proteínas humanas?
As bactérias podem ser liberadas no ambiente. Um possível resultado dessa liberação é que as bactérias com resistência a antibióticos podem transmitir essa resistência para outras bactérias, inclusive bactérias nocivas. Outro risco é que o produto genético humano fabricado pela bactéria pode passar por leve mutação e ser ligeiramente diferente da proteína fabricada nas células humanas, produzindo efeitos colaterais perigosos. O produto pode ainda passar por uma transformação mais intensa e deixar de ser eficaz ou seguro para uso humano.

SEGURANÇA DE LABORATÓRIO

É essencial ensinar aos estudantes os procedimentos adequados de segurança para as experiências no laboratório. Os protocolos de laboratório usados no programa ABE são classificados como Segurança de Laboratório Nível 1, o que significa que exigem precauções mínimas. No entanto, como os estudantes estão trabalhando com os mesmos equipamentos de laboratório utilizados por cientistas, esses protocolos são uma excelente oportunidade para ensinar boas práticas de segurança de laboratório. Vale ressaltar que, nos Capítulos 5 e 6, os estudantes trabalham com células de *E. coli*. Embora a cepa das células usadas no programa seja benigna, é importante que os estudantes sigam as boas práticas e tomem precauções durante as atividades de laboratório.

Todos os estudantes devem conhecer as seguintes precauções básicas de segurança de laboratório:

- Amarrar os cabelos longos.
- Não comer, beber e nem armazenar alimentos ou bebidas no laboratório.
- Manter as bancadas e mesas do laboratório livres e organizadas, apenas com os materiais de laboratório, cadernos e instrumentos.
- Manipular materiais e equipamentos com cuidado e nunca usar produtos químicos e corantes sem a supervisão adequada.
- Garantir que todas as culturas, produtos químicos, desinfetantes e meios estejam claramente identificados com nomes e datas. Incluir as informações de perigo adequadas quando necessário.
- Sempre usar óculos de laboratório.
- Saber onde ficam a estação e a pia mais próxima para lavagem dos olhos.
- Cobrir quaisquer cortes nas mãos com curativo. Usar luvas para proteção extra.

Realizar os seguintes procedimentos de segurança ao trabalhar com microrganismos:

- Tratar todos os microrganismos como se fossem patogênicos.
- Usar luvas descartáveis ao manipular bactérias no laboratório de transformação (Laboratório 5/5A/5B).
- Ao manipular tubos de microcentrífuga, ponteiras, alças e placas de Petri, evitar vazamentos e qualquer contato desnecessário. Em caso de vazamento, informar o educador imediatamente.
- Lavar as mãos com sabão desinfetante antes e depois de trabalhar com microrganismos. O sabão não desinfetante removerá as bactérias superficiais e pode ser usado se não houver sabão desinfetante. Usar luvas para proteção extra.
- **Como tratar resíduos de laboratório:**
 - Colocar todos os equipamentos que tenham contato com as bactérias em sacos de lixo de resíduos biológicos claramente identificados.
 - Não colocar resíduos líquidos no saco de lixo de resíduos biológicos. Despejar os resíduos líquidos em um coletor designado para esse fim.
 - Devolver o saco de lixo de resíduos biológicos com o kit para ser autoclavado e reutilizado.
 - Esterilizar os resíduos líquidos adicionando uma solução de água sanitária a 10%, depois despejá-los no ralo.
- **Limpeza:**
 - Limpar os vazamentos imediatamente, com cuidado. Colocar o vazamento de molho em uma solução de água sanitária a 10% e cobrir com papel-toalha. Depois de deixar o vazamento de molho na água sanitária por 2 minutos, limpar com cuidado e colocar os materiais no saco de lixo de resíduos biológicos. Lavar a área de novo com desinfetante.
 - Usar uma solução de água sanitária a 10% para desinfetar todas as bancadas e áreas de trabalho antes e depois de trabalhar com microrganismos.
 - Se houver fragmentos de vidro, usar uma escova e uma pá designadas para esse fim para removê-los. Colocar os fragmentos em uma solução de água sanitária a 10%, depois escorrer e descartá-los de acordo com as normas locais.
 - Usar óculos resistentes a produtos químicos e ter cuidado ao manipular a solução de água sanitária.
 - Saber onde ficam a estação e a pia mais próxima para lavagem dos olhos.

ATENÇÃO: não deixe que estudantes manipulem a solução de água sanitária.

PREPARAÇÃO DE MATERIAIS

Antes de começar, você deve se familiarizar com os procedimentos utilizados em cada capítulo, com a preparação necessária e com os materiais que você vai usar. A preparação de materiais em cada capítulo é voltada para 12 grupos de 2 ou 3 estudantes. Se você tiver mais ou menos grupos de laboratório, ajuste a quantidade de materiais. As informações a seguir vão ajudar você a fazer esses ajustes.

ATENÇÃO: alguns laboratórios precisam de uma preparação com vários dias de antecedência; portanto, leia a seção *Preparação* de cada capítulo que você pretende trabalhar antes de iniciar o programa.

ATENÇÃO: o tempo de preparação necessário para os laboratórios do programa ABE é importante. Você pode pedir aos estudantes interessados em adquirir habilidades de laboratório que ajudem com a preparação.

MATERIAIS NECESSÁRIOS POR GRUPO

As tabelas a seguir apresentam apenas as quantidades de materiais que você vai precisar ajustar, dependendo do número de grupos de estudantes em cada turma.

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo
Capítulo 1 Sessão 1, Laboratório 1.1	Preparação e materiais adicionais para o Laboratório 1.1	Prepare os conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:	a. Suporte de plástico com tubo de microcentrífuga com uma solução de corante vermelho (Cor)	1
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caixa de ponteiros descartáveis	1
			d. Folha plastificada para atividade de micropipetagem (do kit)	1
			e. Coletor de resíduos líquidos	1 para cada 2 grupos

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo
Capítulo 1 Sessão 2, Laboratório 1.2	Prepare os géis de agarose para o Laboratório 1.2 ⁵ (pode ser feito com vários dias de antecedência)	Prepare a solução de agarose:	a. Tampão SB 20x	1,5 mL
			b. Água destilada (dH ₂ O)	28,5 mL
			c. Agarose	0.24 g
			d. Sacos plásticos reutilizáveis de 1 litro com fecho hermético	1
	Preparação e materiais adicionais para o Laboratório 1.2	Prepare SB 1x (pode ser feito com vários dias de antecedência):	a. SB 20x	2,5 mL
			b. dH ₂ O	47,5 mL
			c. Frasco de 50 mL com a identificação "SB 1x"	1 para cada 2 grupos
		Prepare os conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:	a. Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com:	1
			i. Tubo com corante vermelho (Cor)	
			ii. Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante 1 (S1)	
			iii. Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante 2 (S2)	
			iv. Tubo com uma solução de corante 3 (S3)	
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caixa de ponteiros descartáveis	1
d. Placas para pipetagem com gel de agarose a 0,8%	2			
e. Coletor de resíduos líquidos	1 para cada 2 grupos			

⁵ As quantidades dos materiais listados serão usadas para preparar um gel, que poderá ser usado por dois grupos.

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo
Capítulo 1 Sessão 3, Laboratório 1.3 (opcional)	Preparação e materiais adicionais para o Laboratório 1.3 opcional	Faça cópias do anexo 1 e reúna os seguintes materiais:	a. Laboratório 1.3: Como examinar a precisão de uma micropipeta (Anexo 1)	1 cópia (por estudante)
			b. Suporte de plástico com um tubo de microcentrifuga contendo dH ₂ O	1
			c. Micropipeta P-20	1
			d. Caixa de ponteiros descartáveis	1
			e. Tubos de microcentrifuga de 1,5 mL	8
			f. Marcador permanente	1
			g. Conta-gotas	1
			h. Coletor de resíduos líquidos	1 para cada 2 grupos

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo
Capítulo 2A, Sessão 2	Faça cópia das folhas de atividades e reúna os materiais para a atividade "Vamos clonar o gene"	Faça cópias dos anexos 2 e 3 e reúna os seguintes materiais:	a. Diagrama do plasmídeo (Anexo 2)	1 cópia (por par)
			b. Sequência do DNA humano (Anexo 3)	1 cópia (por par)
			c. Tesoura	1 (por par)
			d. Fita adesiva	1 rolo (por par)
Capítulo 2A, Sessão 2, Laboratório 2A	Prepare a alíquota dos reagentes para o Laboratório 2A (pode ser feito com vários dias de antecedência)	Coloque identificações em 4 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL da seguinte maneira:	a. Tubo com a identificação "T 2,5x"	1
			b. Tubo com a identificação "pR-2A"	1
			c. Tubo com a identificação "ER"	1
			d. Tubo com a identificação "dH ₂ O"	1
		Pipete os reagentes nos tubos de microcentrífuga:	a. Tampão de restrição 2,5x no tubo com a identificação "T 2,5x"	12,0 µL
			b. Solução de plasmídeo pARA-R no tubo com a identificação "pR-2A"	10,0 µL
			c. Enzimas de restrição no tubo com a identificação "ER"	3,0 µL
			d. Água destilada no tubo com a identificação "dH ₂ O"	1.000 µL
	Reúna os materiais para o Laboratório 2A	Prepare os conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:	a. Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com: i. Tubo com T 2,5x ii. Tubo com pR-2A iii. Tubo com ER iv. Tubo com dH ₂ O	1
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caixa de ponteiros descartáveis	1
			d. Luvas descartáveis	1 par (por estudante)
			e. Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL	2
f. Marcador permanente			1	
g. Coletor de resíduos líquidos			1 para cada 2 grupos	

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo	
Capítulo 4A, Sessões 1 e 2, Laboratório 4A	Prepare géis de agarose para o Laboratório 4A ⁶ (pode ser feito com vários dias de antecedência)	Prepare a solução de agarose:	a. Tampão SB 20x	1,5 mL	
			b. dH2O	28,5 mL	
			c. Agarose	0.24 g	
			d. Sacos plásticos reutilizáveis de 1 litro com fecho hermético	1	
	Prepare a alíquota dos reagentes para o Laboratório 4A (pode ser feito com vários dias de antecedência)	Coloque identificações em 2 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL da seguinte maneira:	b. Tubo com a identificação "Cor"	1	
			b. Tubo com a identificação "E"	1	
		Pipete os reagentes nos tubos de microcentrífuga:	a. Corante de carga no tubo com a identificação "Cor"	20,0 µL	
			b. Escada de DNA no tubo com a identificação "E"	10,0 µL	
	Preparação e materiais adicionais para o Laboratório 4A	Prepare SB 1x (pode ser feito com vários dias de antecedência):	a. SB 20x	2,5 mL	
			b. dH2O	47,5 mL	
			c. Frasco de 50 mL com a identificação "SB 1x"	1 para cada 2 grupos	
		Faça cópias do Anexo 4 e prepare os conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:	a. Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com: i. Tubo de microcentrífuga com pARA-R digerido do Laboratório 2A (R+) ii. Tubo de microcentrífuga com pARA-R não digerido do Laboratório 2A (R-) iii. Tubo com Cor iv. Tubo com E		1
				b. Micropipeta P-20	1
				c. Caixa de ponteiras descartáveis	1
				d. Coletor de resíduos líquidos	1 para cada 2 grupos
e. Diagrama da escada de DNA (Anexo 4)			1 cópia (por estudante)		

⁶ As quantidades dos materiais listados serão usadas para preparar um gel, que poderá ser usado por dois grupos.

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo
Capítulo 5A, Sessões 1 a 3, Laboratório 5A	Prepare a alíquota dos reagentes e reúna os materiais para o Laboratório 5A (<i>pode ser feito com vários dias de antecedência</i>)	Coloque identificações em 3 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL da seguinte maneira:	a. Tubo com a identificação "CL"	1
			b. Tubo com a identificação "pR-5a"	1
			c. Tubo com a identificação "CC"	1
		Pipete os reagentes nos tubos de microcentrífuga :	a. Caldo Luria no tubo com a identificação "CL"	350 µL
			b. Plasmídeo recombinante pARA-R no tubo com a identificação "pR-5a"	12,0 µL
		Prepare os conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:	a. Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com: i. Tubo com CL ii. Tubo com pR-5a	1
			b. Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL	2
			c. Marcador permanente	1
			d. Luvas descartáveis	1 par (por estudante)
			e. Micropipeta P-20	1
			f. Micropipeta P-200	1
			g. Caixa de ponteiras descartáveis	1
			h. 3 placas de Petri com ágar: i. Placa CL (1 risco) ii. Placa CL/amp (2 riscos) iii. Placa CL/amp/ara (3 riscos)	1 1 1

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo
	Prepare a alíquota dos reagentes e reúna os materiais para o Laboratório 5A (pode ser feito antes de começar o laboratório)	Faça cópias do anexo 5 e reúna os materiais necessários para o laboratório:	a. Copo de isopor	1
			b. Alças de Drigalski	2
			c. Fita adesiva colorida	1 rolo para cada 2 grupos
			d. Saco de lixo de resíduos biológicos para os materiais que entraram em contato com as células de <i>E. coli</i>	1 para cada 2 grupos
			e. Coletor de resíduos líquidos, como um béquer pequeno	1 para cada 2 grupos
			f. Previsões do crescimento bacteriano (Anexo 5)	1 cópia (por estudante)
		Prepare as células competentes 15 minutos antes de começar o laboratório:	a. Tubo resfriado com a identificação "CC"	1
			b. Células competentes de <i>E. coli</i>	100 µL

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo	
Capítulo 6 Sessão 2, Laboratório 6, Parte A	Prepare a alíquota dos reagentes para o Laboratório 6, Parte A (<i>pode ser feito 1 dia ou 2 antes do laboratório</i>)	Coloque identificações em três tubos de microcentrífuga de 1,5 mL da seguinte maneira:	b. Tubo com a identificação "TE"	1	
			b. Tubo com a identificação "TLis"	1	
			c. Tubo com a identificação "EC"	1	
		Pipete os reagentes nos tubos de microcentrífuga a:	a. Tampão de eluição no tubo com a identificação "TE"	200 µL	
			b. Tampão de lise no tubo com a identificação "TLis"	160 µL	
		Pipete a cultura de <i>E. coli</i> em suspensão da placa CL/amp/ara no tubo da seguinte maneira:	a. Cultura de <i>E. coli</i> em suspensão da placa CL/amp/ara	1.000 µL (1 mL)	
		Reúna os materiais para o Laboratório 6, Parte A	Prepare os conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:	a. Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com: i. Tubo com <i>E. coli</i> (EC) ii. Tubo com TE iii. Tubo com TLis	1
				b. Coletor de resíduos líquidos, como um béquer pequeno	1
	c. Micropipeta P-200			1	
	d. Caixa de ponteiras descartáveis			1	
	e. Marcador permanente			1	
	f. Saco de lixo de resíduos biológicos para os materiais que entraram em contato com as células de <i>E. coli</i>			1 para cada 2 grupos	

Sessão/ Laboratório	Etapa de preparação	Ação	Material	Quantidade necessária por grupo
Capítulo 6 Sessão 2, Laboratório 6, Parte B	Reúna os materiais para o Laboratório 6, Parte B	Prepare os conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:	a. Suporte de plástico com um tubo de microcentrífuga contendo EC da Parte A	1
			b. Os seguintes reagentes ⁷ :	
			i. Tampão de ligação (TLig)	1
			ii. Tampão de lavagem (TLav)	1
			iii. Tampão de eluição (TE)	1
			iv. Tampão de equilíbrio da coluna (TEqC)	
			c. Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL	2
			d. Coluna de cromatografia	1
e. Coletor de resíduos líquidos, como um béquer pequeno	1			
f. Micropipeta P-1.000	1			
g. Caixa de ponteiras descartáveis	1			

PREPARAÇÃO DAS ALÍQUOTAS DE REAGENTES, DNA E ENZIMAS

Os protocolos de laboratório do programa ABE foram elaborados para que você precise preparar a menor quantidade possível de alíquotas. Na seção Preparação de cada laboratório, você encontra as orientações para preparar as alíquotas. Quando apropriado, traremos sugestões para ajudar você a economizar tempo na preparação das alíquotas. Por exemplo, em vez de preparar uma única alíquota para cada grupo, haverá vezes em que você poderá preparar uma alíquota dupla e dois grupos poderão compartilhar o reagente.

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

A maioria das soluções do kit vem com as concentrações de trabalho para que você não precise diluí-las antes de preparar as alíquotas para os estudantes. No entanto, algumas podem vir com concentrações maiores (ou seja, concentrações de “estoque”) do que as que os estudantes vão usar. Por exemplo, o tampão de borato de sódio (tampão SB para eletroforese) é fornecido na concentração de estoque de 20x.

⁷ Cada tampão poderá ser fornecido de duas maneiras: em tubos de 15 mL ou em um recipiente maior. Se você tiver tubos de 15 mL, distribua 1 para cada grupo. Se você tiver um recipiente maior, despeje 10 mL de cada tampão em um conjunto de frascos para que sejam compartilhados por 2 grupos.

Os estudantes vão trabalhar apenas com o tampão SB na concentração de 1x. Diluir um grande volume de tampão SB para a concentração de trabalho vai economizar tempo de preparação.

ATENÇÃO: depois de usado, o tampão SB 1x pode permanecer na cuba de eletroforese ou ser descartado. Se você tiver turmas consecutivas, mantenha o tampão nas cubas de eletroforese para os estudantes que farão o mesmo laboratório.

Para calcular a diluição de uma concentração de estoque para uma concentração de trabalho:

1. Determine a quantidade de solução de trabalho necessária por grupo.
2. Multiplique o volume necessário pelo número de grupos.
3. Use a fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$ para determinar o volume de solução de estoque (V_1) na concentração de estoque (C_1) que você vai precisar para diluir a fim de preparar o volume final da solução de trabalho (V_2) na concentração de trabalho (C_2).
4. Multiplique esse volume pelo número de turmas.

Exemplo: você precisa preparar um tampão SB 1x para fazer géis de agarose. Se cada uma de suas turmas tem 12 grupos de laboratório, você vai precisar de 6 géis para cada turma. Cada gel precisa de aproximadamente 30 mL de tampão SB 1x. O tampão SB fornecido tem uma concentração de 20x. Você tem 5 turmas fazendo os laboratórios ABE.

- *Determine a quantidade de solução de trabalho necessária por grupo:*

30 mL de tampão SB 1x por gel

- *Multiplique o volume necessário por grupo pelo número de grupos:*

$30 \text{ mL} \times 6 \text{ géis} = 180 \text{ mL}$

- *Use a fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$:*

$20 \times V_1 = 1 \times 180 \text{ mL}$

$V_1 = (1 \times 180 \text{ mL}) / 20$

$V_1 = 9 \text{ mL de tampão SB 20x}$

Você precisa misturar 9 mL de tampão SB 20x e 171 mL de dH₂O (água deionizada ou destilada) para fazer 180 mL de tampão SB 1x para uma turma.

- *Multiplique esse volume pelo número de turmas:*

Tampão SB $\Rightarrow 5 \times 9 \text{ mL} = 45 \text{ mL}$

dH₂O $\Rightarrow 5 \times 171 \text{ mL} = 855 \text{ mL}$

Como você tem 5 turmas, você precisa misturar 45 mL de tampão SB 20x e 855 mL de dH₂O. Assim, você terá 900 mL de tampão SB 1x, a quantidade suficiente para as 5 turmas.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS DE ENSINO

Assim como os estudantes precisam de ajuda para realizar os experimentos e interpretar os resultados, precisam de apoio para utilizar as ferramentas de leitura e interpretação essenciais para a investigação científica. Independentemente do nível de proficiência na leitura, ao deparar com textos científicos, os estudantes geralmente precisam de ajuda para compreender o que estão lendo e aprender conceitos científicos. Cada capítulo traz uma ou mais leituras com objetivos diferentes: envolver os estudantes relacionando o que vão aprender a situações do mundo real, fornecer as informações básicas necessárias para realizar uma atividade, ou ainda resumir os conhecimentos conceituais que os estudantes devem ter adquirido.

Você pode usar várias estratégias para ajudar os estudantes na leitura de materiais científicos. Alguns textos podem ser lidos em voz alta durante a aula e outros podem ser lidos em casa. Em qualquer um dos casos, a leitura deve vir acompanhada de uma série de perguntas (quem?, o quê?, por quê?, quando?, e onde?) para serem discutidas em sala de aula. Outra estratégia eficaz é escrever as respostas em um cartaz com um desenho relacionado à ideia principal e colá-lo na parede da sala para consulta. Os estudantes podem criar um glossário explicando termos que não conhecem com as próprias palavras. Eles podem identificar palavras que não conhecem, discuti-las com a turma e acrescentá-las a esse glossário.

COMO PROMOVER DISCUSSÕES EM SALA DE AULA

As discussões em sala de aula são uma estratégia fundamental de ensino e aprendizagem no programa ABE:

- Para iniciar uma discussão, você pode fazer perguntas que levem o estudante a analisar um experimento ou interpretar um texto, individualmente ou em grupo. À medida que a discussão avança, os estudantes podem fazer suas próprias perguntas.
- Ao discutir com a turma, os estudantes têm a oportunidade de estabelecer relações entre o tópico discutido e suas experiências da vida real, tornando a matéria autêntica, prática e relevante.
- A discussão pode ser usada para fazer um brainstorm de ideias. Depois, os estudantes terão a chance de explicar suas ideias e apresentar evidências para as suas conclusões.
- Discussões que exigem conhecimento prévio podem revelar concepções sobre um tópico.
- O processo de analisar explicações criticamente durante uma discussão em público permite que os estudantes entendam melhor e confrontem determinadas concepções.
- As discussões podem ser usadas para fazer uma avaliação diagnóstica, permitindo que você avalie o conhecimento prévio, identifique o nível de conhecimento do estudante acerca dos conceitos, além da lógica e do raciocínio do estudante.

Talvez os estudantes não estejam acostumados a participar de discussões nas aulas de Ciências. Incentivar todos a participar e “esperar para falar” aumenta o envolvimento da turma e a qualidade das respostas. Permitir que os estudantes participem de discussões em pequenos grupos antes de começar a discussão com a turma toda dará aos menos extrovertidos a oportunidade de ganhar confiança para falar diante do grupo e aprender o valor de suas contribuições.

Como facilitador, você tem várias tarefas:

- Faça perguntas que instiguem a reflexão.

- Divida as perguntas maiores de modo que fiquem fáceis de compreender e responder.
- Ajude os estudantes a organizar seu pensamento com clareza, reformulando frases ou fazendo perguntas diferentes.
- Nas discussões, mantenha o foco nos conceitos que estão sendo explorados.
- Ajude os estudantes a praticarem a “etiqueta” de discussão, ouvindo e respondendo aos colegas.

CADERNOS E RELATÓRIOS DAS ATIVIDADES DE LABORATÓRIO

Cada estudante deve ter um caderno, que vai servir para registrar todas as atividades de laboratório, inclusive as respostas a questionários dadas individualmente ou em grupo, fazer anotações durante as discussões, anotar dados e comentários registrados nas investigações de laboratório e fazer tarefas. O caderno servirá para o estudante consultar as ideias e reflexões, além de permitir que você e o próprio estudante avaliem o aprendizado e monitorem o aprimoramento de habilidades como escrita, coleta de dados, análise e pensamento crítico.

À medida que os estudantes se envolverem no programa ABE, peça a eles que escrevam relatórios na seguinte sequência: estabelecer uma hipótese, coletar e analisar dados e escrever conclusões e afirmações corroboradas por evidências.

USO DE FLUXOGRAMAS NO LABORATÓRIO

Considerando a complexidade de alguns protocolos de laboratório do programa ABE, os estudantes terão muita dificuldade para realizar as atividades de laboratório em tempo hábil e corretamente se não revisarem os protocolos com antecedência. Além disso, sabendo que cada protocolo é composto de várias etapas, os estudantes devem criar um fluxograma de trabalho em cada laboratório. Esses fluxogramas devem ter informações suficientes para que eles não precisem recorrer ao Guia do Estudante durante o laboratório e precisam incluir um espaço para que sejam feitas anotações durante o experimento.

No site do programa, disponibilizamos modelos de fluxogramas e anexo para cada laboratório. Nas primeiras atividades de laboratório, você pode fornecer aos estudantes um modelo parcialmente preenchido ou completo.


Antes de os estudantes iniciarem o laboratório, confira o fluxograma de cada um deles.

RECURSOS

No site do programa, disponibilizamos links para recursos que podem melhorar a experiência de aprendizado do estudante. Entre esses recursos estão vídeos, artigos relacionados aos conteúdos do currículo e atividades de laboratório que podem ser usadas para ampliar o aprendizado do estudante.

ÍCONES

Os ícones usados no Guia do Educador e no Guia do Estudante servem para chamar a atenção para vários aspectos do currículo. A seguir, apresentamos uma lista desses ícones e seus significados.

Ícone	Significado	Guia do Estudante	Guia do Educador
	VOCÊ SABIA? Informações básicas sobre os conceitos abordados no capítulo.	✓	
	PARE E PENSE Perguntas-chave para melhorar a compreensão do estudante sobre os protocolos de laboratório.	✓	✓
	REFLITA Perguntas-chave para melhorar a compreensão do estudante sobre conceitos importantes da Biologia.	✓	✓
	SEGURANÇA Lembretes das principais técnicas de segurança laboratorial.	✓	✓
	TÉCNICA DE LABORATÓRIO Técnicas laboratoriais úteis para melhorar a eficiência e os resultados.	✓	✓
	IDEIAS PRINCIPAIS Conceitos importantes que são centrais em cada sessão.		✓
	RECURSOS Informações sobre os recursos disponibilizados no site do programa.		✓
	INDO ALÉM Sugestões de áreas para expandir o currículo.		✓
	ESTRATÉGIA Sugestões de boas práticas durante o ensino desse conteúdo.		✓

INTRODUÇÃO AO PROGRAMA

AMGEN BIOTECH EXPERIENCE

VISÃO GERAL

A “Introdução ao programa” apresenta o contexto das experiências de laboratório que os estudantes terão no programa Amgen Biotech Experience (ABE). Os estudantes leem sobre Engenharia Genética e pesquisas biofarmacêuticas.

CONHECIMENTO PRÉVIO

Os estudantes já devem saber:

- A relação entre DNA, genes, proteínas e características; mais especificamente que os genes têm o código para a produção de uma proteína e que as proteínas são moléculas usadas na fabricação e no funcionamento da célula, sendo, portanto, responsáveis pelos traços do organismo.

OBJETIVOS DE APRENDIZADO

Ao final da Introdução ao programa, os estudantes serão capazes de:

- Explicar que a Engenharia Genética cria organismos geneticamente modificados que produzem proteínas humanas a partir do DNA humano.
- Explicar como a Engenharia Genética pode ser usada para tratar algumas doenças.

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar que a Engenharia Genética cria organismos geneticamente modificados que produzem proteínas humanas a partir do DNA humano. Avalie também a capacidade do aluno de explicar como a Engenharia Genética pode ser usada para tratar algumas doenças. Para isso, analise o trabalho dos estudantes realizado nas atividades “S-Q-A” (Sei, Quero saber e Aprender) e “Parede de palavras” da segunda sessão.

SEQUÊNCIA SUGERIDA DE ATIVIDADES

SESSÃO 1

- Comece pela atividade S-Q-A sobre os conceitos da biotecnologia e a indústria biofarmacêutica. (10 min)
- Peça aos estudantes que leiam o texto “**O que é biotecnologia?**”. Promova uma discussão sobre a leitura. (35 min)

SESSÃO 2

- Os estudantes devem concluir a atividade S-Q-A sobre os conceitos da biotecnologia e a indústria biofarmacêutica. (20 min)
- Peça aos estudantes que criem uma Parede de Palavras definindo os termos do texto “**O que é biotecnologia?**”. (20 min)
- Os estudantes devem anotar uma pergunta relacionada ao conteúdo do texto “**O que é biotecnologia?**”. (5 min)

PREPARAÇÃO

Familiarize-se com o conteúdo da “Visão geral do currículo” nesta introdução. Escolha um vídeo que fale sobre biotecnologia e suas contribuições.

MATERIAIS PARA AS ATIVIDADES DE LEITURA

Reúna os seguintes materiais e distribua aos estudantes, conforme necessário:

- Três cartolinas respectivamente identificadas com: “Sei (S)”, “Quero Saber (Q)” e “Aprendi (A)”.
- Pincéis marcadores
- Canetas marca-texto ou blocos adesivos para fazer anotações.
- Uma ficha pautada ou bloco adesivo por estudante
- Fita adesiva

METODOLOGIA DE ENSINO

SESSÃO 1

IDEIAS PRINCIPAIS: a Engenharia Genética permite inserir DNA humano em outros organismos para que esses organismos geneticamente modificados produzam proteínas humanas. Essas proteínas podem ser usadas para tratar uma variedade de doenças e ajudar milhões de pessoas.

Comece pela atividade S-Q-A sobre os conceitos da biotecnologia e a indústria biofarmacêutica. (10 min)

Fixe na lousa ou na parede as três folhas de cartolina com as identificações: “Sei (S)”, “Quero saber (Q)” e “Aprendi (A)”. Peça aos estudantes que indiquem o que já sabem (“S”) e o que querem saber (“Q”) sobre biotecnologia e anotem na cartolina correspondente. Deixe as cartolinas fixadas na sala de aula durante o programa.

ESTRATÉGIA: depois de cada atividade de laboratório e/ou leitura, volte à folha “Q” e peça aos estudantes que acrescentem informações à folha “A”. Ao final do programa, volte às folhas “Q” e “A” e avalie a evolução do conhecimento dos estudantes sobre essa área.

Peça aos estudantes que leiam o texto “O que é biotecnologia?”. Promova uma discussão sobre a leitura. (35 min)

Nesta atividade de leitura, os estudantes vão aprender que a biotecnologia começou após a descoberta dos plasmídeos e das enzimas de restrição, e que ela é utilizada para o desenvolvimento de produtos e tecnologias que melhoram a saúde humana, criação de combustíveis que movimentam o mundo e desenvolvimento de sistemas mais aprimorados para a produção de alimento. Lembre os alunos de consultarem o **Glossário** ao final de cada



capítulo do guia do estudante para descobrir o significado dos termos científicos que não conhecem.

Mostre um ou mais vídeos que falam sobre biotecnologia e suas contribuições. Após assistirem ao(s) vídeo(s), peça aos estudantes que façam um brainstorm de ideias sobre o futuro e as promessas da biotecnologia.

RECURSOS: Os links para os vídeos estão disponíveis no site do programa:

<https://amgenbiotechexperience.com/>



Para ajudar os estudantes a compreenderem o texto e o(s) vídeo(s), monte grupos de dois a quatro integrantes e aplique as seguintes estratégias de leitura:

- Destacar com caneta marca-texto ou anotar nos blocos adesivos quaisquer palavras e conceitos que acharem importantes durante a leitura.
- Registrar as perguntas dos estudantes sobre a leitura ou o conteúdo relacionado.
- Informar aos estudantes que vão compartilhar suas anotações e perguntas na próxima sessão.

ESTRATÉGIA: durante a discussão, utilize estas práticas e técnicas:

- Dê aos estudantes tempo para refletir sobre as respostas dos colegas.
- Peça esclarecimentos.
- Peça explicações.
- Reformule frases.
- Peça exemplos.
- Peça evidências.
- Forneça exemplos e contraexemplos.
- Peça aos estudantes que complementem uma explicação.
- Peça aos estudantes que avaliem uma resposta.



SESSÃO 2

IDEIAS PRINCIPAIS: pesquisadores biofarmacêuticos estudam a biologia humana para entender melhor como desenvolver soluções para aprimorar a vida das pessoas que sofrem de doenças graves.

Os estudantes devem concluir a atividade S-Q-A sobre os conceitos da biotecnologia e a indústria biofarmacêutica. (20 min)

Peça aos estudantes que voltem à folha “Q” e acrescentem informações à folha “A” usando o que aprenderam no texto “**O que é biotecnologia?**”. Explique aos estudantes que, nos próximos dias, eles vão realizar atividades e experimentos no laboratório para entender melhor a biotecnologia e a biofarmacêutica.



ESTRATÉGIA: se os estudantes precisarem de mais ajuda para entender o texto, promova uma discussão com a turma usando as seguintes perguntas:



- Que ideia importante vocês identificaram nesse texto?
- Qual é a relação entre as informações desse texto e as atividades de laboratório que vamos realizar?

Peça aos estudantes que criem uma Parede de Palavras definindo os termos do texto “O que é engenharia genética?”. (20 min)

Entregue uma ficha pautada ou um bloco adesivo e um marcador permanente a cada estudante e peça a eles que anotem uma palavra-chave ou um termo do texto. Depois, peça a eles que fixem suas anotações na parede, um por vez, agrupando as palavras iguais ou semelhantes.

ESTRATÉGIA: você pode deixar a Parede de Palavras fixada e consultá-la de novo periodicamente. Os estudantes podem acrescentar palavras durante o programa, mas limite o número de palavras entre dez e vinte. Incentive os estudantes a consultar a Parede de Palavras durante as discussões em sala ou quando forem ler os protocolos de laboratório. Você pode usar também a Parede de Palavras como ferramenta de avaliação, pedindo aos estudantes que criem mapas conceituais que mostrem as relações entre as palavras.



Os estudantes devem anotar uma pergunta relacionada ao conteúdo do texto “O que é biotecnologia?”. (5 min)

ESTRATÉGIA: ao final do programa, você pode voltar a essas perguntas (em grupo ou individualmente) para avaliar a compreensão do estudante acerca do conteúdo.



CAPÍTULO 1

ALGUMAS FERRAMENTAS DA ÁREA

VISÃO GERAL

O Capítulo 1 apresenta aos estudantes algumas ferramentas da engenharia genética e as atividades de laboratório associadas oferecem uma experiência prática com algumas ferramentas e técnicas importantes usadas na biologia molecular. Os estudantes serão apresentados também às medidas volumétricas mais usadas nesse campo da ciência.

CONHECIMENTO PRÉVIO

Os estudantes já devem saber:

- A relação entre DNA, genes, proteínas e traços; mais especificamente que os genes têm o código para a produção de uma proteína e que as proteínas são moléculas usadas na fabricação e no funcionamento da célula, sendo, portanto, responsáveis pelos traços do organismo.
- Os objetos que têm carga elétrica, inclusive as moléculas, se movimentam através de um campo elétrico

OBJETIVOS DE APRENDIZADO

Ao final deste capítulo, os estudantes vão saber:

- Como usar corretamente micropipetas e a técnica de eletroforese em gel.
- Explicar a importância das micropipetas e da eletroforese em gel na engenharia genética.
- Descrever o modo como a eletroforese em gel separa o DNA.
- Explicar como a engenharia genética pode ser usada para tratar algumas doenças genéticas.

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

- Avalie a habilidade de usar micropipetas e aplicar a técnica da eletroforese em gel. Para isso, analise os trabalhos realizados por cada estudante nos Laboratórios 1.1 e 1.2 e as respostas à seção *PARE E PENSE*, do Laboratório 1.1 (página 15 do Guia do Estudante) e da primeira pergunta da seção *PARE E PENSE*, do Laboratório 1.2, Parte B (página 21 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar a importância das micropipetas e da eletroforese em gel na engenharia genética. Para isso, analise as respostas à primeira pergunta da seção *ANTES DO LABORATÓRIO*, do Laboratório 1.1 (página 13 do Guia do Estudante), à primeira pergunta da seção *ANTES DO LABORATÓRIO*, do Laboratório 1.2 (página 17 do Guia do Estudante) e à primeira pergunta da seção *PERGUNTAS do Capítulo 1* (página 22 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de descrever como a eletroforese em gel separa o DNA. Para isso, analise as respostas à segunda e à terceira pergunta da seção *PARE E PENSE*, do Laboratório 1.2, Parte B (página 21 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar como a engenharia genética pode ser usada para tratar algumas doenças genéticas. Para isso, analise as respostas à pergunta 2 da seção *PERGUNTAS do Capítulo 1* (página 22 do Guia do Estudante).

SEQUÊNCIA SUGERIDA DE ATIVIDADES

SESSÃO 1

- Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS do Capítulo 1**. (5 min)
- Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção *O QUE VOCÊ JÁ SABE?* e compartilhem as respostas. (10 min)
- Os estudantes devem realizar as atividades do Laboratório 1.1. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções *ANTES DO LABORATÓRIO* e *PARE E PENSE* e expliquem o raciocínio. (20 min)
- Peça a eles que leiam a introdução do Laboratório 1.2 e respondam às perguntas da seção *ANTES DO LABORATÓRIO*. (10 min)

SESSÃO 2

- Os estudantes devem realizar as atividades do Laboratório 1.2. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções *ANTES DO LABORATÓRIO* e *PARE E PENSE* e expliquem o raciocínio. (35 min)
- Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as *PERGUNTAS do Capítulo 1* e anotem as respostas individualmente. Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes. (10 min)

SESSÃO 3 (OPCIONAL)

- Os estudantes vão realizar as atividades do Laboratório 1.3 (Anexo 1). Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções *ANTES DO LABORATÓRIO* e *PARE E PENSE*, e expliquem o raciocínio. (45 min)

PREPARAÇÃO

Antes de começar, você deve se familiarizar com os procedimentos utilizados neste capítulo, com a preparação necessária e com os materiais que você vai usar. As instruções presumem que você vai precisar de materiais para 12 grupos de 2 ou 3 estudantes. Multiplique as quantidades de acordo com o número de estudantes e de turmas.

PREPARAÇÃO DE GEL DE AGAROSE PARA O LABORATÓRIO 1.2

RECURSOS: o vídeo [Making an agarose gel](#) (disponível no site do programa) apresenta o passo a passo do preparo e a moldagem do gel de agarose, conforme descrito a seguir⁸.

1. Reúna os seguintes materiais:
 - 6 moldes para gel de eletroforese
 - 6 pentes de 10 dentes para os poços
 - Opcional: fita adesiva
2. Monte os 6 moldes de gel para eletroforese e os 6 pentes. Prepare os moldes fixando as portas nas extremidades de cada bandeja para cima (caso a bandeja apresente esse recurso), ou colando as extremidades de cada bandeja com fita adesiva. Coloque um pente em cada molde antes de adicionar a solução de agarose.
3. Prepare a solução de agarose.
 - a. Reúna os seguintes materiais:
 - 1 proveta de 15 mL
 - 1 proveta de 250 mL
 - 1 Erlenmeyer de 250 mL, com a identificação “tampão SB 1x”
 - 1 Erlenmeyer de 500 mL com a identificação “Gel”
 - 12,5 mL de tampão de borato de sódio 20x (tampão SB 20x)
 - 237,5 mL de água destilada ou deionizada
 - 1,44 g de agarose
 - Balança de precisão
 - Filme plástico
 - Ponteira descartável
 - Micro-ondas
 - Luvas ou pinças resistentes ao calor
 - 6 sacos plásticos reutilizáveis de 1 litro com fecho hermético



⁸ N. do E.: pode-se configurar o vídeo para ser exibido com legendas em português.

- Coletor para descarte de ponteiros e tubos de microcentrifuga usados
- b. Prepare 250 mL de tampão de borato de sódio 1x (tampão SB 1x)
- Meça 12,5 mL de tampão SB 20x e adicione essa quantidade à proveta de 250 mL.
- Adicione água destilada ou deionizada até a marca de 250 mL.
- Transfira a mistura para um Erlenmeyer de 250 mL e o rotule como “Tampão SB 1x”.
- Agite gentilmente o Erlenmeyer para misturar.
- c. Meça 180 mL de tampão SB 1x com a proveta de 250 mL e reserve.
- d. Meça 1,44 g de agarose com a balança de precisão e coloque-a no Erlenmeyer de 500 mL com a identificação “Gel”. Adicione 180 mL de tampão SB 1x da etapa 3c para fazer uma solução de agarose a 0,8%.
- e. Cubra a boca do frasco de 500 mL com filme plástico. Use uma ponteira para fazer um furo pequeno no filme plástico.
- f. Coloque o frasco coberto no micro-ondas e aqueça por 1 minuto na potência alta. Usando luvas, agite o frasco suavemente.
- Você pode usar também uma placa aquecida com agitador para derreter a agarose.

SEGURANÇA: use luvas ou pinças resistentes ao calor para segurar o frasco.

- g. Continue levando o frasco ao micro-ondas em intervalos de 5 a 15 segundos até que toda a agarose esteja dissolvida. Para verificar se a agarose está completamente dissolvida, segure o frasco contra a luz e agite a solução. Procure cuidadosamente por “lentes”⁹ de cristais de agarose suspensas no líquido. Se não houver lentes, a agarose está dissolvida. Espere por 5 minutos a agarose esfriar até a temperatura aproximada de 60 °C antes de prosseguir para a etapa 4.



TÉCNICA DE LABORATÓRIO: não deixe a solução esfriar até o ponto em que a agarose comece a solidificar de novo. Se isso acontecer, entretanto, basta reaquecer a solução conforme descrito acima.



4. Molde os géis nas bandejas preparadas.

Quando a solução de agarose tiver esfriado até uma temperatura em que seja seguro tocar no fundo do frasco (aproximadamente 60 °C, o que levará cerca de 5 minutos), despeje 25 a 30 mL da solução de agarose em cada molde de gel para eletroforese.

- a. Insira os pentes na hora de moldar os géis. A solução deve cobrir cerca de 2 mm de cada pente.
- b. Assim que os géis se solidificarem (cerca de 30 minutos), retire o pente de cada gel. Puxe verticalmente sem balançar nem para a frente nem para trás. Isso vai minimizar os danos na parede frontal do poço.
- c. Remova os géis das bandejas de eletroforese e os armazene em sacos plásticos reutilizáveis individuais com uma pequena quantidade do tampão SB 1x restante da etapa 3b. Armazene tudo no refrigerador até o momento de usar. Importante: coloque o gel sobre uma superfície plana e lisa

⁹ N. do E.: pequenas cristalizações de agarose que provocam a refração da luz quando observamos a diluição.

porque as superfícies irregulares e com texturas vão deixar marcas nos géis, afetando o movimento das moléculas.

PREPARAÇÃO E MATERIAIS ADICIONAIS PARA O LABORATÓRIO 1.1

Prepare 12 conjuntos de materiais, de modo que cada um tenha:

1. Suporte de plástico com um tubo de microcentrífuga com uma solução de corante vermelho(Cor, do kit)
2. Micropipeta P-20
3. Caixa de ponteiras descartáveis
4. Folha plastificada para atividade de micropipetagem (do kit)
5. Coletor para descarte de ponteiras e tubos de microcentrífuga usados (1 coletor para cada 2 grupos)

PREPARAÇÃO E MATERIAIS ADICIONAIS PARA O LABORATÓRIO 1.2

1. Prepare 300 mL de tampão SB 1x.

TÉCNICA DE LABORATÓRIO: você deve preparar tampão SB 1x para todas as turmas que vão realizar este laboratório – basta multiplicar as quantidades fornecidas pelo número de turmas.



- a. Reúna os seguintes materiais:
 - 15 mL de tampão SB 20x
 - Erlenmeyer graduado de 500 mL com a identificação “tampão SB”
 - 285 mL de água destilada ou deionizada
 - 6 frascos graduados de 50 mL com a identificação “tampão SB”
 - b. Adicione 15 mL de tampão SB 20x ao frasco de 500 mL com a identificação “tampão SB”, adicione água destilada ou deionizada até a marca de 300 mL e misture.
 - c. Despeje 50 mL de tampão SB em cada frasco de 50 mL com a identificação “tampão SB”.
2. Pegue 12 conjuntos de 4 tubos (Cor, S1, S2 e S3) fornecidos no kit. Não se esqueça de devolver esses tubos ao kit depois do laboratório.
 3. Prepare 12 conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:
 - Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com os seguintes reagentes:
 - Tubo com corante vermelho (Cor)
 - Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante 1 (S1)
 - Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante 2 (S2)
 - Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante 3 (S3)

- Micropipeta P-20
 - Caixa de ponteiras descartáveis
 - 2 placas para pipetagem com 0,8% de gel de agarose
 - Coletor para descarte de ponteiras e tubos de microcentrífuga usados (1 coletor para cada 2 grupos)
4. Monte 6 cubas de eletroforese, cada uma perto de uma fonte de energia. Dois grupos vão compartilhar uma cuba. Quando as cubas estiverem montadas, coloque um gel de agarose em cada uma (preparado acima) e posicione um frasco de 50 mL com tampão SB 1x (preparado acima) perto de cada cuba.
 5. Coloque a microcentrífuga no centro da sala para que todos os grupos possam compartilhá-la.

PREPARAÇÃO E MATERIAIS ADICIONAIS PARA O LABORATÓRIO 1.3 (OPCIONAL)

Os materiais estão listados na atividade **Laboratório 1.3: como examinar a precisão de uma micropipeta (Anexo 1)**, no final deste guia.

1. Faça uma cópia do anexo do **Laboratório 1.3: como examinar a precisão de uma micropipeta (Anexo 1)** para cada estudante.
2. Pegue 12 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e identifique cada um deles como “dH₂O”.
3. Usando uma micropipeta P-200, dispense 200 µL de água destilada nos tubos “dH₂O”.
4. Prepare 12 conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:
 - Suporte de plástico com um tubo de microcentrífuga com dH₂O (preparado na etapa 3)
 - Micropipeta P-20
 - Caixa de ponteiras descartáveis
 - 8 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL vazios
 - Marcador permanente
 - Conta-gotas
 - Coletor para descarte de ponteiras e tubos de microcentrífuga usados (1 coletor para cada 2 grupos)
5. Coloque a microcentrífuga no centro da sala para que todos os grupos possam compartilhá-la.

METODOLOGIA DE ENSINO

SESSÃO 1

IDEIAS PRINCIPAIS: a biotecnologia requer o uso de ferramentas muito específicas e de habilidades avançadas de laboratório. As micropipetas servem para medir e transferir volumes muito pequenos de líquidos.



Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS do Capítulo 1** com os estudantes. (5 min)

A **INTRODUÇÃO** explica o objetivo principal do capítulo e o relaciona à introdução do programa. Os **OBJETIVOS do Capítulo 1** informam o foco de aprendizagem necessário aos estudantes durante as atividades propostas neste capítulo. Explique o que será avaliado no capítulo e quais são suas expectativas em relação ao desempenho dos estudantes.

Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** e compartilhem as respostas. (10 min)

A seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** ativa o conhecimento dos estudantes sobre biotecnologia e salienta o modo como a precisão é necessária para a realização de experimentos na área da biotecnologia. Divida os estudantes em duplas para que eles respondam às perguntas e registrem suas ideias. Isso vai ajudá-los a avaliar o que sabem e o que não sabem sobre biotecnologia e os procedimentos experimentais usados na área.

ATENÇÃO: o nível das respostas dos estudantes pode variar bastante, de acordo com seu conhecimento prévio. Por exemplo, estudantes das turmas mais avançadas de Biologia provavelmente terão mais conhecimento das diferentes ferramentas e técnicas biotecnológicas e uma compreensão mais profunda da necessidade de precisão.

Possíveis respostas às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?**:

1. Quais ferramentas e técnicas de biotecnologia você já usou? Para que você as usou?
As respostas poderão variar bastante de acordo com as experiências dos estudantes.
2. Por que a precisão é importante ao realizar procedimentos biotecnológicos?
A exatidão e precisão das medidas ajudam a garantir que os experimentos sejam bem-sucedidos e reproduzíveis.

Os estudantes devem realizar as atividades do **Laboratório 1.1**. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções **ANTES DO LABORATÓRIO** e **PARE E PENSE** e expliquem o raciocínio. (20 min)

Neste laboratório, os estudantes vão se familiarizar com o uso da micropipeta para aspirar e dispensar líquidos e comparar o tamanho relativo das quantidades medidas por uma micropipeta. Crie um sistema de gestão de materiais para os estudantes seguirem. Os estudantes serão responsáveis por pegar e devolver seus kits.

Os estudantes vão discutir em grupos as perguntas da seção *ANTES DO LABORATÓRIO* e anotar as respostas individualmente. Os estudantes devem compartilhar as respostas com a turma.

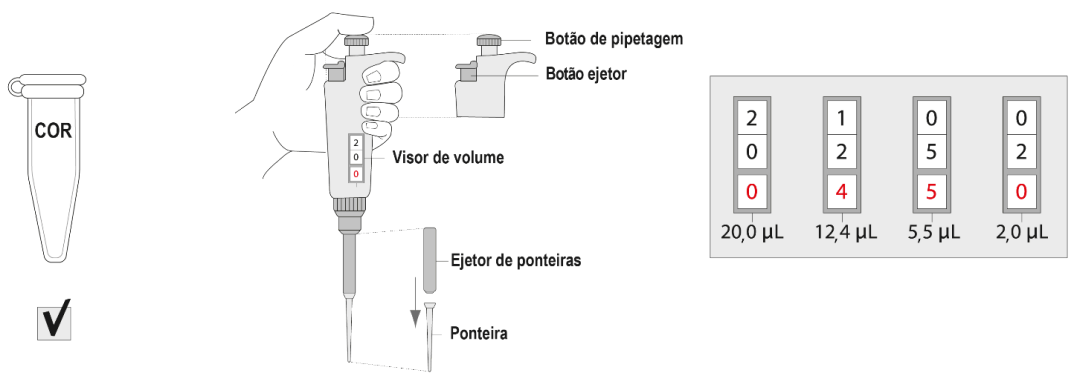
ESTRATÉGIA: para os laboratórios do Capítulo 1, talvez seja interessante mostrar aos estudantes um modelo de fluxograma e explicar como ele pode ser usado para ajudá-los a se lembrar das etapas necessárias para a realização do laboratório, em vez de pedir a eles que sigam os *Métodos* de laboratório passo a passo.



Possíveis respostas às perguntas da seção *ANTES DO LABORATÓRIO*:

1. Por que você acha necessário usar volumes muito pequenos e exatos de reagentes na biotecnologia?
Nesta área, você vai usar quantidades muito pequenas de reagentes. As medidas corretas das quantidades de reagentes são necessárias para garantir o sucesso dos procedimentos.
2. Vá até a seção *Métodos*, leia as páginas 13 a 15 do Guia do Estudante e faça uma breve descrição das etapas, usando palavras e um fluxograma. *As respostas vão variar. O fluxograma dos estudantes pode ser parecido com o apresentado a seguir.*

Laboratório 1.1 Fluxograma



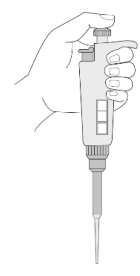
Verificar o reagente (Cor)



Rever micropipeta (MP)



Praticar configuração de volume da MP para 20,0 μL; 12,4 μL; 5,5 μL e 2,0 μL



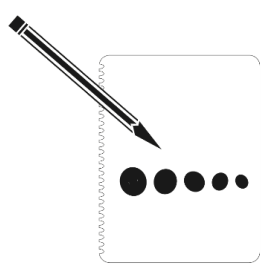
Prática de micropipetagem:

Nome	20,0 μL	15,0 μL	10,0 μL	5,0 μL	2,0 μL
1. _____	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. _____	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. _____	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. _____	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Pipetar 20,0 μL de Cor na folha plastificada



Pipetar outras quantidades de Cor na folha plastificada



Desenhar tamanhos das quantidades de Cor no caderno

Antes de começar o laboratório, faça uma breve revisão da seção *Métodos*, revise as partes da micropipeta (**Figura 1.1** da página 12 do Guia do Estudante) e mostre como usar esse instrumento.

RECURSOS: o vídeo [Loading a micropipette](#) (disponível no site do programa) mostra como usar a micropipeta¹⁰.



TÉCNICA DE LABORATÓRIO: repasse com os estudantes as seguintes instruções:

- **Segure o tubo na altura dos olhos para verificar se a solução foi aspirada e dispensada corretamente.**
- **Ao carregar a pipeta, sempre pressione o botão de pipetagem até a primeira parada antes de colocar a ponteira no líquido. Isso evita o vazamento de bolhas de ar no líquido.**



Durante o laboratório, os estudantes devem discutir em grupos as perguntas da seção *PARE E PENSE* e anotar as respostas individualmente. (As perguntas da seção *PARE E PENSE* ajudam os estudantes a manter o foco no objetivo do laboratório). Peça a eles que compartilhem as respostas a cada pergunta e a reflexão.

Possíveis respostas às perguntas da seção *PARE E PENSE*:



- Ao aspirar e dispensar uma solução, por que é importante observar a solução entrando ou saindo da ponteira?
As quantidades são muito pequenas e é fácil confundir e executar as etapas na ordem errada, por isso é importante verificar se a solução entrou e saiu da ponteira. Se estiver faltando um reagente, todo o experimento será invalidado.
- De acordo com as instruções de pipetagem, você deve evitar o contato com as ponteiras. Por exemplo, não use as mãos para encaixar a ponteira na pipeta, segure a micropipeta verticalmente, use o botão ejetor para remover a ponteira e deixe a caixa de ponteiras fechada. Se você estivesse trabalhando com plasmídeos e células de bactérias, por que essas precauções seriam importantes?
As ponteiras e todas as superfícies precisam estar limpas para que os plasmídeos e as células bacterianas não sejam contaminadas com outras substâncias. Além disso, você não vai querer se contaminar nem contaminar as superfícies com bactérias.

ESTRATÉGIA: durante a discussão, empregue as seguintes práticas:

- **Dê aos estudantes tempo para refletir sobre as respostas dos colegas.**
- **Peça esclarecimentos.**
- **Peça explicações.**
- **Reformule frases.**
- **Peça exemplos.**
- **Peça evidências.**
- **Forneça exemplos e contraexemplos.**
- **Peça aos estudantes que complementem uma explicação.**
- **Peça aos estudantes que avaliem uma resposta.**



¹⁰ N. do E.: pode-se configurar o vídeo para ser exibido com legendas em português.

Peça aos estudantes que leiam a introdução do Laboratório 1.2 e respondam às perguntas da seção ANTES DO LABORATÓRIO. (10 min)

Lendo essa introdução, os estudantes foram apresentados à técnica da eletroforese em gel. Explique que, neste laboratório, eles vão praticá-la usando corantes para se familiarizarem com essa técnica. Se for relevante, diga aos estudantes que, no Capítulo 4 ou 4A, eles vão usar essa técnica com moléculas de DNA para verificar se estão trabalhando com o plasmídeo correto.

SESSÃO 2

IDEIAS PRINCIPAIS: quem atua na engenharia genética usa ferramentas muito específicas e tem habilidades de laboratório avançadas. A eletroforese em gel permite a visualização de pequenas quantidades de DNA. Com o uso dessa técnica, os cientistas conseguem separar e identificar os pedaços do DNA com os quais estão trabalhando.



Os estudantes devem realizar as atividades do Laboratório 1.2. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções ANTES DO LABORATÓRIO e PARE E PENSE, e expliquem o raciocínio. (35 min)

Deixe que os estudantes compartilhem com a turma as respostas às perguntas da seção ANTES DO LABORATÓRIO.

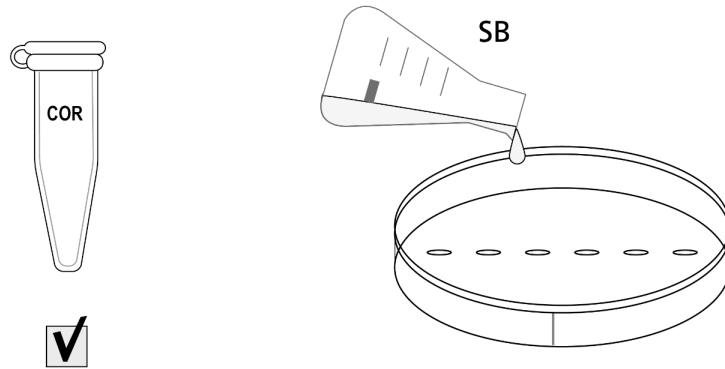
ESTRATÉGIA: para o laboratório, você pode mostrar os modelos de fluxograma das páginas 54 e 55 deste guia, em vez de pedir aos estudantes que criem seus próprios fluxogramas.



Possíveis respostas às perguntas da seção ANTES DO LABORATÓRIO:

1. Em que circunstâncias pode ser importante usar a eletroforese em gel para separar e identificar plasmídeos e pequenos pedaços lineares de DNA?
Isso é importante nos casos em que estamos criando um plasmídeo recombinante e precisamos verificar se o experimento deu certo.
2. Vá até a seção Métodos, leia as páginas 18 a 21 do Guia do Estudante e faça uma breve descrição das etapas da Parte A e da Parte B, usando palavras e um fluxograma.
As respostas vão variar. Os fluxogramas dos estudantes podem ser parecidos com os das páginas 54 e 55 deste guia.

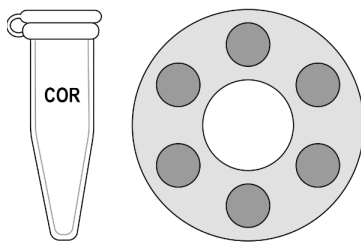
Laboratório 1.2 Fluxograma da Parte A



Verificar o reagente (Cor)



Cobrir o gel nas placas para prática de pipetagem com tampão SB



Centrifugar o tubo Cor

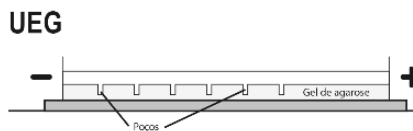


Pipetar 10,0 μL de Cor em cada poço da placa

Laboratório 1.2 Fluxograma da Parte B

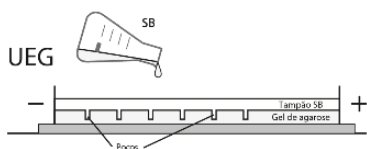


Verificar reagentes
(S1, S2, e S3)

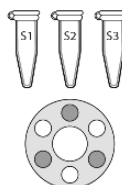


Descobrir quais poços
nosso grupo vai usar

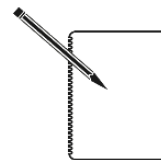
Conferir a
unidade de eletroforese
em gel (UEG)



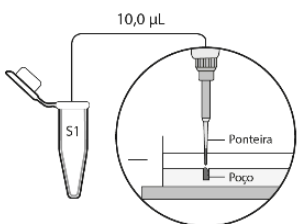
Cobrir o gel
na UEG com SB



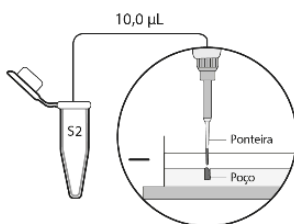
Centrifugar
S1, S2, e S3



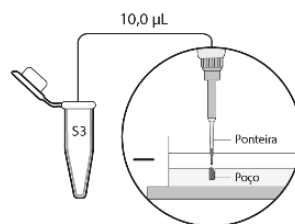
Desenhar o local de
cada poço e identificar
sua solução no caderno



Pipetar 10,0 µL
de S1 no poço na UEG



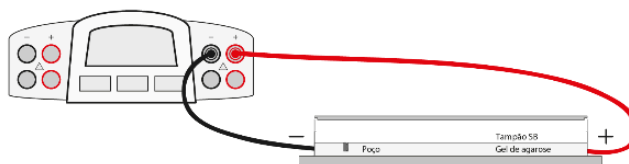
Pipetar 10,0 µL
de S2 no poço na UEG



Pipetar 10,0 µL
de S3 no poço na UEG



Tampar
a UEG



Conectar os cabos

Ligar a fonte de energia e
configurar a tensão
entre 130–135 V

Correr o gel
por 10 minutos



Remover a tampa
da UEG



Desenhar o local
relativo das bandas e
suas cores no caderno

Antes de começar o laboratório, faça uma breve revisão da seção *Métodos*, revise a unidade de eletroforese em gel (**Figura 1.3** da página 16 do Guia do Estudante) e demonstre o uso.

RECURSOS: O vídeo [Working with small volumes using a micropipette](#) mostra como misturar os líquidos com a micropipeta. O vídeo [Using a gel electrophoresis box](#) mostra como montar o equipamento de eletroforese e o vídeo [Loading an agarose gel](#) mostra como pipetar as soluções nos poços. Esses três vídeos estão disponíveis no site do programa¹¹.



Durante o laboratório, os estudantes devem discutir em grupos as perguntas da seção PARE E PENSE e anotar as respostas individualmente. Deixe que os estudantes compartilhem com a turma as respostas e reflexões durante o laboratório.

Possíveis respostas às perguntas da seção *PARE E PENSE*:



- Estude os resultados da eletroforese em gel. Qual amostra de solução continha um único corante: S1, S2 ou S3? Como você sabe?
O S3 continha um único corante porque tinha uma única banda.
- Qual é a carga elétrica dos corantes? Explique o raciocínio.
Os corantes têm carga negativa porque são repelidos pelo eletrodo negativo e atraídos para o eletrodo positivo.
- Os corantes que você está separando são alaranjado G (amarelo), azul de bromofenol (roxo) e xileno cianol (azul). Se o formato e a carga elétrica da molécula dos três corantes são iguais, qual é a ordem dos corantes das moléculas mais pesadas para as mais leves, com base em seus resultados iniciais? Por que você acha que essa é a ordem correta?
Das moléculas mais pesadas para as mais leves: xileno cianol, azul de bromofenol e alaranjado G. Esta ordem está baseada na cor das bandas no gel de agarose depois de executar a eletroforese em gel. O corante azul é o que está mais próximo dos poços, o roxo está um pouco mais próximo e o amarelo está mais distante dos poços.

¹¹ N. do E.: pode-se configurar os vídeos para serem exibidos com legendas em português.

CONHECIMENTO CIENTÍFICO:

MOVIMENTO DOS CORANTES NA ELETROFORESE EM GEL

Provavelmente, a ordem apresentada pelos estudantes não será a correta, pois os corantes utilizados neste laboratório possuem razão carga-massa diferentes. Embora as moléculas mais pesadas se movam mais lentamente do que as moléculas mais leves, se as duas tiverem a mesma carga elétrica, as moléculas com mais carga negativa vão se mover mais rapidamente do que as moléculas com menos carga negativa, caso ambas tenham o mesmo peso. Os pesos moleculares dos corantes são: 408,40 unidades atômicas (ua) para o alaranjado G, 669,98 ua para o azul de bromofenol e 538,62 para o xileno cianol. No entanto, o xileno cianol migra mais lentamente do que o azul de bromofenol embora seja mais leve, porque o azul de bromofenol tem uma razão maior de carga para massa.

Outro fator que afeta a distância percorrida pelo gel é a forma. Moléculas mais longas ou ramificadas vão se emaranhar no gel e se movimentar mais lentamente do que as moléculas mais curtas ou mais compactas, ainda que tenham o mesmo peso e carga elétrica. No Capítulo 4, os estudantes vão separar pedaços lineares de DNA e DNA plasmidial. Todas as moléculas de DNA têm a mesma razão de carga para massa, então o movimento do DNA é determinado exclusivamente pela massa e forma.

INDO ALÉM: talvez você queira aprofundar sua compreensão dos fatores que influenciam a distância percorrida no gel, indo além do que é apresentado no guia do Estudante. Pode-se utilizar o exemplo dos corantes para ilustrar o conceito de razão carga-massa.



Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as PERGUNTAS do Capítulo 1 e anatem as respostas individualmente. Discuta as respostas com a turma. (10 min)

Os estudantes vão refletir sobre as ferramentas que utilizaram e sua compreensão do processo de engenharia genética, respondendo às *PERGUNTAS do Capítulo 1*.

Possíveis respostas às *PERGUNTAS do Capítulo 1*:

1. Por que é útil usar uma micropipeta para medir reagentes na biotecnologia em vez de outro instrumento medidor?
As micropipetas são usadas para transferir quantidades muito pequenas e exatas de reagentes.
2. O que os resultados da eletroforese em gel nos informam a respeito das amostras de DNA que separamos?
A eletroforese em gel é usada para separar e identificar plasmídeos e pequenos pedaços lineares de DNA; por meio desse procedimento é possível saber informações como tamanho, carga e/ou formato das moléculas

ESTRATÉGIA: Durante a discussão, empregue as seguintes práticas:



- Dê aos estudantes tempo para refletir sobre as respostas dos colegas.
- Peça esclarecimentos.
- Peça explicações.
- Reformule frases.
- Peça exemplos.
- Peça evidências.
- Forneça exemplos e contraexemplos.
- Peça aos estudantes que complementem uma explicação.
- Peça aos estudantes que avaliem uma resposta.

SESSÃO 3 (OPCIONAL)

IDEIAS PRINCIPAIS: A micropipeta é consideravelmente mais precisa do que o conta-gotas.

Os estudantes realizarão as atividades do Laboratório 1.3 (Anexo 1). Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções **ANTES DO LABORATÓRIO** e **PARE E PENSE**, e expliquem o raciocínio. (45 min)

Os estudantes vão discutir em grupos as perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO** e anotar as respostas individualmente. Deixe que os estudantes compartilhem com a turma as respostas às perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO**.

Possíveis respostas às perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO**:

1. Por que a precisão é importante no processo de engenharia genética?
A precisão é necessária para misturar as quantidades corretas de reagentes; do contrário, o procedimento pode não funcionar.
2. Leia a seção *Métodos*, a seguir, e faça uma breve descrição das etapas usando palavras e um fluxograma.
As respostas vão variar. O fluxograma dos estudantes pode ser parecido com o apresentado a seguir.

Durante o laboratório, os estudantes devem discutir em grupos as perguntas da seção **PARE E PENSE e anotar as respostas individualmente. Peça a eles que compartilhem as respostas a cada pergunta e a reflexão.**

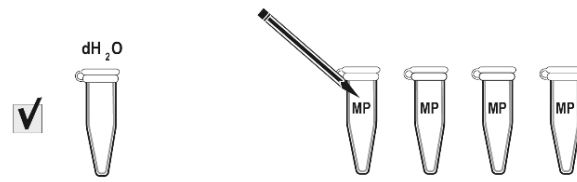
Possível resposta à pergunta da seção **PARE E PENSE**:

O que acontece quando a água é centrifugada? Por que a centrifugação é importante ao manipular pequenas quantidades de líquido?

Como o líquido fica decantado no fundo do tubo, com a centrifugação fica mais fácil dispensá-lo do tubo ou misturá-lo se houver adição de outro reagente ao tubo.



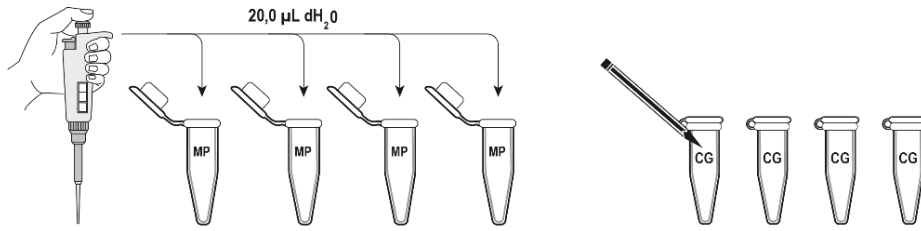
Laboratório Fluxograma 1.3



Verificar reagente (dH_2O)



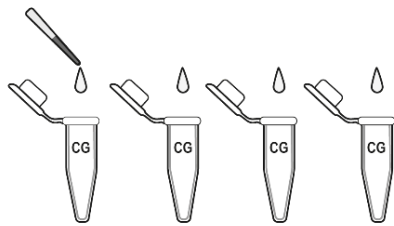
Identificar 4 tubos MP



Pipetar $20,0 \mu L dH_2O$ em cada tubo



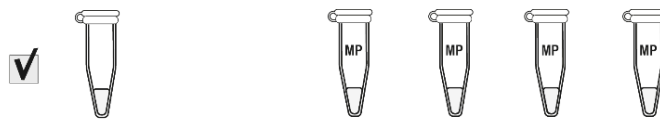
Identificar 4 tubos CG



Dispensar 1 gota de dH_2O do conta-gotas em cada tubo CG



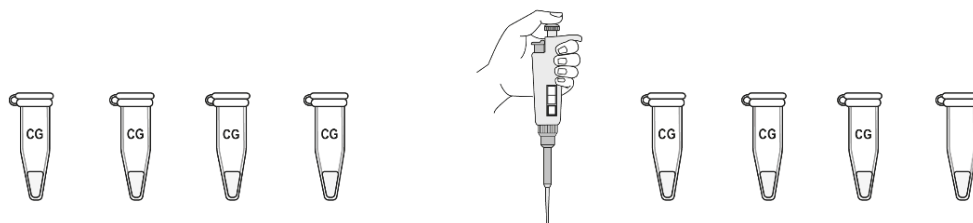
Centrifugar os 8 tubos



Verificar se há água no fundo dos tubos



Comparar as quantidades nos tubos MP



Comparar as quantidades nos tubos CG



Usar micropipeta para medir a quantidade nos tubos

CAPÍTULO 2

COMO COMEÇAR A CLONAR UM GENE?

VISÃO GERAL

Neste capítulo, os estudantes vão aprender sobre as ferramentas biológicas essenciais usadas na engenharia genética: os plasmídeos e as enzimas de restrição. Os estudantes vão realizar uma atividade no papel em que vão determinar a enzima de restrição que deve ser usada para criar um novo plasmídeo recombinante. Os estudantes vão realizar uma atividade de laboratório, Laboratório 2A, em que vão usar as enzimas de restrição BamHI e HindIII para digerir o plasmídeo pARA-R. Na preparação do laboratório, os estudantes vão descrever os fragmentos de DNA que resultarão do protocolo de laboratório.

CONHECIMENTO PRÉVIO

Os estudantes já devem saber:

- O DNA é uma molécula de fita dupla (dupla hélice) e cada fita de DNA é formada por subunidades com ligações covalentes chamadas nucleotídeos.
- O nucleotídeo é formado por um açúcar, um grupo fosfato e uma base nitrogenada. Existem 4 bases nitrogenadas diferentes: citosina, guanina, adenina e timina.
- Os nucleotídeos são ligados uns aos outros por uma estrutura de açúcar-fosfato, enquanto as bases nitrogenadas se projetam para fora da estrutura.
- As duas fitas de DNA são unidas por ligações de hidrogênio entre bases nitrogenadas adjacentes, que são chamadas pares de bases. A citosina sempre faz par com a guanina, e a adenina sempre faz par com a timina.
- O processo de decodificação do DNA tem duas etapas: a transcrição, que transfere as informações codificadas no DNA para o RNA mensageiro, e a tradução, etapa em que as informações carregadas pelo RNA mensageiro são usadas para produzir as proteínas.

OBJETIVOS DE APRENDIZADO

Ao final deste capítulo, os estudantes vão saber:

- Descrever as características dos plasmídeos.
- Explicar como os plasmídeos são usados na clonagem de genes.
- Descrever a função das enzimas de restrição.
- Explicar como usar as enzimas de restrição para criar um plasmídeo recombinante.

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

- Avalie a capacidade de cada estudante de descrever as características dos plasmídeos. Para isso, analise as respostas à pergunta 2 da seção *PERGUNTAS SOBRE A ATIVIDADE* (página 36 do Guia do Estudante) e às perguntas 1, 3 e 5 da seção de *PERGUNTAS do Capítulo 2A*.
- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar como os plasmídeos são usados na clonagem de um gene. Para isso, analise as respostas à pergunta 4 da seção de *PERGUNTAS do Capítulo 2A* (página 41 do Guia do Estudante).

- Avalie a capacidade de cada estudante de descrever a função das enzimas de restrição. Para isso, analise as respostas à pergunta 2 da seção de *PERGUNTAS do Capítulo 2A* (página 41 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar como as enzimas de restrição são usadas para criar um plasmídeo recombinante. Para isso, analise as respostas às perguntas 1 e 3 da seção de *PERGUNTAS SOBRE A ATIVIDADE* (página 36 do Guia do Estudante).

SEQUÊNCIA SUGERIDA DE ATIVIDADES

SESSÃO 1

- Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS do Capítulo 2A** com os estudantes. (2 min)
- Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção *O QUE VOCÊ JÁ SABE?* e compartilhem as respostas. (5 min)
- Apresente e discuta a seção **Seu desafio**. (3 min)
- Peça aos estudantes que leiam os textos **Como começar a clonar um gene** e **Como produzir proteínas terapêuticas humanas em bactérias** e depois respondam às perguntas da seção *REFLITA*. (20 min)
- Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes às perguntas da seção *REFLITA* sobre o texto **Como começar a clonar um gene**. (10 min)
- Apresente a série de laboratórios do programa ABE que a turma vai seguir. (5 min)

SESSÃO 2 (OPCIONAL)

- Os estudantes devem realizar uma das três atividades opcionais: (1) Fazer uma pesquisa na Internet sobre um produto farmacêutico produzido, usando um processo recombinante, (2) Fazer uma pesquisa na Internet sobre um problema bioético relacionado à engenharia genética, depois debater o problema ou escrever um artigo de opinião ou para um blog ou (3) Extrair um DNA. (45 min)

SESSÃO 3

- Os estudantes vão realizar a atividade **Vamos clonar o gene** e discutir a pergunta da seção *PARE E PENSE* enquanto trabalham. (25 min)
- Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que respondam às *perguntas sobre a atividade* e anotem as respostas individualmente. (10 min)
- Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes a todas as perguntas. (10 min)

SESSÃO 4

- Os estudantes vão realizar o Laboratório 2A. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções *ANTES DO LABORATÓRIO* e *PARE E PENSE*, e expliquem o raciocínio. (25 min)
- Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as *PERGUNTAS do Capítulo 2A* e anotem as respostas individualmente. (10 min)
- Discuta as respostas com a turma. (10 min)

PREPARAÇÃO

Antes de começar, você deve se familiarizar com os procedimentos utilizados neste capítulo, como a preparação necessária e os materiais que você vai usar. As instruções presumem que você vai precisar de materiais para 12 grupos de 2 ou 3 estudantes. Multiplique as quantidades de acordo com o número de estudantes e de turmas.

TÉCNICA DE LABORATÓRIO: com exceção da água destilada, todos os reagentes do Capítulo 2A devem ser armazenados no freezer até o preparo para os estudantes.



FAÇA CÓPIAS DAS FOLHAS DE ATIVIDADES E REÚNA OS MATERIAIS PARA A ATIVIDADE “VAMOS CLONAR O GENE”

Você vai precisar de duas folhas de atividades para cada dupla de estudantes: **Diagrama do plasmídeo (Anexo 2)** e **Sequência do DNA humano (Anexo 3)**. Os anexos para as atividades estão disponíveis no final deste guia. Entregue uma tesoura e um rolo de fita adesiva a cada dupla. Os estudantes vão usar esses materiais para construir um modelo de papel de um plasmídeo recombinante com o gene da insulina.

PREPARAÇÃO DA ALÍQUOTA DOS REAGENTES PARA O LABORATÓRIO 2A

A preparação da alíquota dos reagentes pode ser feita vários dias antes do Laboratório 2A.

1. Retire os seguintes reagentes do freezer e deixe descongelar por 15 minutos:
 - Tampão de restrição 2,5x (T 2,5x)
 - Plasmídeo pARA-R (pR-2A)
 - Enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (ER)
2. Coloque identificações nos tubos de microcentrifuga da seguinte maneira:
 - 12 tubos de 1,5 mL com a identificação “T 2,5x”
 - 12 tubos de 1,5 mL com a identificação “pR-2A”
 - 12 tubos de 1,5 mL com a identificação “ER”
 - 12 tubos de 1,5 mL com a identificação “dH₂O”
3. Passe os tubos com T 2,5x e ER pelo agitador Vortex antes de preparar a alíquota para os tubos que serão usados pelos grupos. Se você não tiver um agitador Vortex, dê várias batidas leves com o dedo no tubo para misturar, depois o leve até a microcentrifuga.
4. Pipete os reagentes nos tubos de microcentrifuga:
 - 12,0 µL do tampão de restrição nos tubos marcados “T 2,5x”
 - 10,0 µL de solução de plasmídeo pARA-R (70 ng/µL) nos tubos marcados “pR-2A”
 - 3,0 µL de ER nos tubos marcados “ER”
 - 1.000,0 µL de dH₂O nos tubos marcados “dH₂O”

5. Depois de preparar a alíquota, armazene os reagentes no refrigerador até o início da aula em que serão usados.

MONTAGEM E CALIBRAÇÃO DO BANHO-MARIA PARA O LABORATÓRIO 2A

Um dia antes do Laboratório 2A, monte e calibre o banho-maria para 37 °C e, assim, garantir a temperatura correta para a incubação das digestões por enzima de restrição realizadas pelos estudantes. É importante que a temperatura não seja superior a 37 °C, pois isso causará a desnaturação da enzima. Se necessário, é melhor errar para menos. Não se esqueça de usar água destilada no banho-maria.

1. Reúna os seguintes materiais:
 - Equipamento de banho-maria
 - Termômetro
 - Suporte flutuante para tubo de microcentrífuga
 - Cronômetro
2. Coloque o banho-maria no centro da sala para que todos os grupos possam compartilhá-lo.
3. Encha o banho-maria com água destilada e coloque o termômetro dentro dele. Aqueça a água até 37 °C, mantendo o banho-maria coberto para reduzir a evaporação.
4. Deixe o suporte flutuante para tubo de microcentrífuga (para segurar os tubos no banho-maria) e o cronômetro sobre a mesa, ao lado do banho-maria.
5. Se as turmas forem realizar o Laboratório 5A, deixe o banho-maria montado e calibrado para 42 °C um dia antes do laboratório. (Certifique-se de haver água suficiente no banho-maria e de cobri-lo para reduzir a evaporação).

REÚNA OS MATERIAIS PARA O LABORATÓRIO 2A

Reúna os materiais no dia do laboratório. Depois de preparar os suportes com os reagentes, armazene no refrigerador até o momento de serem utilizados pelos estudantes.

1. Prepare 12 conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:
 - Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com os seguintes reagentes (preparados acima):
 - Tubo com T 2,5x
 - Tubo de microcentrífuga com o plasmídeo pARA-R (pR-2A)
 - Tubo com ER
 - Tubo com dH₂O
 - Micropipeta P-20
 - Caixa de ponteiras descartáveis
 - 2 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL vazios
 - Marcador permanente
 - Coletor para descarte de ponteiras e tubos de microcentrífuga usados (1 coletor para cada 2 grupos)
2. Coloque a microcentrífuga no centro da sala para que todos os grupos possam compartilhá-la.

METODOLOGIA DE ENSINO

SESSÃO 1

IDEIAS PRINCIPAIS: os plasmídeos são vetores ideais para uso na engenharia genética porque são capazes de se replicar nas células bacterianas, têm uma sequência chamada promotor que permite que um gene próximo seja transcrito e traduzido, carregam um gene de resistência a antibióticos que pode ser usado como marcador selecionável e podem ser transferidos para as bactérias por um processo chamado conjugação. A criação de um plasmídeo recombinante que contenha o DNA de outra espécie é realizada pela ação das enzimas de restrição. As enzimas de restrição conseguem cortar um gene de interesse do DNA humano e cortar o plasmídeo. Os 2 pedaços de DNA podem ser unidos. Algumas enzimas de restrição cortam o DNA de modo assimétrico em sequências específicas, deixando fitas com as extremidades soltas. Essas extremidades são chamadas de “extremidades coesivas”.



Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS do Capítulo 2A** com os estudantes. (2 min)

A **INTRODUÇÃO** explica o objetivo principal deste capítulo e o relaciona à introdução do programa. Os **OBJETIVOS do Capítulo 2A** informam o foco de aprendizagem necessário aos estudantes durante as atividades propostas neste capítulo. Explique o que será avaliado neste capítulo e quais são as expectativas em relação ao desempenho dos estudantes.

Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** e compartilhem as respostas. (5 min)

Ao responderem às perguntas dessa seção, os estudantes vão ativar seu conhecimento sobre DNA e sobre como os plasmídeos e as enzimas de restrição são usados na engenharia genética, além de revelar as lacunas em seu conhecimento. Divida a turma em duplas e peça a eles que respondam às perguntas, anotem suas respostas e compartilhem suas ideias para que você possa avaliar o que sabem e o que não sabem.

Possíveis respostas às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?**:

1. Qual é a estrutura e a função do DNA? Descreva em palavras ou faça um desenho da estrutura de uma molécula de DNA. Seja o mais detalhista possível.
O DNA é uma molécula de fita dupla. Cada fita de DNA é formada por nucleotídeos. Existem quatro nucleotídeos diferentes, que são distintos por uma subparte chamada base. As bases são: citosina, guanina, adenina e timina. As duas fitas de DNA são unidas por ligações de hidrogênio entre bases adjacentes, que são chamadas de pares de bases. Nesses pares de bases, a citosina sempre faz par com a guanina, e a adenina sempre faz par com a timina. As fitas duplas e as ligações de hidrogênio fracas entre esses pares de bases garantem que o DNA possa ser desenrolado e copiado. Os quatro nucleotídeos diferentes possibilitam a criação de sequências que codificam as estruturas das proteínas.
2. Todos os organismos vivos têm DNA. De que forma o DNA de organismos diferentes é o mesmo e de que forma ele varia?
Todo DNA tem a mesma estrutura e usa o mesmo código e processos de transcrição e tradução. Entre organismos diferentes, as sequências de DNA vão variar porque os organismos produzem proteínas diferentes.

3. Usando seu conhecimento sobre genes e como são expressos, explique por que uma célula bacteriana consegue produzir proteína humana a partir das instruções codificadas em um gene humano?
Como o DNA de todos os organismos usa o mesmo código e processos de transcrição e tradução, a célula bacteriana consegue criar uma proteína humana a partir de um gene humano.
4. Os cientistas usam duas ferramentas biológicas para levar organismos a produzir novas proteínas: os plasmídeos e as enzimas de restrição. Como essas ferramentas podem ser úteis na criação de uma nova proteína?
As enzimas de restrição são capazes de cortar um gene humano e cortar um plasmídeo, e esses dois pedaços podem se unir para formar um plasmídeo recombinante, que é inserido em uma bactéria.

Apresente e discuta a seção **Seu desafio**. (3 min)

Peça aos estudantes que leiam a seção **Seu desafio** e discutam sobre o que vão fazer nesses laboratórios.

Peça aos estudantes que leiam os textos **Como começar a clonar um gene e Como produzir proteínas terapêuticas humanas em bactérias**, depois respondam às perguntas da seção **REFLITA**. (20 min)

Nesse texto, os estudantes vão aprender por que os plasmídeos são uma ferramenta ideal para inserir um gene humano nas bactérias e como as enzimas de restrição são usadas para criar um plasmídeo recombinante. Peça aos estudantes que anotem as respostas às perguntas da seção **REFLITA** em seus cadernos. Lembre a turma de consultar o **Glossário** para descobrir o significado dos termos científicos que eles não conhecem.

Promova uma discussão sobre as respostas às perguntas da seção **REFLITA** associadas ao texto **Como começar a clonar um gene**. (10 min)

Avalie o conhecimento dos estudantes sobre DNA e sobre como os plasmídeos e as enzimas de restrição são usados na engenharia genética. Para isso, analise as respostas dos estudantes às perguntas da seção **REFLITA**.

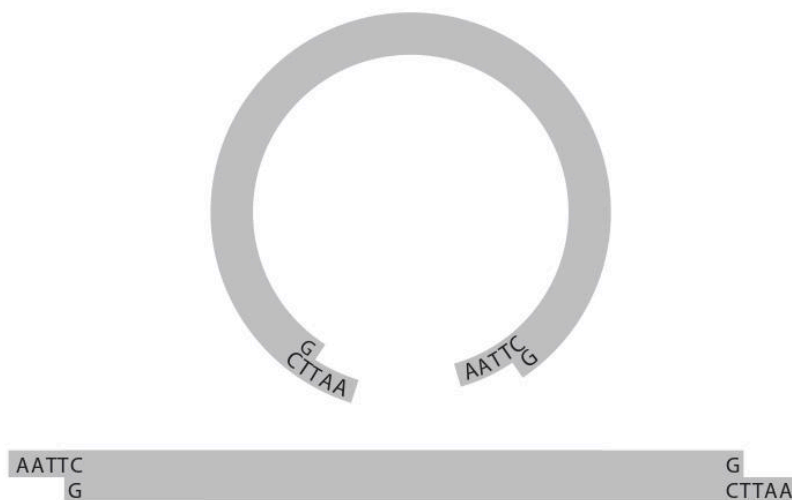
Possíveis respostas às perguntas da seção **REFLITA**:

- Use seus conhecimentos sobre seleção natural e evolução para descrever o modo como os plasmídeos podem conferir uma vantagem seletiva à bactéria hospedeira.
Se uma bactéria carrega um plasmídeo com um gene de resistência a um antibiótico, ela sobreviverá quando exposta ao antibiótico. Isso lhe confere uma vantagem seletiva sobre as bactérias que não carregam aquele plasmídeo. As bactérias sem o plasmídeo serão mortas quando expostas ao antibiótico.
- Como as bactérias que carregam uma enzima de restrição evitam que seu próprio DNA seja cortado?
As bactérias podem ter uma forma de proteger seu próprio DNA em sequências nas quais ele pode ser cortado pela enzima de restrição ou seu DNA pode não ter a sequência que é cortada pela enzima de restrição.
- Qual é a sequência da extremidade coesiva resultante quando o DNA é cortado com a enzima *BamHI*? E com a enzima *HindIII*?
*A extremidade solta resultante da digestão por *BamHI* é a GATC. A extremidade solta resultante da digestão por *HindIII* é a AGCT.*
- Os cientistas podem modificar os plasmídeos para que tenham um único sítio de enzima de restrição. Imagine que você tem um plasmídeo com um único sítio da



enzima *EcoRI*. Desenhe a estrutura do plasmídeo depois de ter sido cortado com a enzima e mostre as sequências de nucleotídeos deixadas no sítio do corte. Se você quiser inserir um gene de uma planta nesse local, qual enzima deve usar para cortar o DNA da planta? Explique sua resposta.

Existem duas maneiras possíveis de representar um plasmídeo cortado com EcoRI:



Você usaria a enzima de restrição EcoRI para cortar o gene da planta. As extremidades do gene podem se alinhar às extremidades do plasmídeo.

ESTRATÉGIA: os desenhos dos estudantes podem variar e você vai querer comparar representações diferentes. Como o plasmídeo é um objeto tridimensional, os estudantes podem ter dificuldade de visualizar uma mudança na estrutura, como um corte. Por exemplo, na segunda representação do plasmídeo cortado, a extremidade é invertida e a sequência também. Se necessário, faça modelos de papel do plasmídeo e peça aos estudantes que realizem o corte no modelo.



ESTRATÉGIA: Durante a discussão, empregue as seguintes práticas:

- Dê aos estudantes tempo para refletir sobre as respostas dos colegas.
- Peça esclarecimentos.
- Peça explicações.
- Reformule frases.
- Peça exemplos.
- Peça evidências.
- Forneça exemplos e contraexemplos.
- Peça aos estudantes que complementem uma explicação
- Peça aos estudantes que avaliem uma resposta



Apresente a série de laboratórios do programa ABE que a turma vai seguir. (5 min)

Revise a sequência de laboratórios do programa ABE que você vai realizar. Embora os estudantes talvez não tenham a oportunidade de realizar todos os laboratórios, é importante que saibam como seu trabalho se enquadra no “cenário geral” do desenvolvimento de organismos geneticamente modificados para criar produtos para uso em humanos. Veja a **Figura 2A.4** (página 33 do Guia do Estudante), que mostra a produção de uma proteína terapêutica humana. Informe as partes do processo que eles vão realizar em suas sequências de laboratórios e descreva os desafios específicos dos estudantes (veja a **Tabela VG.1** na página 10 deste guia).

CONHECIMENTO CIENTÍFICO:

POR QUE INCLUIR PROMOTORES BACTERIANOS NOS PLASMÍDEOS?

Todos os genes têm promotores próprios, então por que incluir um promotor quando estamos construindo um vetor plasmidial? O mecanismo da transcrição de um gene é o mesmo em todos os organismos: a RNA-polimerase se liga a um promotor específico e copia a sequência de DNA do gene no RNA mensageiro. No entanto, a sequência de DNA dos promotores e a estrutura das RNA-polimerases podem variar; assim, a RNA-polimerase bacteriana não vai reconhecer nem se ligar a um promotor humano. Talvez o mais importante seja que, como muitos genes eucarióticos contêm íntrons e éxons, muitos genes humanos que foram clonados, como o da insulina, não são extirpados diretamente do DNA genômico. Em vez disso, o DNA é sintetizado pela transcriptase reversa a partir do RNAm do gene de interesse. É essa cópia do DNA (cDNA) que é clonada. Esses cDNAs não têm um promotor e, portanto, devem ser inseridos no vetor plasmidial próximo a um promotor. Para facilitar a compreensão da clonagem do gene da insulina, o uso do cDNA foi omitido do texto. Talvez você queira trabalhar esse processo com mais detalhes.

SESSÃO 2 (OPCIONAL)

IDEIAS PRINCIPAIS: as decisões da sociedade sobre a implementação de esforços relacionados à ciência e à tecnologia devem ser fundamentadas tanto no conhecimento científico quanto nas questões econômicas, políticas e éticas. O DNA tem a mesma estrutura e função, independentemente do organismo de origem.



Os estudantes devem realizar uma ou mais das três atividades opcionais: (1) Fazer uma pesquisa na Internet sobre um produto farmacêutico produzido, usando um processo recombinante, (2) Fazer uma pesquisa na Internet sobre um problema bioético relacionado à engenharia genética, depois debater o problema ou escrever um artigo de opinião ou para um blog, ou (3) Extrair um DNA. (45 min)

Você pode ampliar a introdução à biotecnologia, envolvendo os estudantes em uma ou mais das atividades a seguir.

PRODUTOS TERAPÊUTICOS HUMANOS HOJE E NO FUTURO

Peça aos estudantes que trabalhem individualmente ou em grupos para buscar mais informações sobre os produtos recombinantes que são objeto de pesquisas atuais e estão em desenvolvimento no mercado, seja em seu país, seja no exterior. Depois, peça a eles que apresentem os principais destaques das descobertas ao resto da turma. Você pode sugerir a eles que pesquisem sobre os produtos recombinantes que são usados, ou que podem ser usados no futuro, para condições médicas comuns, por exemplo:

- Anemia
- Asma
- Doenças autoimunes, como lúpus ou doença de Crohn
- Câncer e/ou efeitos colaterais de tratamentos contra o câncer, como transplantes de medula e quimioterapia
- Diabetes
- Falência dos rins

CONSIDERAÇÕES BIOÉTICAS

Existem muitos problemas bioéticos potenciais relacionados à engenharia genética e à biofarmacêutica. Os estudantes podem pesquisar um dos tópicos a seguir e participar de um debate com a turma ou escrever um artigo de opinião, ou ainda para um blog:

- Insulina natural X geneticamente modificada: além da insulina geneticamente modificada produzida por bactérias, as pessoas com diabetes podem ser tratadas com insulina de boi e porco. Embora algumas pessoas possam ter reações adversas à insulina sintética geneticamente modificada e, portanto, precisar de um produto natural, outras simplesmente preferem usar produtos naturais (em oposição aos geneticamente modificados). Suas opiniões devem ser respeitadas? As pessoas com diabetes devem ter o direito de escolha?
- Segurança do tratamento X acesso ao tratamento: a invenção de novos produtos terapêuticos, incluindo a insulina geneticamente modificada, tem salvado muitas vidas. No entanto, antes de um medicamento ou tratamento ser disponibilizado ao público, ele deve passar por uma extensa bateria de testes para determinar sua eficácia e garantir que o produto seja seguro para uso humano. Esses ensaios clínicos podem levar anos para ser concluídos, tempo que pacientes com doença terminal geralmente não têm. Pacientes que sofrem de doenças potencialmente fatais têm defendido o acesso a medicamentos que ainda não completaram todo o processo de aprovação. Sua argumentação é de que eles devem poder receber medicamentos não aprovados se já se esgotaram todas as opções de tratamento possíveis. Seus desejos devem ser concedidos? É mais importante permitir que os pacientes tenham acesso aos medicamentos ou primeiro garantir que os produtos sejam completamente seguros para uso humano?

RECURSOS: no site do programa você encontra os links para novas histórias sobre esses tópicos.



EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA é o tema central deste programa. O DNA codifica proteínas que, por sua vez, resultam nas características dos organismos, sejam essas características a fluorescência, a produção reduzida de insulina ou o cabelo castanho. Para ajudar os estudantes a entender que todo DNA tem a mesma estrutura, faça com eles a atividade de extração de DNA. Isolar o DNA de organismos diferentes e comparar suas propriedades (como a viscosidade) vai reforçar a ideia de que, independentemente da fonte, todo DNA é igual e tem propriedades semelhantes.

RECURSOS: no site do programa você encontra os links para os possíveis laboratórios.



SESSÃO 3

IDEIAS PRINCIPAIS: ao criar um plasmídeo recombinante, é importante examinar as sequências do DNA plasmidial e do DNA humano que contêm o gene de interesse. É necessário encontrar uma única enzima de restrição que vai cortar o DNA plasmidial em um único local e cortar próximo às duas extremidades do gene humano. As “extremidades coesivas” idênticas criadas pelos cortes feitos por uma única enzima de restrição possibilitam a união de diferentes sequências de DNA em um plasmídeo recombinante.



Os estudantes devem realizar a atividade *Vamos clonar o gene*. (15 min)

Os estudantes observam as sequências genéticas do DNA plasmidial e um gene cromossômico humano alvo (insulina) e escolhem a enzima de restrição adequada para criar um modelo de papel de um plasmídeo recombinante. Essa atividade deve ser realizada em duplas. Observe que o gene da insulina mostrado no **Anexo 3** é um modelo e não representa a sequência completa dos pares de bases do gene humano da insulina.

ESTRATÉGIA: se várias duplas tiverem dificuldade com a mesma parte da atividade, pare a aula e leia de novo as instruções dessa parte. Você pode pedir aos estudantes que conseguiram realizar essa parte que mostrem seu trabalho.



Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as perguntas das seções *PARE E PENSE* e *Atividade*, e anotem as respostas individualmente. (15 min)



Durante a atividade, os estudantes devem discutir essas perguntas em grupos e anotar as respostas individualmente. Deixe que os estudantes compartilhem com a turma as respostas e reflexões. Circule para acompanhar as discussões e oferecer apoio.

Possível resposta à pergunta da seção *PARE E PENSE*:

Por que é importante que a mesma enzima ou enzimas sejam usadas para cortar o plasmídeo e o gene da insulina do DNA humano? *Para que tenham sequências de bases complementares que possam se combinar e permitir que dois pedaços de DNA sejam unidos.*

Possíveis respostas às perguntas sobre a atividade:

1. Qual enzima de restrição você escolheu? Por que você escolheu essa enzima?

A enzima de restrição *EcoRI* é a única enzima que corta o plasmídeo uma vez sem destruir o gene.

2. Onde você introduziria o gene da insulina e por quê?
O gene deve ser inserido próximo à sequência promotora, já que essa sequência vai permitir que o gene seja transcrito na célula bacteriana.
3. Qual antibiótico você usaria para determinar se o DNA recombinante foi absorvido? *Podemos usar tanto a ampicilina quanto a canamicina, já que os dois genes fazem parte do plasmídeo recombinante final.*

Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes. (15 min)

Deixe que os estudantes compartilhem com a turma as respostas e reflexões sobre as perguntas das seções *PARE E PENSE* e *Atividade*. Enquanto os estudantes compartilham as respostas, avalie o conhecimento de cada um sobre como as enzimas de restrição são usadas na engenharia genética.

CONHECIMENTO CIENTÍFICO: ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

No início dos anos 1970, Hamilton Smith e Daniel Nathans conseguiram purificar um “agente” imunológico desconhecido encontrado nas bactérias. Esse agente molecular protegia as bactérias, restringindo o crescimento dos vírus bacteriófagos. O agente foi identificado como uma enzima capaz de cortar o DNA viral em fragmentos uma vez injetado em sua célula. Smith, Nathans e Werner Arber receberam, em 1978, o Prêmio Nobel por sua descoberta e caracterização dessas importantes moléculas.

Existem muitas classes de enzimas de restrição, mas as que têm sido mais úteis são aquelas que reconhecem e cortam de forma consistente uma sequência específica de nucleotídeos. Algumas enzimas de restrição reconhecem uma sequência de quatro bases, outras reconhecem uma sequência de cinco ou seis bases. Os sítios de restrição são palíndromos. Trata-se de um conceito importante e você pode enfatizá-lo, talvez usando os exemplos “radar” e “subi no ônibus”.

Algumas enzimas de restrição vão fazer um “corte uniforme”, sem deixar bases soltas. Outras enzimas, inclusive a *BamHI* e a *HindIII*, vão deixar bases soltas, criando extremidades coesivas. Essas enzimas são particularmente úteis, já que as extremidades coesivas tornam a recombinação de fragmentos de DNA um procedimento muito simples. A “coesividade” é o resultado da afinidade extraordinária dos nucleotídeos complementares para formar ligações de hidrogênio entre eles.

A nomenclatura das enzimas de restrição é muito simples. A primeira letra do nome da enzima é derivada do gênero da bactéria da qual a enzima foi isolada. As duas letras seguintes vêm das duas primeiras letras do epíteto específico da bactéria. Geralmente existe uma quarta letra após as três primeiras, que representa a cepa ou o tipo de bactéria. Como algumas cepas de bactérias produzem várias enzimas de restrição, um algarismo romano identifica a ordem em que as enzimas foram isoladas. A **Tabela 2A.1** na página 29 do Guia do Estudante apresenta alguns exemplos.

SESSÃO 4

IDEIAS PRINCIPAIS: os cientistas que trabalham com engenharia genética usam muitas ferramentas específicas, inclusive ferramentas produzidas pelo homem e ferramentas biológicas.



Os estudantes vão realizar o Laboratório 2A. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções **ANTES DO LABORATÓRIO** e **PARE E PENSE**, e expliquem o raciocínio. (25 min)

Os estudantes vão usar enzimas de restrição para digerir (cortar) um plasmídeo. Explique à turma que a digestão por enzima de restrição vai criar os fragmentos necessários para verificar se há o plasmídeo recombinante correto que será inserido na bactéria.

OBSERVAÇÕES: a seguir, apresentamos algumas observações importantes para a incubação no banho-maria que será realizada neste laboratório.

- Ao final do laboratório, coloque no suporte flutuante, que deve estar sobre a mesa, os tubos de todos os grupos e, em seguida, leve o suporte ao banho-maria para incubação por 15 minutos.
- Deixar a digestão no banho-maria por algumas horas não vai interferir na restrição, mas as amostras não podem ser deixadas no banho-maria por mais de duas horas, já que a *Bam*HI pode começar a cortar o DNA aleatoriamente.
- Depois de 15 minutos de incubação, coloque a digestão no freezer até o uso no próximo laboratório.

Os estudantes vão discutir em grupos as perguntas da seção **PARE E PENSE** e **ANTES DO LABORATÓRIO**, e anotar as respostas individualmente. Os estudantes devem compartilhar as respostas com a turma.

Possíveis respostas à primeira pergunta da seção **PARE E PENSE**:



Por que usar duas enzimas diferentes para cortar o plasmídeo evita que o plasmídeo refaça o círculo sem o gene inserido?

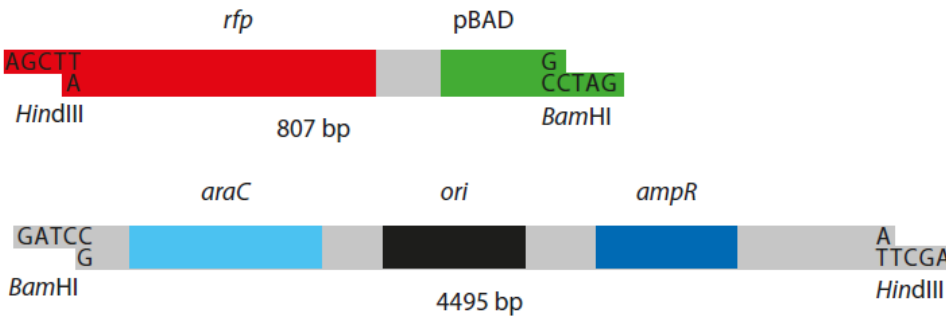
Como as sequências das extremidades coesivas são diferentes (uma tem a sequência de BamHI e a outra tem a sequência de HindIII), as duas extremidades não conseguem se recombinar. A única maneira de refazer o círculo é com a inserção do gene rfp, que tem as extremidades BamHI e HindIII.

Possíveis respostas às perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO**:

1. Veja a **Figura 2A.3**. Se o pARA-R for digerido pelas enzimas *Bam*HI e *Hind*III, quais fragmentos serão produzidos? Registre a sequência de nucleotídeos das extremidades coesivas e o comprimento de cada fragmento (pb), e indique os genes e outras sequências importantes em cada fragmento.

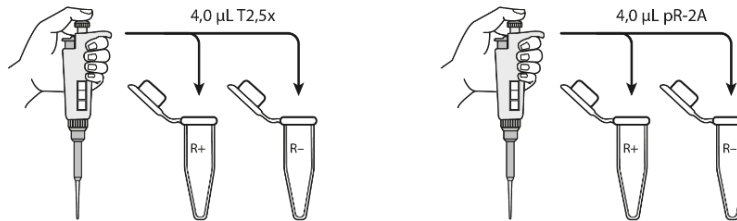
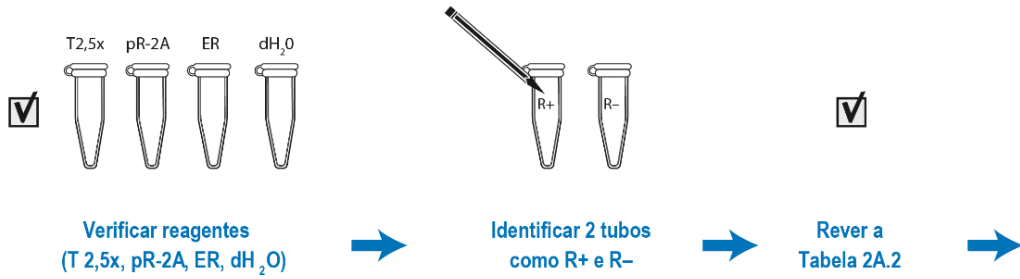
As sequências são:

Fragmentos da digestão do pARA-R:



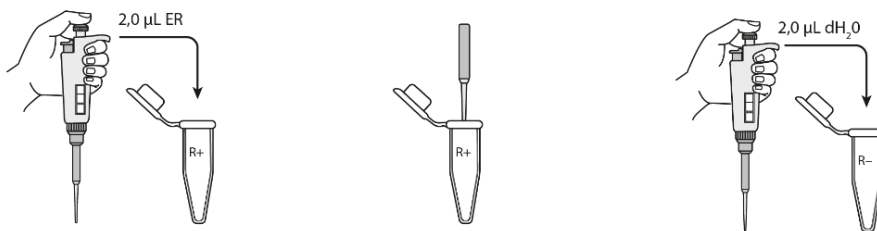
2. Que componentes são necessários no plasmídeo para criar um plasmídeo capaz de produzir RFP em bactérias?
O plasmídeo precisa de uma origem da replicação, um promotor, o gene de interesse (rfp) e um gene de resistência a antibióticos que permita a identificação das bactérias que incorporaram o plasmídeo.
3. As bactérias podem ser mortas por um antibiótico, a menos que carreguem um plasmídeo com um gene de resistência àquele antibiótico específico. Os cientistas chamam esses tipos de genes de marcadores selecionáveis; apenas as bactérias que carregam esse gene sobreviverão quando expostas a um antibiótico. Se a absorção do DNA pela bactéria for ineficiente (conforme discutido na seção de leitura), por que o marcador selecionável é essencial na clonagem de um gene na bactéria?
Você deseja saber quais células bacterianas têm o plasmídeo e são capazes de produzir a proteína que você está purificando. O marcador selecionável vai permitir que você mate as bactérias que não têm o plasmídeo com o gene de interesse.
4. Vá até a seção *Métodos*, leia as páginas 40 e 41 do Guia do Estudante e faça uma breve descrição das etapas, usando palavras e um fluxograma. *As respostas vão variar.*
O fluxograma dos estudantes pode ser parecido com o apresentado a seguir.

Laboratório 2A Fluxograma



Pipetar 4,0 µL de T2,5x nos tubos R+ e R-

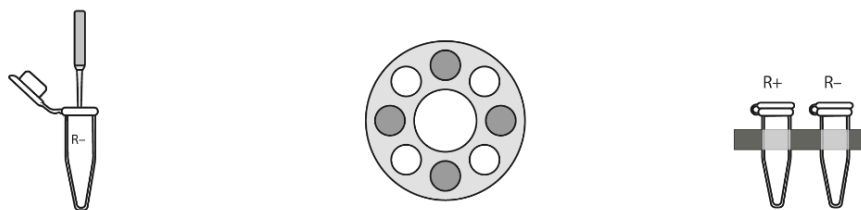
Pipetar 4,0 µL de pR nos tubos R+ e R-



Pipetar 2,0 µL de RE no tubo R+

Usar a pipeta para misturar os reagentes no tubo R+

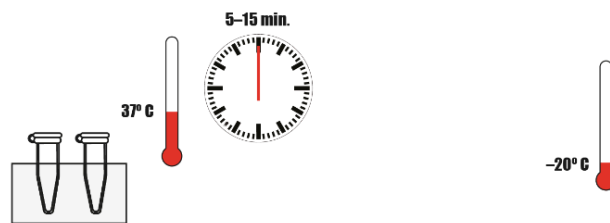
Pipetar 2,0 µL de dH₂O no tubo R-



Usar a pipeta para misturar os reagentes no tubo R-

Centrifugar os tubos R+ e R-

Colocar os tubos no suporte flutuante →



Colocar os tubos R+ e R- no banho-maria por 5 a 15 minutos

Colocar os tubos R+ e R- no freezer a -20° C

Faça uma breve revisão da seção *Métodos* com os estudantes antes de começar o laboratório.

TÉCNICA DE LABORATÓRIO: faça uma revisão sobre o uso de micropipetas.



Durante o laboratório, os estudantes devem discutir em grupos as perguntas da seção *PARE E PENSE*, e anotar as respostas individualmente. Deixe que os estudantes compartilhem com a turma as respostas e reflexões.

Possíveis respostas às perguntas 2 e 3 da seção *PARE E PENSE*:

- Nessa etapa, você preparou um tubo sem as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*. Qual é o objetivo dessa etapa e por que ela é importante?
O tubo sem as enzimas é um controle. Podemos acompanhar um controle com o tubo que tem as enzimas a fim de comparar o plasmídeo não cortado com o plasmídeo cortado. Se, por alguma razão, as enzimas não funcionarem como o esperado, o controle vai mostrar que tanto o tubo de controle quanto o tubo com as enzimas apresentarão o mesmo resultado quando examinados com a eletroforese em gel.
- Por que as enzimas funcionam melhor a 37 °C? Por que então as enzimas devem ser colocadas no freezer?
Originalmente, as enzimas vieram de bactérias que estão à temperatura do corpo humano e foram projetadas para funcionar nessa temperatura. Ao colocar as enzimas no freezer, ocorre uma interrupção da reação.

Na etapa 6, os grupos são orientados a colocar seus 2 tubos (R+ e R-) no suporte flutuante próximo ao banho-maria. Quando o suporte estiver cheio, coloque-o no banho-maria e incube pelo tempo de 5 a 15 minutos. Finalizada a incubação, coloque os 4 tubos no freezer a -20 °C para o Laboratório 4A.

Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as *PERGUNTAS do Capítulo 2A* e anotem as respostas individualmente. Discuta as respostas com a turma. (20 min)

Os estudantes vão refletir sobre os conceitos aprendidos neste capítulo e mostrar sua compreensão acerca do uso dos plasmídeos e das enzimas de restrição na clonagem de genes, respondendo às *PERGUNTAS do Capítulo 2A*.

Possíveis respostas às *PERGUNTAS do Capítulo 2A*:

1. Faça uma lista ou um desenho sobre as características importantes de um vetor plasmidial necessárias para clonar um gene. Explique a finalidade de cada característica.
As características importantes de um vetor plasmidial são: (1) uma sequência para iniciar a replicação do DNA, ori, que permite que o plasmídeo se replique na bactéria; (2) uma sequência promotora para iniciar a transcrição do gene inserido; e (3) um gene codificador de uma proteína resistente a antibióticos, que permite a identificação das bactérias que absorveram o plasmídeo.
2. Qual é a função das enzimas de restrição na natureza?
Elas protegem as bactérias contra infecções por vírus bacteriófagos.
3. Com base em seus conhecimentos sobre evolução, por que as bactérias reteriam um gene que oferece

resistência a antibióticos? Como a existência das bactérias com resistência a antibióticos afeta a medicina nos dias de hoje?

As bactérias com o gene de resistência a antibióticos vão se reproduzir mais porque têm uma vantagem seletiva sobre as bactérias que não carregam esse gene. Essa vantagem seletiva é uma grande preocupação na medicina, pois hoje existem cepas de bactérias que causam doenças, mas não podem ser mortas por antibióticos.

4. À primeira vista, bactérias, anêmonas-do-mar e seres humanos parecem ser organismos muito diferentes. Explique como um gene humano ou de uma anêmona-do-mar pode ser expresso em uma bactéria para fabricar um produto nunca antes fabricado pela bactéria.

O código do DNA e os processos de transcrição e tradução são os mesmos em todos os organismos vivos. Assim que um gene humano ou de uma anêmona-do-mar é pareado com um promotor bacteriano em um plasmídeo e o plasmídeo recombinante é incorporado pela bactéria, a bactéria consegue ler o código do DNA e fabricar a proteína.

5. Devido a um incidente no laboratório, as bactérias que carregam um plasmídeo com um gene de resistência à ampicilina e as bactérias que carregam um plasmídeo com um gene de resistência a outro antibiótico (canamicina) foram misturadas acidentalmente. (Dica: cuidado para não matar um dos tipos de bactéria que você está tentando separar!)

As bactérias precisam ser divididas em dois grupos: um deve ser tratado com canamicina e o outro deve ser tratado com ampicilina.

ESTRATÉGIA: durante a discussão, empregue as seguintes práticas:

- Dê tempo aos estudantes para refletir sobre as respostas dos colegas.
- Peça esclarecimentos.
- Peça explicações.
- Reformule frases.
- Peça exemplos.
- Peça evidências.
- Forneça exemplos e contraexemplos.
- Peça aos estudantes que complementem uma explicação.
- Peça aos estudantes que avaliem uma resposta.

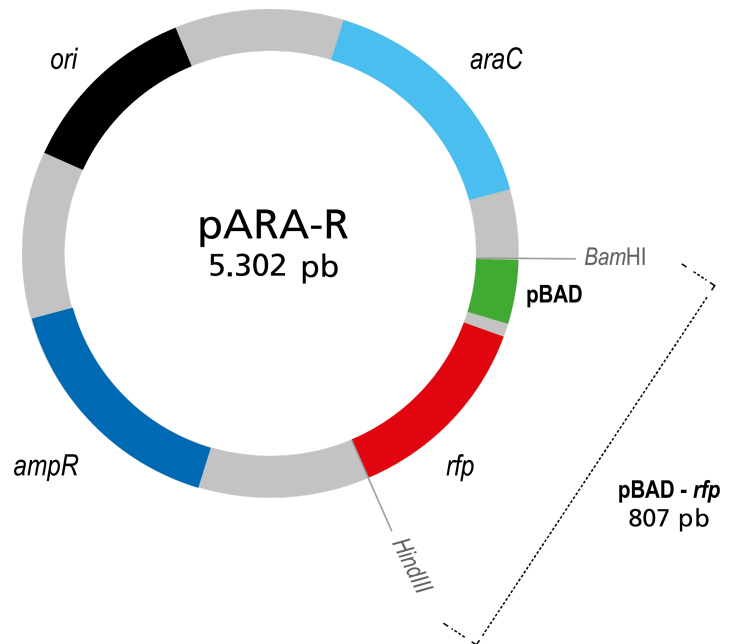


CONHECIMENTO CIENTÍFICO:

OS COMPONENTES DO PLASMÍDEO pARA-R

Figura 2A.1: o plasmídeo pARA-R

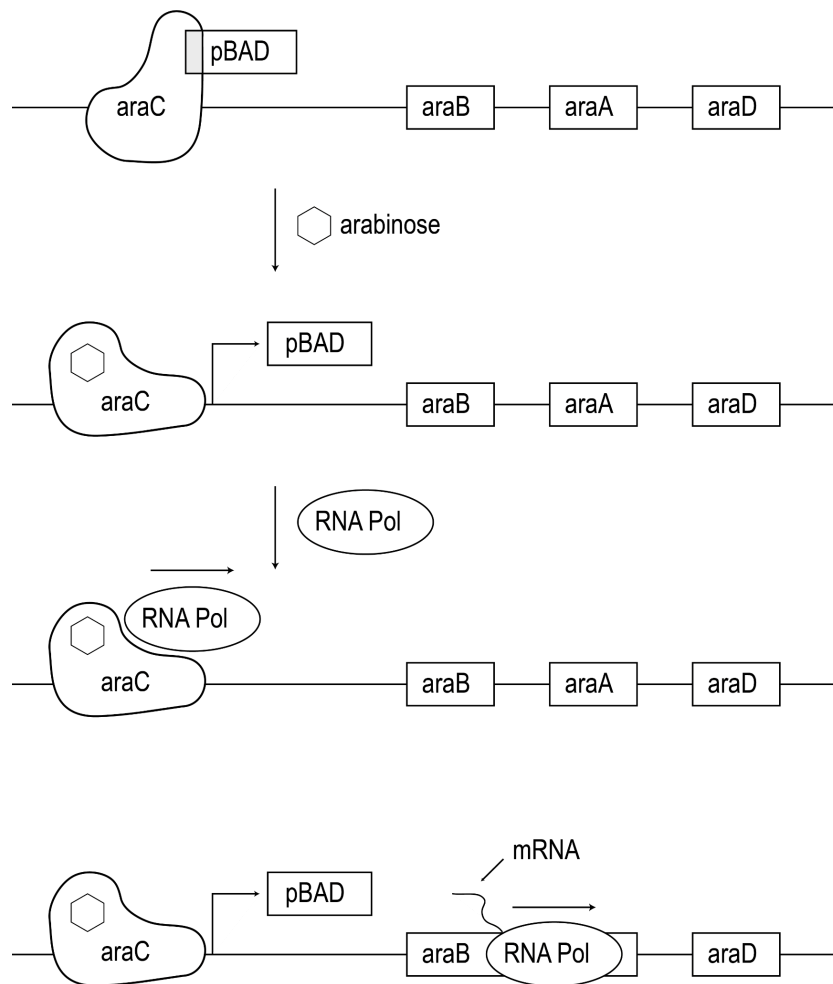
O plasmídeo recombinante utilizado neste programa para clonar o gene *rfp* é o plasmídeo pARA-R (veja a **Figura 2A.1**). Muitos tipos diferentes de vetores plasmidiais foram desenvolvidos para clonar genes. Todos têm os componentes básicos necessários para clonar e expressar genes em bactérias, inclusive uma sequência para iniciar a replicação do DNA (local *ori*), um promotor para iniciar a transcrição, um marcador selecionável e um sítio ou sítios de restrição próximos ao promotor para inserir o gene de interesse. O plasmídeo pARA-R foi construído de modo que o gene seja inserido usando *Bam*HI e *Hind*III. O uso de duas enzimas de restrição diferentes garante que o gene *rfp* seja inserido apenas em uma posição, a apropriada para a transcrição da fita codificadora do DNA. Talvez seja interessante revisar com os estudantes o conceito de fita codificadora e fita molde.



O plasmídeo pARA-R foi construído para incluir componentes do operon arabinose, que permitem regular a expressão do gene *rfp*. Todos os organismos vivos, inclusive as bactérias, têm a capacidade de regular a expressão de seus genes. O exemplo mais óbvio dessa regulação se encontra na diferenciação celular em organismos pluricelulares. A maioria das células contém todo o complemento de DNA, mas, durante a diferenciação, apenas alguns genes são expressos à medida que as células se transformam em células da pele, dos músculos ou das raízes. Grande parte dessa regulação ocorre no início da transcrição. O início da transcrição pode ser ativado por proteínas chamadas de ativadores ou desativado por proteínas chamadas de repressores. Embora as bactérias não se diferenciem, elas respondem às condições ambientais, como a presença ou ausência de açúcar, inclusive arabinose.

O operon arabinose é um exemplo clássico de regulação gênica nas bactérias (veja a **Figura 2A.2**). O operon é composto de três genes: *araB*, *araA* e *araD*, que codificam as proteínas responsáveis pelo transporte e pela quebra da arabinose. Ele também tem um promotor e uma sequência de DNA 5' próxima ao promotor, que se liga à proteína *araC*. A proteína *AraC* regula a expressão dos genes da arabinose, permitindo a transcrição na presença de arabinose ou desativando a expressão do gene em sua ausência.

Figura 2A.2: O operon arabinose



Na ausência de arabinose, a proteína *araC* bloqueia a ligação da RNA-polimerase ao promotor, o que impede o início da transcrição e a expressão dos três genes, *araB*, *araA* e *araD*.

Na presença de arabinose, o açúcar se liga à proteína *araC*, que altera a forma do DNA de modo que a RNA-polimerase consegue se ligar ao promotor e os genes *araB*, *araA* e *araD* são expressos. O plasmídeo pARA-R usado neste programa tem o promotor pBAD e o gene *araC*, além dos genes de resistência à ampicilina e à canamicina. Os genes *araB*, *araA* e *araD* foram removidos e substituídos pelo gene *rfp*, colocando o gene *rfp* sob o controle do promotor de arabinose. As colônias de bactérias portadoras desse plasmídeo serão vermelhas na presença de arabinose e brancas em sua ausência.

CAPÍTULO 4A

COMO SE CERTIFICAR DE QUE VOCÊ TEM UM PLASMÍDEO RECOMBINANTE

VISÃO GERAL

Como o processo de ligadura¹² gera muitos produtos diferentes, os biólogos devem verificar se criaram o plasmídeo recombinante de que precisam, ou seja, aquele que contém o gene de interesse e todos os componentes necessários para a fabricação da proteína desejada. Neste capítulo, os estudantes vão aprender a importância de verificar seu trabalho para descobrir se obtiveram o plasmídeo pARA-R que contém o gene *rfp* e o gene *ampR*.

CONHECIMENTO PRÉVIO

Os estudantes já devem saber:

- O DNA é uma molécula de fita dupla e cada fita de DNA é formada por subunidades chamadas nucleotídeos, unidos por ligações covalentes.
- O nucleotídeo é formado por um açúcar, um grupo fosfato e uma base nitrogenada. Existem quatro bases nitrogenadas diferentes: citosina, guanina, adenina e timina.
- Os nucleotídeos são ligados uns aos outros por uma estrutura de açúcar-fosfato e as bases nitrogenadas se projetam para fora da estrutura.
- As duas fitas de DNA são unidas por ligações de hidrogênio entre bases nitrogenadas adjacentes, que são chamadas pares de bases. A citosina sempre pareia com a guanina, e a adenina sempre pareia com a timina.

OBJETIVOS DE APRENDIZADO

Ao final deste capítulo, os estudantes vão saber:

- Descrever a importância de verificar os produtos criados no processo de engenharia genética.
- Prever a velocidade relativa dos fragmentos de restrição de DNA e dos plasmídeos através do gel durante a eletroforese em gel.
- Separar e identificar os fragmentos de restrição de DNA e plasmídeos usando a eletroforese em gel.

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

- Avalie a capacidade de cada estudante de descrever a importância de verificar os produtos criados no processo de engenharia genética. Para isso, analise as respostas à pergunta 1 da seção de *PERGUNTAS do Capítulo 4A* (página 55 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de prever a distância relativa percorrida pelos fragmentos de restrição de DNA e pelos plasmídeos no gel. Para isso, analise as respostas à primeira pergunta da seção *PARE E PENSE do Laboratório 4A* (página 54 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de separar e identificar os fragmentos de restrição de DNA e plasmídeos usando a eletroforese em gel. Para isso, analise as respostas às perguntas 2 a 8 da seção de *PERGUNTAS do Capítulo 4A* (página 55 do Guia do Estudante).

¹² N. do E.: conexão entre trechos de DNA que foram cortados por enzimas de restrição.

SEQUÊNCIA SUGERIDA DE ATIVIDADES

SESSÃO 1

- Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS** do Capítulo 4A com os estudantes. (5 min)
- Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** e compartilhem as respostas. (10 min)
- Peça aos estudantes que leiam o texto **“Por que é necessário verificar?”** e respondam às perguntas da seção **REFLITA**. (15 min)
- Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes às perguntas da seção **REFLITA** sobre o texto **“Por que é necessário verificar?”** (5 min)
- Os estudantes devem começar o Laboratório 4A pela leitura do parágrafo introdutório e das perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO** com seus grupos. (10 min)

ATENÇÃO: peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO** como tarefa.

SESSÃO 2

- Os estudantes vão realizar o Laboratório 4A. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções **ANTES DO LABORATÓRIO** e **PARE E PENSE** e expliquem o raciocínio. (45 min)

SESSÃO 3

- Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as **PERGUNTAS** do Capítulo 4A e anotem as respostas individualmente. (20 min)
- Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes. (25 min)

PREPARAÇÃO

Antes de começar, você deve se familiarizar com os procedimentos descritos neste capítulo, com a preparação necessária e com os materiais que você vai utilizar. As instruções presumem que você vai precisar de materiais para 12 grupos de 2 ou 3 estudantes. Multiplique as quantidades de acordo com o número de estudantes e de turmas.

FAÇA CÓPIAS DAS FOLHAS DE ATIVIDADES PARA O LABORATÓRIO 4A

Você vai precisar de uma cópia do **Diagrama da escada de DNA (Anexo 4A)** para cada estudante. O anexo para a atividade está disponível no final deste guia.

PREPARE GÉIS DE AGAROSE PARA O LABORATÓRIO 4A

RECURSOS: o vídeo **“Como preparar gel de agarose”** (disponível no site do programa) apresenta o passo a passo do preparo e moldagem do gel de agarose, conforme descrito a seguir.



ATENÇÃO: Os géis podem ser preparados com vários dias de antecedência.

1. Prepare as bandejas de eletroforese em gel:
 - a. Reúna os seguintes materiais:
 - 6 moldes para gel de eletroforese
 - 6 pentes de 10 dentes para os poços
 - Opcional: fita adesiva
 - b. Prepare os moldes, fixando as portas nas extremidades das bandejas ou colando as extremidades abertas com fita adesiva. Coloque um pente em cada bandeja antes de adicionar a solução de agarose.
2. Prepare a solução de agarose:
 - a. Reúna os seguintes materiais¹³:
 - 1 proveta de 15 mL
 - 1 proveta de 250 mL
 - 1 Erlenmeyer de 250 mL, com a identificação "Tampão SB 1x"
 - 1 Erlenmeyer de 500 mL com a identificação "Gel"
 - 12,5 mL de tampão de borato de sódio 20x (tampão SB 20x)
 - 237,5 mL de água destilada ou deionizada
 - 1,44 g de agarose
 - Balança de precisão
 - Filme plástico
 - Ponteira descartável
 - Micro-ondas
 - Luvas ou pinças resistentes ao calor
 - 6 sacos plásticos reutilizáveis de 1 litro cada um com fecho hermético
 - Coletor para descarte de ponteiras e tubos de microcentrífuga usados
 - b. Prepare 250 mL de tampão de borato de sódio 1x (tampão SB 1x)
 - Meça 12,5 mL de tampão SB 20x e adicione essa quantidade à proveta de 250 mL
 - Adicione água destilada ou deionizada até a marca de 250 mL
 - Transfira a mistura a um Erlenmeyer de 250 mL e o rotule como "Tampão SB 1x".
 - Agite gentilmente o Erlenmeyer para misturar
 - c. Meça 180 mL de tampão SB 1x com a proveta de 250 mL e reserve.
 - d. Meça 1,44 g de agarose com a balança de precisão e coloque-a no Erlenmeyer de 500 mL com a identificação "Gel". Adicione 180 mL de tampão SB 1x da etapa 2c para fazer uma solução de agarose a 0,8%.
 - e. Cubra a boca do frasco de 500 mL com filme plástico. Use uma ponteira para fazer um furo pequeno no filme plástico.
 - f. Coloque o frasco coberto no micro-ondas e aqueça por 1 minuto na potência alta. Usando luvas, agite o frasco suavemente.
 - Você pode usar também uma placa aquecida com agitador para derreter a agarose.

¹³ N. do E.: além dos materiais aqui listados, trabalharemos com o corante de DNA GelGreen, providenciado a uma concentração de 10.000x.

SEGURANÇA: use luvas ou pinças resistentes ao calor para segurar o frasco.



- g. Continue levando o frasco ao micro-ondas em intervalos de 5 a 15 segundos até que toda a agarose esteja dissolvida. Para verificar se a agarose está completamente dissolvida, segure o frasco contra a luz e agite a solução. Procure cuidadosamente por “lentes” de cristais de agarose suspensas no líquido. Se não houver, a agarose está dissolvida. Espere por 5 minutos a agarose esfriar até a temperatura aproximada de 60 °C antes de prosseguir para a etapa 3¹⁴.

TÉCNICA DE LABORATÓRIO: se a solução esfriar muito, a agarose começa a se solidificar. Se isso acontecer, basta reaquecer a solução conforme descrito acima.



3. Molde os géis nas bandejas:
- Quando a solução de agarose esfriar até uma temperatura que seja seguro tocar no fundo do frasco (aproximadamente 60 °C, o que levará cerca de 5 minutos), despeje de 25 mL a 30 mL da solução de agarose em cada bandeja de eletroforese. A solução deve cobrir cerca de 2 mm do pente.
 - Assim que os géis se solidificarem (cerca de 30 minutos), retire o pente de cada gel. Puxe verticalmente sem balançar nem para a frente nem para trás. Isso vai minimizar os danos na parede frontal do poço.
 - Remova os géis dos moldes, armazene-os em sacos plásticos reutilizáveis individuais com uma pequena quantidade do tampão SB 1x e os ponha no refrigerador até o momento de usar. Coloque sobre uma superfície plana e lisa, porque as superfícies irregulares e com texturas vão deixar marcas nos géis, afetando o movimento das moléculas.

PREPARAÇÃO DA ALÍQUOTA DOS REAGENTES PARA O LABORATÓRIO 4A

ATENÇÃO: a alíquota dos reagentes pode ser preparada vários dias antes do Laboratório 4A.

1. Pegue o corante de carga armazenado em temperatura ambiente. Remova a escada de DNA do freezer e deixe-a descongelar por 15 minutos.

ATENÇÃO: o corante de carga é o mesmo da Solução 2 usada no Laboratório 1.2. Ele contém alaranjado G, azul de bromofenol e xileno cianol.

2. Coloque identificações nos tubos de microcentrifuga da seguinte maneira:

- 12 tubos de 1,5 mL com a identificação “Cor”
- 12 tubos de 1,5 mL com a identificação “E”

3. Pipete os reagentes nos tubos de microcentrifuga da seguinte forma:

- 20,0 µL de corante de carga nos tubos “Cor”
- 10,0 µL de escada de DNA nos tubos “E”

ATENÇÃO: depois de preparar a alíquota, armazene o corante de carga em temperatura ambiente e a escada de DNA no refrigerador.

¹⁴ N. do E.: logo após o gel esfriar e antes de moldá-lo, adicionar o corante GelGreen em concentração de 1µL para cada 10 mL de solução de agarose. Para o exemplo de 180 mL de solução, serão necessários 18 µL de GelGreen.

REÚNA OS MATERIAIS PARA O LABORATÓRIO 4A

ATENÇÃO: reúna os materiais no dia do laboratório.

1. Prepare 300 mL de tampão SB 1x:

a. Reúna os seguintes materiais:

TÉCNICA DE LABORATÓRIO: você deve preparar tampão SB 1x para todas as turmas que vão realizar esse laboratório. Basta multiplicar as quantidades fornecidas pelo número de turmas.



- 15 mL de tampão SB 20x
 - Erlenmeyer de 500 mL com a identificação “tampão SB 1x”
 - 285 mL de água destilada ou deionizada
 - 6 frascos de 50 mL com a identificação “tampão SB 1x”
- b. Adicione 15 mL de tampão SB 20x ao Erlenmeyer de 500 mL com a identificação “Tampão SB”, adicione água destilada ou deionizada até a marca de 300 mL e misture.
- c. Despeje 50 mL de tampão SB em cada frasco de 50 mL com a identificação “tampão SB 1x”.

2. Retire os seguintes reagentes do freezer e deixe descongelar por 15 minutos:

- Tubo de microcentrífuga com pARA-R digerido do Laboratório 2A (R+)
- Tubo de microcentrífuga com pARA-R não digerido do Laboratório 2A (R-)

3. Centrifugue os tubos R+ e R- na microcentrífuga para condensação.

4. Prepare 12 conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:

- Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com os seguintes reagentes:
 - Tubo de microcentrífuga com pARA-R digerido do Laboratório 2A (R+)
 - Tubo de microcentrífuga com pARA-R não digerido do Laboratório 2A (R-)
 - Tubo com Cor (preparado acima)
 - Tubo de microcentrífuga com água destilada (dH₂O)
 - Tubo com E (preparado acima)
- Micropipeta P-20
- Caixa de ponteiros descartáveis
- Recipiente para descarte de ponteiros e tubos de microcentrífuga usados (um coletor para cada 2 grupos)
- Uma cópia do **Diagrama da escada de DNA** (Anexo 4) para cada estudante

5. Monte 6 cubas de eletroforese, cada uma perto de uma fonte de energia. Dois grupos vão compartilhar uma cuba. Coloque gel de agarose a 0,8% (preparado acima) em cada cuba e deixe um frasco de 50 mL com tampão SB 1x (preparado acima) perto de cada cuba. Caso você precise armazenar os géis antes da pigmentação final e da documentação com fotos, guarde os sacos plásticos reutilizáveis com os géis e identifique cada um deles com o número do grupo e o período de aula. Consulte a seção *Finalização da corrida dos géis para o Laboratório 4A*, a seguir.

6. Coloque a microcentrífuga no centro da sala para que todos os grupos possam compartilhá-la.

FINALIZAÇÃO DA CORRIDA DOS GÉIS PARA O LABORATÓRIO 4A

1. A menos que tenha uma aula dupla para trabalhar as sessões 2 e 3, você terá que continuar o processo de corrida dos géis depois que a Sessão 2 terminar ou interromper o procedimento se for dar outra aula usando as unidades de eletroforese em gel.
 - Se você conseguir finalizar a corrida dos géis após o término da aula, deixe correr até que o corante alaranjado G (amarelo) chegue **próximo** ao final do gel. O fragmento menor de seu interesse, com o gene *rfp*, corre logo atrás da banda amarela. Quando a eletroforese é finalizada, os géis podem ser transferidos para os sacos plásticos identificados ou para uma bandeja de coloração.
 - Se você precisar interromper os géis, faça isso depois que os estudantes tiverem corrido os géis por pelo menos 10 minutos. Peça aos estudantes que desliguem a unidade de eletroforese, removam a bandeja de moldagem e coloquem o gel no saco plástico identificado. Coloque um novo gel na bandeja para a próxima aula. Quando tiver tempo, você pode devolver os géis corridos parcialmente à bandeja e continuar a eletroforese, seguindo as instruções acima.
2. Após a corrida dos géis, você precisa corar e fotografá-los para visualizar as bandas de DNA. As instruções para corar e fotografar os géis estão incluídas nos materiais. Os géis podem ser descartados no lixo comum depois da documentação.

METODOLOGIA DE ENSINO

SESSÃO 1

IDEIAS PRINCIPAIS: em geral, é importante verificar se um procedimento funcionou como o esperado. Na biotecnologia, especificamente, o processo de várias etapas utilizado para clonar um gene gera múltiplos produtos, por isso é necessário verificar se você obteve o plasmídeo recombinante que precisa.



Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS** do Capítulo 4A com os estudantes. (5 min)

A **INTRODUÇÃO** explica o objetivo principal do capítulo e o relaciona à Introdução do programa. Os **OBJETIVOS** do Capítulo 4A informam o foco de aprendizagem necessário aos estudantes durante as atividades propostas neste capítulo. Explique o que será avaliado neste capítulo e quais são as expectativas em relação ao desempenho dos estudantes.

Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** e compartilhem as respostas. (10 min)

Ao responderem às perguntas dessa seção, os estudantes vão ativar seu conhecimento sobre eletroforese em gel e verificação no laboratório, além de revelar as lacunas em seu conhecimento. Divida a turma em duplas e

peça a eles que respondam às perguntas, anotem suas respostas e compartilhem suas ideias com a turma para que você possa avaliar o que eles sabem e o que não sabem.

Possíveis respostas às perguntas da seção *O QUE VOCÊ JÁ SABE?*:

1. Por que os fragmentos de restrição de DNA e os plasmídeos se separam quando analisados pela eletroforese em gel?
As moléculas de DNA, inclusive os fragmentos e plasmídeos, movimentam-se pelo gel durante a eletroforese. A separação ocorre porque moléculas mais leves e mais compactas se movem mais rapidamente do que as moléculas mais pesadas e menos compactas.
2. Por que é importante identificar e verificar um plasmídeo recombinante?
Você pode cometer erros durante um procedimento ou podem ocorrer outros problemas, como o uso de reagentes incorretos. Os produtos dos procedimentos de engenharia genética não são visíveis, por isso os erros podem passar despercebidos. Você deve verificar se tem o plasmídeo recombinante com o gene necessário, além de outros genes ou sequências importantes.

Peça aos estudantes que leiam o texto “Por que é necessário verificar?” e respondam às perguntas da seção



REFLITA. (15 min)

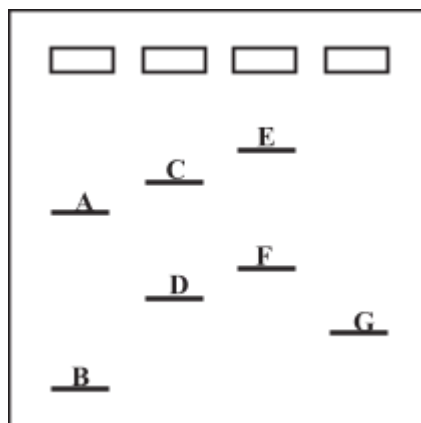
Nesse texto, os estudantes vão aprender um método de engenharia genética para criar plasmídeos recombinantes e, em seguida, verificar o plasmídeo recombinante. Eles vão aprender também que os plasmídeos podem ter três configurações diferentes: superenrolada, círculo cortado e multímero. Lembre os estudantes de consultarem o **Glossário** para que descubram o significado dos termos científicos que não conhecem.

Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes às perguntas da seção REFLITA sobre o texto Por que é necessário verificar? (5 min)

Avalie o conhecimento dos estudantes sobre eletroforese em gel e verificação no processo de engenharia genética. Para isso, analise as respostas às perguntas da seção *REFLITA*.

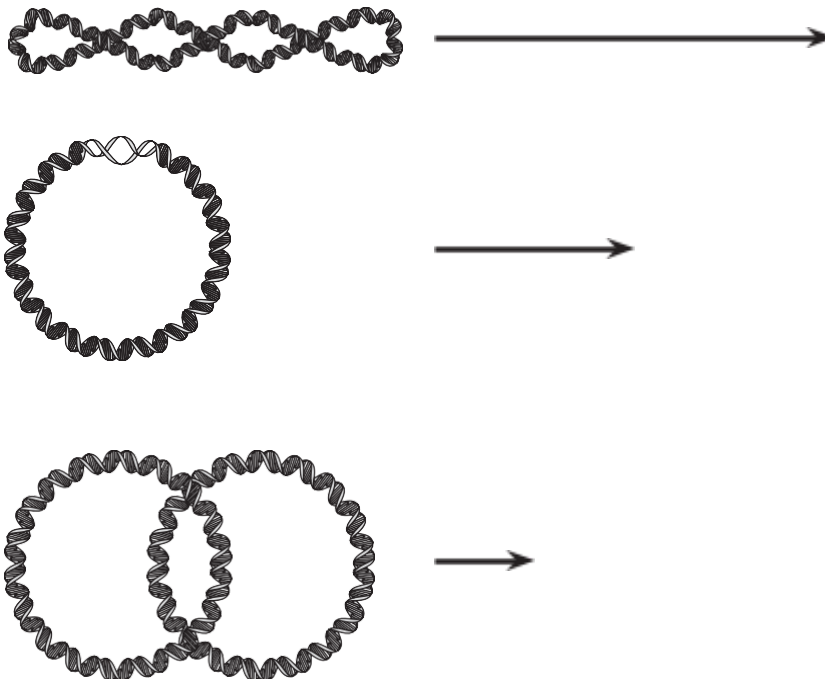
Possíveis respostas às perguntas da seção *REFLITA*:

- Depois que a eletroforese em gel separa os diferentes fragmentos de DNA e os plasmídeos, o gel fica tingido para mostrar as bandas que indicam o local de cada tipo de fragmento e plasmídeo. A ilustração a seguir de um gel tingido mostra várias bandas que foram identificadas com letras. Os locais dos poços também estão mostrados. Qual é a ordem dos fragmentos, do menor para o maior?



A ordem dos fragmentos, do menor para o maior é: B, G, D, F, A, C e E.

- Se você usasse a eletroforese em gel para separar o mesmo plasmídeo com as três configurações, qual plasmídeo se moveria mais rápido e qual se moveria mais devagar? Por que os plasmídeos com configurações diferentes se movimentam de formas distintas pelo gel? Explique em palavras ou desenhe. *O plasmídeo superenrolado se moveria mais rápido e o multímero se moveria mais devagar. Os plasmídeos superenrolado e círculo cortado têm o mesmo peso molecular, mas o plasmídeo superenrolado se movimenta mais rápido pelo gel porque ocupa menos espaço devido ao seu tamanho. O multímero é muito lento porque tem múltiplas cópias do plasmídeo e, portanto, tem um peso molecular muito maior. Veja o diagrama a seguir.*



Os estudantes devem começar o Laboratório 4A pela leitura do parágrafo introdutório e das perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO** com seus grupos. (10 min)

ATENÇÃO: peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO** como tarefa.

Informe que o objetivo desse laboratório é verificar os produtos do laboratório anterior. A turma vai discutir em grupos as perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO** e anotar as respostas individualmente. Os estudantes vão precisar dos cadernos para consultar seu trabalho do laboratório anterior.

SESSÃO 2

IDEIAS PRINCIPAIS: os fragmentos de DNA e os plasmídeos podem ser separados pela eletroforese em gel. Não é possível visualizar o DNA no gel, por isso é necessário usar uma mistura de corantes chamada corante de carga, com as amostras de DNA para monitorar o



avanço da eletroforese em gel. Para ajudar a determinar os tamanhos dos pedaços desconhecidos de DNA, uma mistura de fragmentos diferentes de DNA, chamada escada de DNA, é aplicada no gel. Depois de finalizada a eletroforese em gel, o gel é pigmentado para mostrar a localização dos fragmentos de DNA e dos plasmídeos.

Os estudantes vão realizar o Laboratório 4A. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções **ANTES DO LABORATÓRIO** e **PARE E PENSE** e expliquem o raciocínio. (45 min)

Antes de começar o laboratório, peça aos estudantes que compartilhem com os grupos as respostas às perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO** e resolvam quaisquer diferenças. Em seguida, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas e reflexões.

Possíveis respostas às perguntas da seção **ANTES DO LABORATÓRIO**:

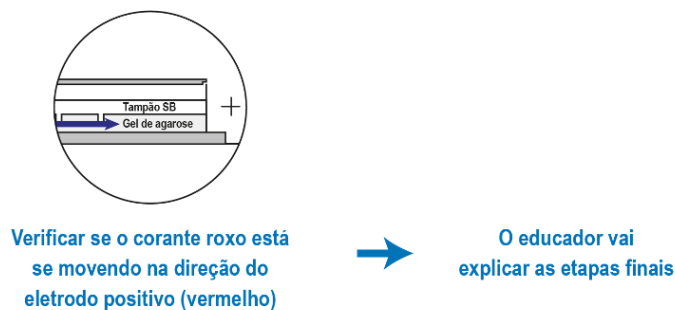
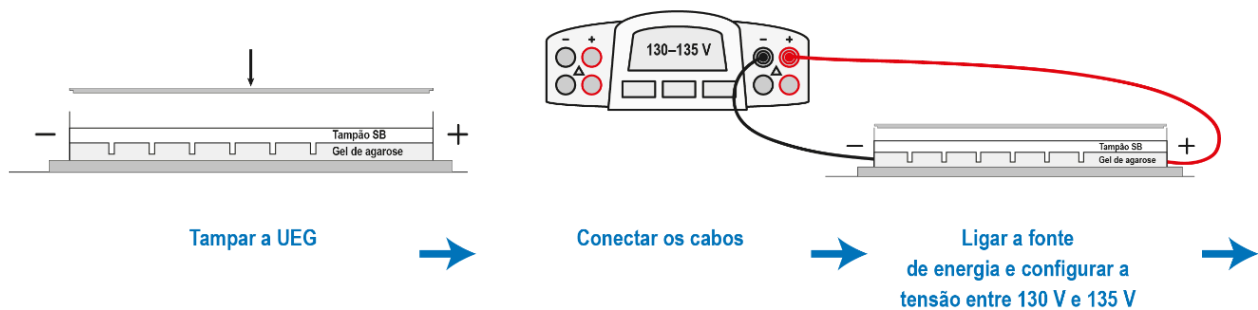
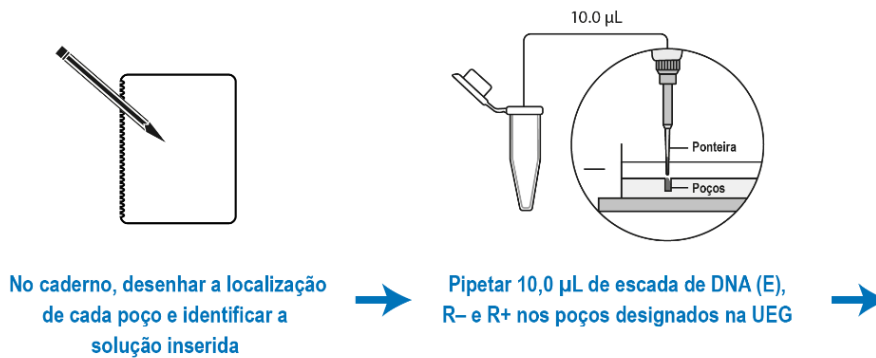
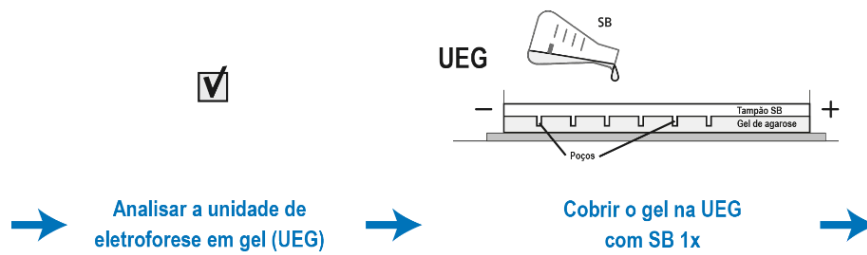
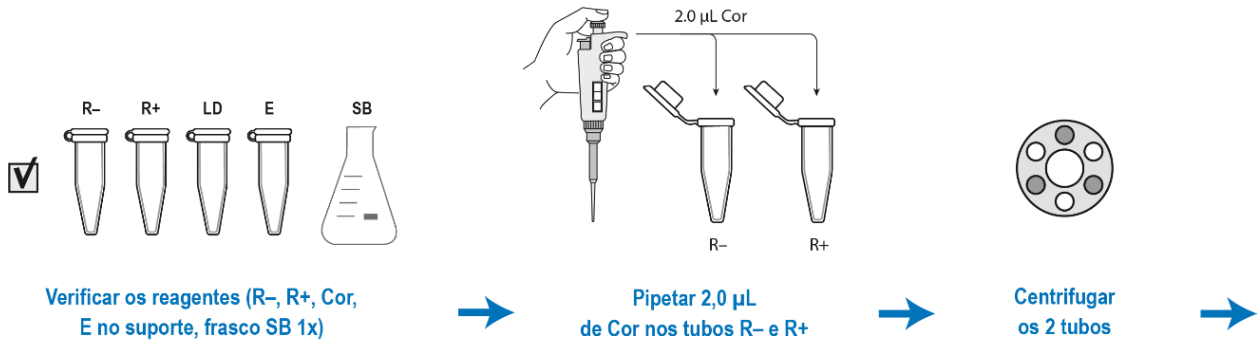
1. O plasmídeo pARA-R que você digeriu no Laboratório 2A foi replicado em uma célula bacteriana. Quais configurações (superenrolada, círculo cortado e multímero) o plasmídeo poderia ter antes da digestão? *O plasmídeo pode ter as três configurações.*
2. Você precisa prever todos os produtos possíveis, inclusive as diferentes configurações do plasmídeo. Revise seu trabalho do Laboratório 2A. Quais produtos você espera ver nos tubos R- e R+? Crie uma tabela que mostre todos os possíveis fragmentos e plasmídeos por tubo. Inclua o comprimento (em pb) de cada possível fragmento ou plasmídeo e organize os produtos encontrados em cada tubo de microcentrífuga por tamanho, do menor para o maior. Inclua também quaisquer configurações possíveis dos plasmídeos e organize-os primeiro pelo tamanho, depois pela velocidade de movimentação no gel, do mais rápido para o mais lento.

A tabela abaixo mostra um exemplo:

Tubo	Fragmentos e plasmídeos listados na ordem crescente de tamanho em pb em cada tubo
R-	(1) pARA-R, 5.302 pb <i>O plasmídeo pode ter as 3 configurações, e a configuração superenrolada deve se mover mais rapidamente.</i>
R+	(1) fragmento de pBAD-rfp, 807 pb (2) fragmento de ampR-ori-araC, 4.495 pb

3. Vá até a seção *Métodos*, leia as páginas 52 a 54 do Guia do Estudante e faça uma breve descrição das etapas, usando palavras e um fluxograma.
As respostas vão variar. O fluxograma dos estudantes pode ser parecido com o apresentado a seguir.

Laboratório 4A Fluxograma



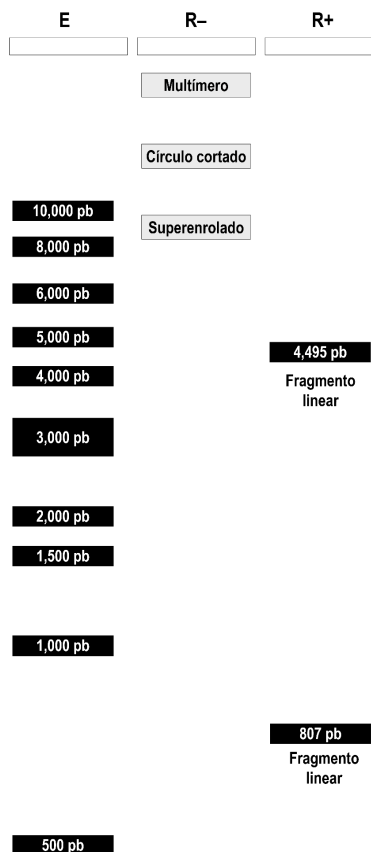
Entregue a cada estudante uma cópia do **Diagrama da escada de DNA (Anexo 4)**.

Durante o laboratório, os estudantes devem discutir em grupos as perguntas da seção PARE E PENSE e anotar as respostas individualmente. Deixe que os estudantes compartilhem com a turma as respostas e reflexões.

Possíveis respostas às perguntas da seção *PARE E PENSE*:



- O DNA não é visível quando se move no gel. O corante de carga contém os 3 corantes que você separou no Laboratório 1.2. Por que é útil usar o corante de carga nesta atividade?
Para garantir que as amostras no gel corram na direção correta.
- A escada de DNA serve como um padrão, porque contém uma mistura de moléculas de DNA de tamanhos conhecidos. Ao passar as amostras e a escada de DNA lado a lado no gel, você consegue estimar o tamanho real em pares de bases das moléculas desconhecidas. O **Diagrama da Escada de DNA (Anexo 4)** mostra 10 bandas de DNA de tamanhos diferentes. Usando essas informações, você consegue prever as posições das bandas de DNA produzidas pelos possíveis produtos encontrados nos tubos R- e R+, indicando sua posição no **Diagrama da Escada de DNA**?
Veja o diagrama a seguir. Observe que os estudantes não vão saber exatamente onde colocar os plasmídeos. Eles devem ter noções gerais de que: (1) os plasmídeos são muito mais lentos que os pedaços lineares de DNA; (2) se os plasmídeos têm o mesmo tamanho, então a diferença de velocidade é determinada pela configuração na ordem do mais rápido para o mais lento: (a) superenrolada, (b) círculo cortado e (c) multímero e (3) se os plasmídeos têm a mesma configuração, então a diferença de velocidade é determinada pelo tamanho.



- As amostras de DNA e a escada de DNA não são visíveis no gel. Como o DNA pode ser visto depois que a eletroforese em gel termina?
A menos que os estudantes conheçam os métodos de pigmentação, as respostas vão variar. Depois de ouvir as ideias dos estudantes, você pode apresentar o processo de pigmentação e explicar que o pigmento é composto de um corante que se fixa às moléculas de DNA, assim como os corantes de roupas se fixam às moléculas de tecido.

Depois do laboratório, você vai precisar pigmentar os géis e documentá-los com fotos para que os estudantes possam responder às *PERGUNTAS do Capítulo 4A*. Veja as instruções incluídas no kit¹⁵.

SESSÃO 3

IDEIAS PRINCIPAIS: os fragmentos de DNA e os plasmídeos que foram separados pela eletroforese em gel podem ser identificados por meio da comparação com a escada de DNA. A identificação pode ser usada para verificar se o plasmídeo recombinante necessário está presente, além de fornecer informações sobre o êxito do procedimento.



Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as *PERGUNTAS do Capítulo 4A* e anatem as respostas individualmente. (20 min)

Para responder a muitas dessas perguntas, os estudantes vão precisar analisar as fotografias dos seus géis. Prepare-se para ajudar os estudantes a entender o que estão observando e a responder às perguntas.

Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes. (25 min)

ESTRATÉGIA: prepare-se para analisar os géis dos estudantes junto com eles e discutir os possíveis motivos para resultados inconclusivos, como um lote ruim de plasmídeos, erros na pipetagem ou na identificação no procedimento de digestão, enzimas inativas e/ou adição de amostras erradas aos poços no gel. Explique que os cientistas verificam seus resultados após cada etapa, mas que aqui os estudantes não têm tempo suficiente para fazer múltiplas checagens.



Possíveis respostas às *PERGUNTAS do Capítulo 4A*:

1. Por que é importante verificar se você tem o plasmídeo recombinante correto?
Você pode cometer erros durante um procedimento ou podem ocorrer outros problemas, como o uso de reagentes incorretos. Os produtos dos procedimentos de engenharia genética não são visíveis, por isso os erros podem passar despercebidos. Você deve verificar se tem o plasmídeo recombinante com o gene necessário, além de outros genes ou sequências importantes antes de continuar o processo de inserção do plasmídeo na bactéria.

ESTRATÉGIA: no início do capítulo, a seção *O que você sabe?* também traz uma pergunta semelhante. Peça aos estudantes que comparem as duas respostas.



¹⁵ N. do E.: adaptamos este passo já misturando o pigmento GelGreen à solução de agarose antes de moldá-la.

ATENÇÃO: as respostas dos estudantes às perguntas 2 a 7 vão variar, dependendo de seu sucesso na realização dos procedimentos, inclusive na eletroforese em gel. As possíveis respostas não poderão ser aplicáveis, caso os procedimentos tenham dado errado.

INDO ALÉM: peça aos estudantes que criem uma curva-padrão para os fragmentos da escada de DNA, traçando um gráfico de pb (ou kpb) versus a distância no gel em um papel semi-log. Os estudantes poderão usar a curva-padrão para determinar com mais precisão o comprimento (número de pb) de bandas desconhecidas.



- Qual é a comparação dos resultados reais do seu gel com suas previsões?
As respostas vão variar, mas, se o procedimento for realizado corretamente, os estudantes devem ver o mesmo número de bandas previsto em cada faixa. É comum que os estudantes deixem de adicionar uma das enzimas necessárias ou coloquem os géis em uma ordem diferente da sugerida no protocolo. Tudo bem, desde que consigam identificar o que está em cada faixa, analisando os plasmídeos não digeridos e os comprimentos dos fragmentos.
- Você está vendo bandas em lugares que não esperava? O que poderia explicar a origem dessas bandas inesperadas?
As respostas vão variar, mas as bandas inesperadas podem aparecer se foram usados reagentes incorretos ou vencidos, se os estudantes colocaram os géis em uma ordem diferente da sugerida no protocolo ou se colocaram gel duas vezes em uma faixa.
- O gel mostra que você está usando o plasmídeo recombinante correto? Descreva as evidências que você usou para fazer essa análise.
Este é o plasmídeo recombinante correto porque a faixa do R+ tem dois fragmentos dos tamanhos corretos.
- Na faixa do R-, você nota evidências de várias configurações de plasmídeos? Explique sua resposta.
Os estudantes devem ver duas ou três bandas diferentes na faixa do R-, o que é uma evidência de várias configurações de plasmídeo.
- Na faixa do R+, você nota evidências de uma digestão completa? Explique sua resposta.
Sim, existem apenas duas bandas na faixa, mostrando que o plasmídeo foi digerido completamente em seus dois fragmentos.
- Em qual faixa você esperaria encontrar o gene *rfp* e o gene *ampR* na fotografia do gel? Você consegue localizar esses dois genes? Explique sua resposta.
*Na faixa do R+, esperaríamos ver uma banda entre os fragmentos de 1.000 pb e 500 pb da escada de DNA, que é o fragmento de 807 pb, que carrega o gene *rfp*. Ainda na faixa do R+, esperaríamos ver outra banda entre os fragmentos de 4.000 pb e 5.000 pb da escada de DNA, que é o fragmento de 4.495 pb, que carrega o gene *ampR*. Vemos as duas bandas nesses locais.*
- Compare as faixas dos fragmentos lineares com as dos plasmídeos. Existe alguma diferença no formato das bandas entre essas duas formas de DNA?
Sim, as bandas dos fragmentos lineares têm bordas definidas.

ESTRATÉGIA: Durante a discussão, empregue as seguintes práticas:

- Dê aos estudantes tempo para refletir sobre as respostas dos colegas.
- Peça esclarecimentos.
- Peça explicações.
- Reformule frases.
- Peça exemplos.
- Peça evidências.
- Forneça exemplos e contraexemplos.
- Peça aos estudantes que complementem uma explicação
- Peça aos estudantes que avaliem uma resposta



INDO ALÉM: como dito anteriormente, muitos animais foram clonados a partir de células somáticas, mas a lista não inclui humanos. Você pode pedir aos estudantes que pesquisem sobre as técnicas e resultados da clonagem e os debates atuais a respeito da clonagem de humanos. Depois façam seu próprio debate sobre o assunto.



CAPÍTULO 5A

COMO INSERIR PLASMÍDEOS RECOMBINANTE BACTÉRIAS

VISÃO GERAL

Neste capítulo, os estudantes vão aprender que os plasmídeos recombinantes precisam ser incorporados pelas bactérias a fim de se replicar e expressar seus genes. No laboratório, os estudantes vão transformar bactérias com o plasmídeo pARA-R que contém o gene *rfp* e o gene *ampR*.

CONHECIMENTO PRÉVIO

Os estudantes já devem saber:

- A relação entre DNA, genes, proteínas e características; mais especificamente que os genes têm o código para produção de uma proteína e que as proteínas são moléculas usadas na fabricação e no funcionamento da célula, sendo, portanto, responsáveis pelos traços dos seres vivos.
- O DNA é uma molécula de fita dupla e cada fita de DNA é formada por subunidades com ligações covalentes chamadas nucleotídeos, que são abreviados de acordo com a base nitrogenada que contêm (C, G, A, T).
- A transcrição é o processo pelo qual as informações codificadas no DNA são transferidas ao RNA mensageiro, um ácido ribonucleico de fita simples.
- A tradução é o processo pelo qual as informações codificadas no RNA mensageiro são decodificadas e transformadas em proteína.

OBJETIVOS DE APRENDIZADO

Ao final deste capítulo, os estudantes vão saber:

- Descrever o papel da transformação no processo de clonagem de genes.
- Explicar para que serve cada controle usado no experimento de transformação.
- Explicar como as informações codificadas em um gene definem características.

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

- Avalie a capacidade de cada estudante de descrever o papel da transformação no processo de clonagem de genes. Para isso, analise as respostas à pergunta 4 das *PERGUNTAS do Capítulo 5* (página 72 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar o objetivo de cada controle no experimento de transformação. Para isso, analise as respostas às perguntas 1 e 2 da seção *ANTES DO LABORATÓRIO* (página 65 do Guia do Estudante), à primeira pergunta da seção *PARE E PENSE* no Laboratório 5A (página 68 do Guia do Estudante) e à pergunta 3 das *PERGUNTAS do Capítulo 5A* (página 72 do Guia do Estudante) e seu trabalho sobre **Previsões do crescimento bacteriano (Anexo 5)**.
- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar as informações codificadas em um gene que definem características. Para isso, analise as respostas às perguntas 5 e 6 das *PERGUNTAS do Capítulo 5A* (página 72 do Guia do Estudante).

SEQUÊNCIA SUGERIDA DE ATIVIDADES

SESSÃO 1

- Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS** do *Capítulo 5A* com os estudantes. (5 min)
- Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção *O QUE VOCÊ JÁ SABE?* e compartilhem as respostas. (10 min)
- Peça aos estudantes que leiam o texto **“Como transformar bactérias com plasmídeos recombinantes”** e respondam às perguntas da seção *REFLITA*. (10 min)
- Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes às perguntas da seção *REFLITA* sobre o texto **“Como transformar bactérias com plasmídeos recombinantes**. (5 min)
- Os estudantes devem começar o Laboratório 5A pela leitura dos parágrafos introdutórios e responder às perguntas da seção *ANTES DO LABORATÓRIO* em grupos. (15 min)

SESSÃO 2

- Os estudantes continuam trabalhando no Laboratório 5A. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções *ANTES DO LABORATÓRIO* e *PARE E PENSE* e expliquem o raciocínio. (45 min)

ATENÇÃO: este laboratório tem 2 períodos de espera de 15 minutos, durante os quais os estudantes poderão compartilhar as respostas às perguntas.

SESSÃO 3

- Peça à turma que analise os resultados do Laboratório 5A. (10 min)
- Mostre como preparar uma cultura em suspensão para a bactéria transformada, na preparação para o Capítulo 6. (5 min)
- Revisem o que é transcrição, tradução e a relação entre genes, proteínas e características. (10 min)
- Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as *PERGUNTAS* do *Capítulo 5A* e anotem as respostas individualmente. (10 min)
- Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes. (10 min)

PREPARAÇÃO

Antes de começar, você deve se familiarizar com os procedimentos utilizados neste capítulo, com a preparação necessária e com os materiais que você vai usar. As instruções presumem que você vai precisar de materiais para 12 grupos de 2 ou 3 estudantes. Multiplique as quantidades de acordo com o número de estudantes e de turmas.

TÉCNICA DE LABORATÓRIO: as células competentes necessárias para o Laboratório 5A precisam ser armazenadas no freezer até o dia em que forem ser utilizadas. Portanto, prepare a alíquota dos reagentes e reúna os materiais para o laboratório no mesmo dia em que for realizá-lo. Tente descongelar as células o menor número de vezes possível.



FAÇA CÓPIAS DAS FOLHAS DE ATIVIDADES PARA O LABORATÓRIO 5A

Você vai precisar de uma cópia da atividade **Previsões do crescimento bacteriano (Anexo 5)** para cada estudante. O anexo para a atividade está disponível no final deste guia.

REVISE AS PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E OS PROCEDIMENTOS PARA DESCARTE DE RESÍDUOS PARA O LABORATÓRIO 5A

Revise com os estudantes as precauções de segurança e procedimentos nas páginas 22 e 23 deste guia.

CALIBRE O BANHO-MARIA PARA O LABORATÓRIO 5A

Se seu banho-maria ainda não estiver montado, consulte a seção *Montagem e calibração do banho-maria para o Laboratório 2A* (página 64 deste guia). Para este laboratório, calibre o banho-maria a 42 °C, certificando-se de que haja água suficiente e que o equipamento esteja coberto para reduzir a evaporação. Use água destilada no banho-maria e deixe o termômetro, o cronômetro e o suporte flutuante para tubo de microcentrífuga no banho-maria.

PREPARE A ALÍQUOTA DOS REAGENTES E REÚNA OS MATERIAIS PARA O LABORATÓRIO 5A

Reúna os materiais no dia do laboratório. Depois de preparar os suportes com os reagentes, armazene tudo no refrigerador até o momento de serem utilizados pelos estudantes. Prepare a alíquota das células competentes 15 minutos antes de começar o laboratório (veja a etapa 5).

1. Coloque identificações nos tubos de microcentrífuga da seguinte maneira:
 - 12 tubos de 1,5 mL com a identificação "CL"
 - 12 tubos de 1,5 mL com a identificação "pR-5A"
 - 12 tubos de 1,5 mL com a identificação "CC"
2. Pipete os reagentes nos tubos de microcentrífuga:
 - 350 µL de Caldo Luria nos tubos com a identificação "CL"

- 12,0 μL de plasmídeo recombinante pARA-R (10ng/ μL) nos tubos com a identificação "pR-5A"
3. Prepare 12 conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:
- Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com os seguintes reagentes (preparados acima):
 - Tubo com CL
 - Tubo com pR-5A
 - 2 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
 - Marcador permanente
 - Micropipeta P-20
 - Micropipeta P-200
 - Caixa de ponteiros descartáveis
 - 3 placas de Petri com ágar:
 - 1 Placa CL (1 risco)
 - 1 Placa CL/amp (2 riscos)
 - 1 Placa CL/amp/ara (3 riscos)
4. Reúna os demais materiais necessários para o laboratório:
- Luvas descartáveis
 - Copos de isopor (um por grupo)
 - Alças de Drigalski
 - Fita adesiva
 - Saco de lixo de resíduos biológicos
 - Coletor de resíduos líquidos, como um béquer pequeno
 - Uma cópia da atividade **Previsões do crescimento bacteriano (Anexo 5)** para cada estudante
5. Prepare as células competentes 15 minutos antes de começar o laboratório da seguinte maneira:
- Ponha em um recipiente pequeno gelo picado.
 - Coloque os tubos CC no gelo.
 - Pipete 100 μL de células competentes de E. coli em cada tubo CC, segurando os tubos somente pelas bordas, devolvendo-os imediatamente ao gelo.
 - Deixe o recipiente com gelo e as células competentes no centro da sala.
 - Coloque os copos de isopor ao lado do recipiente com gelo.
6. Deixe a incubadora no centro da sala e calibre-a a 37 °C.
7. Coloque as alças de Drigalski e a fita adesiva no centro da sala para que todos os grupos possam compartilhá-las.

ATENÇÃO: as placas dos grupos serão incubadas pelo tempo de 24 a 36 horas, a 37 °C. Se os estudantes não forem se reunir dentro de 24 horas, remova as placas da incubadora e coloque-as no refrigerador. Se não houver uma incubadora, as placas devem ser armazenadas em temperatura ambiente por até 48 horas e depois seguir para o refrigerador.

METODOLOGIA DE ENSINO

SESSÃO 1

IDEIAS PRINCIPAIS: assim que um plasmídeo recombinante é criado, ele deve ser incorporado pela bactéria para que ele possa usar a maquinaria celular da bactéria para se replicar e expressar o gene de interesse. O processo de incorporação do DNA do ambiente pela bactéria é chamado de transformação. Como a bactéria é um organismo unicelular que existe em um ambiente hostil, ela não é transformada prontamente. No entanto, com uma preparação específica, 1 em 1.000 células vão incorporar os plasmídeos.



Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS do Capítulo 5A** com os estudantes. (5 min)

A **INTRODUÇÃO** explica o objetivo principal do capítulo e o relaciona à Introdução do programa. Os **OBJETIVOS do Capítulo 5A** informam o foco de aprendizagem necessário aos estudantes durante as atividades propostas neste capítulo. Explique o que você vai avaliar neste capítulo e quais são suas expectativas em relação ao desempenho dos estudantes.

Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** e compartilhem as respostas. (10 min)

A seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** ativa o conhecimento dos estudantes sobre a incorporação do plasmídeo e a expressão gênica, além de revelar lacunas no conhecimento. Divida a turma em duplas e peça a eles que respondam às perguntas, anatem suas respostas e compartilhem suas ideias com a turma para que você possa avaliar o que eles sabem e o que não sabem sobre incorporação de plasmídeos e expressão gênica.

Possíveis respostas às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?**:

1. Você acha que é comum um plasmídeo do ambiente ser incorporado por uma bactéria? Por quê?
Provavelmente é um acontecimento incomum. As células vão tentar se proteger de substâncias presentes no ambiente, já que essas substâncias podem trazer danos às células.
2. Como são as etapas de transcrição e de tradução de um gene?
Durante a transcrição, o DNA é copiado no RNA mensageiro. Durante a tradução, o RNA mensageiro é decodificado em uma parte da célula chamada ribossomo. O ribossomo lê os códons do RNAm e traduz a informação em aminoácidos. Cada códon (ou grupo de três bases) na sequência corresponde a um aminoácido, e os aminoácidos, por sua vez, são os blocos construtores de proteínas.
3. Qual é a relação entre genes, proteínas e traços (ou características observáveis)?
O gene contém o código para a produção de uma proteína e as proteínas são moléculas usadas na fabricação e no funcionamento da célula e, portanto, são responsáveis pelas características. Em geral, a característica é o resultado de múltiplas proteínas.

4. O que as bactérias e os seres humanos têm em comum que possibilita a expressão gênica em bactérias? *A estrutura e o código do DNA são iguais nas bactérias e nos humanos. A maquinaria celular que realiza a transcrição e a tradução é igual nas bactérias e nos humanos.*

Peça aos estudantes que leiam o texto “Como transformar bactérias com plasmídeos recombinantes” e respondam às perguntas da seção REFLITA. (10 min)

Neste texto, os estudantes vão aprender sobre a transformação, que é a incorporação do DNA pela bactéria. A célula bacteriana fornece a maquinaria celular que permite que um plasmídeo recombinante se replique e expresse um gene. Os estudantes vão aprender que o código do DNA e os processos de transcrição e tradução são universais, o que possibilita a expressão de um gene humano pela bactéria. Peça aos estudantes que anotem as respostas às perguntas da seção REFLITA nos cadernos. Lembre a turma de consultar o **Glossário** para descobrir o significado dos termos científicos que eles não conhecem.

Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes às perguntas da seção REFLITA sobre o texto “Como transformar bactérias com plasmídeos recombinantes”. (5 min)

Avalie o conhecimento dos estudantes sobre expressão gênica, incorporação de plasmídeos, DNA e sobre o modo como as ligases são usadas na engenharia genética. Para isso, analise as respostas dos estudantes às perguntas da seção REFLITA.

Possíveis respostas às perguntas da seção REFLITA:

- Quando um gene é inserido em um vetor, o que você acha que é necessário para fabricar o produto codificado pelo gene inserido?
O vetor deve ser inserido em uma célula de modo que seu DNA possa ser transcrito e traduzido em uma proteína. Se o vetor tiver um ativador para o promotor, como o araC, pode ser necessária a presença de uma substância, como a arabinose.
- Por que é importante que as paredes celulares da bactéria *E. coli* façam o controle rigoroso das substâncias que entram e saem da célula?
A célula regula as substâncias que podem entrar e sair porque algumas substâncias podem ser prejudiciais a ela.



Os estudantes devem começar o Laboratório 5A pela leitura dos parágrafos introdutórios e responder em grupos às perguntas da seção ANTES DO LABORATÓRIO. (15 min)

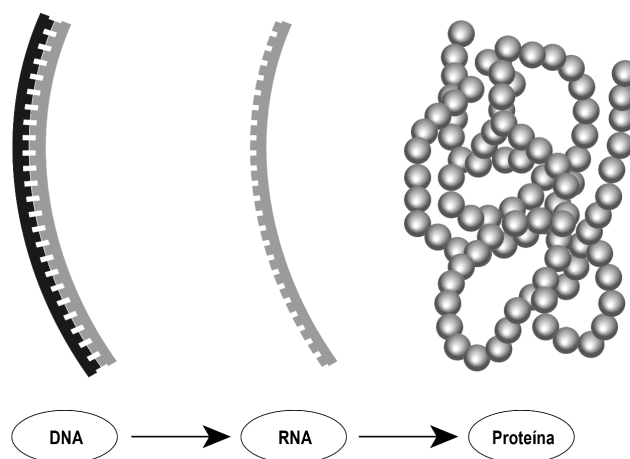
Os estudantes vão discutir em grupos as perguntas da seção ANTES DO LABORATÓRIO e anotar as respostas individualmente. Se necessário, essa atividade pode ser feita como tarefa.

CONHECIMENTO CIENTÍFICO:

O DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA MOLECULAR E A TRANSCRIPTASE REVERSA

Em 1957, Francis Crick fundou as bases intelectuais para a compreensão do modo como as informações presentes no DNA determinam as características dos organismos. Ele propôs o que conhecemos como o “dogma central da biologia molecular”, que afirma que as informações genéticas armazenadas no DNA são transferidas para o RNA no processo de transcrição. O RNA “mensageiro” (RNAm) transporta essas informações até os ribossomos, onde elas são traduzidas em proteínas (veja a **Figura 5A.1**).

Figura 5A.1: Dogma central da biologia molecular

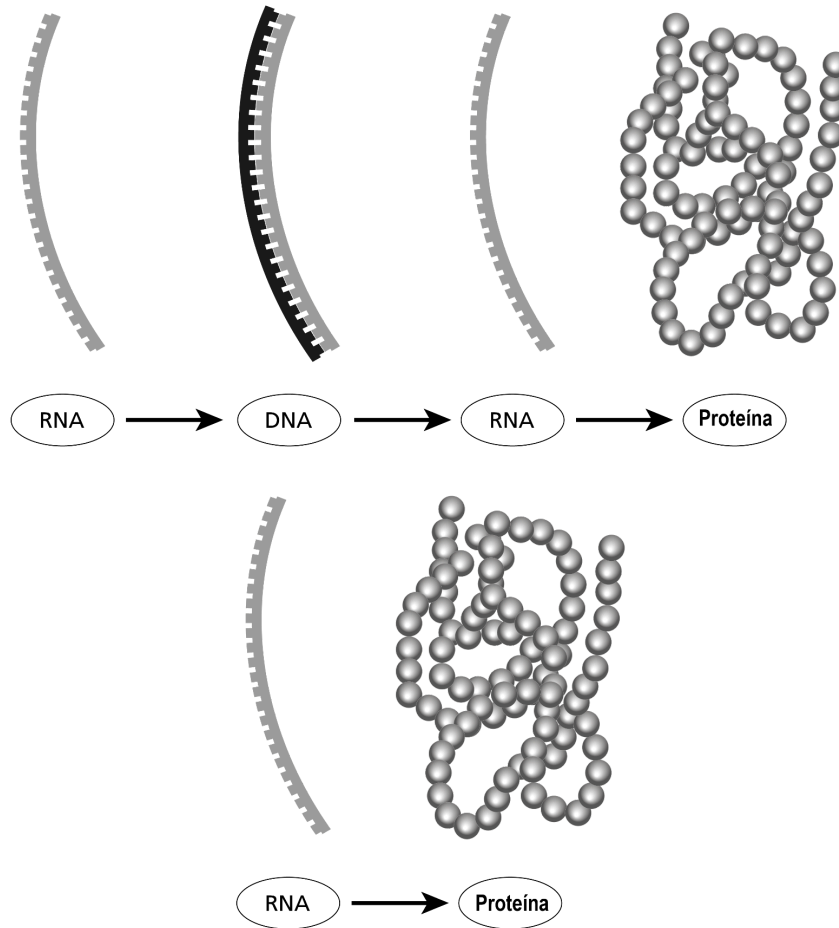


A descoberta de que determinados vírus não utilizam o DNA, mas, sim, o RNA como material genético, levou a uma modificação significativa do dogma central. Um grupo de vírus de RNA, chamados retrovírus, armazena suas informações genéticas na forma de RNA de fita simples, e as informações presentes no RNA são transformadas em DNA pela enzima transcriptase reversa. Esse DNA é integrado ao genoma da célula hospedeira e transcrito pela RNA-polimerase da célula hospedeira em RNAm, que é traduzido pela maquinaria de síntese de proteínas da célula hospedeira para gerar proteínas virais.

Outro grupo de vírus, chamados vírus de fita simples positiva, ignora completamente o DNA. Uma molécula de RNA de fita simples serve tanto como material genético quanto RNAm. O poliovírus é um exemplo de vírus cujo RNA genômico tem três funções: (1) armazenar informações genéticas; (2) servir de modelo para a replicação por uma RNA-polimerase dependente do RNA; e (3) agir como um RNAm que direciona a tradução das informações codificadas em proteínas virais.

Essas descobertas demonstraram que o fluxo de informações, conforme citado no dogma central, tem múltiplos caminhos. Além do caminho mostrado acima, existem dois caminhos adicionais, conforme mostra a **Figura 5A.2**.

Figura 5A.2: Caminhos alternativos para o dogma central



A descoberta da transcriptase reversa por Howard Temin e David Baltimore, que receberam o Prêmio Nobel em 1970, forneceu uma ferramenta de valor inestimável à biotecnologia. Com a transcriptase reversa, é possível fazer cópias do DNA diretamente a partir do RNAm. Essa cópia do DNA (cDNA) aliviou os problemas apresentados pelo fato de que o DNA genômico não poderia ser usado nas bactérias, que não têm a capacidade de fazer o processo de splice (remoção) dos íntrons do RNAm. O cDNA contém apenas éxons, podendo, portanto, ser usado nas bactérias para produzir a proteína codificada.

Além de carregar as informações genéticas, algumas moléculas de RNA podem agir como enzimas e participam da regulação da expressão gênica. A capacidade do RNA de desempenhar várias funções diferentes nas células levou os cientistas a propor que a forma ancestral da vida era baseada no RNA e que, posteriormente, evoluiu para as formas que conhecemos hoje, sendo o DNA a principal biomolécula de herança.

IDEIAS PRINCIPAIS: para identificar as células bacterianas que foram transformadas com o plasmídeo pARA-R, é preciso cultivá-las na presença de ampicilina e arabinose. A ampicilina evita o crescimento das células que não carregam o gene de resistência a esse antibiótico e a arabinose vai ativar o promotor da bactéria que controla a expressão do gene *rfp*¹⁶.



Os estudantes continuam trabalhando no Laboratório 5A. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas das seções ANTES DO LABORATÓRIO e PARE E PENSE e expliquem o raciocínio. (45 min)

Os estudantes devem realizar a atividade do Laboratório 5A, em que vão transformar as bactérias com o plasmídeo pARA-R que contém o gene *rfp* e o gene *ampR*. Nesta atividade, os estudantes aprenderão a importância dos controles quando forem selecionar as bactérias que incorporaram o plasmídeo pARA-R.

Primeiro, peça aos estudantes que realizem as etapas 1 a 6 da seção *Métodos*. Em seguida, enquanto os tubos P- e P+ ficam no gelo por 15 minutos, peça a eles que compartilhem as respostas à pergunta 3 da seção *ANTES DO LABORATÓRIO*.

A seguir, as possíveis respostas às perguntas da seção *ANTES DO LABORATÓRIO*:

1. A ampicilina é um antibiótico que mata as células bacterianas, interrompendo a formação das paredes celulares. No entanto, o plasmídeo pARA-R tem o gene de resistência à ampicilina, que produz uma proteína que destrói a ampicilina. Qual é o objetivo de cultivar uma bactéria transformada na presença de ampicilina?

Somente as células que tenham um plasmídeo com o gene de resistência à ampicilina vão conseguir crescer na presença da ampicilina. Você pode selecionar as células que foram transformadas, que são muito poucas.

2. O que acontecerá quando as células bacterianas contendo o plasmídeo pARA-R não forem submetidas à presença de arabinose?

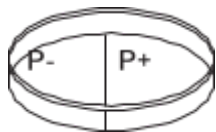
*O gene *rfp* não poderá ser expresso, a menos que a célula receba arabinose. Somente na presença de arabinose a proteína ativadora AraC ativará o promotor do gene *rfp*.*

¹⁶ N. do E.: lembre-se de que a ampicilina é um antibiótico da família das penicilinas e pode causar alergia em pessoas que tenham propensão. Questione a sala para saber se algum estudante é alérgico a antibióticos ou à injeção de Benzetacil (os alunos podem não saber que se trata de um antibiótico injetável). Caso alguém se manifeste, oriente essa pessoa a não manipular as placas de Petri com meio de cultura.

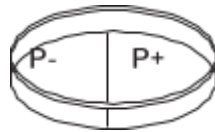
INDO ALÉM: talvez você queira apresentar informações mais detalhadas sobre o funcionamento da proteína ativadora AraC. O gene *araC* faz parte do operon arabinose, que é um exemplo clássico da regulação gênica nas bactérias (veja a **Figura 2A.1** na página 77 deste guia). Além do *araC*, o operon é composto de três genes: *araB*, *araA* e *araD*, que codificam as proteínas responsáveis pelo transporte e pela quebra da arabinose. Ele tem também um promotor e uma sequência de DNA 5' próxima ao promotor, que se liga à proteína AraC. A proteína AraC regula a expressão dos genes da arabinose, permitindo a transcrição na presença de arabinose ou desativando a expressão do gene em sua ausência. No plasmídeo pARA-R, o operon arabinose controla a expressão do gene *rfp* e a proteína RFP só pode ser fabricada na presença de arabinose.



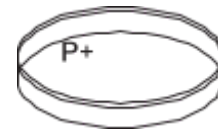
3. No laboratório, você vai adicionar amostras do grupo de controle P- e do grupo de tratamento P+ às placas que contêm várias combinações de Caldo Luria (CL), ampicilina (amp) e açúcar arabinose (ara). As placas devem ser organizadas da seguinte forma:



Placa CL



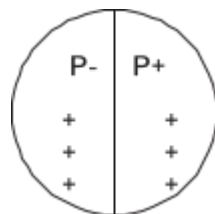
Placa CL/amp



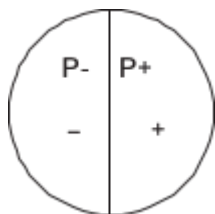
Placa CL/amp/ara

Usando a legenda na folha de exercícios **Previsões do crescimento bacteriano (Anexo 5)**, mostre suas previsões para o crescimento de cada combinação. Em seguida, preencha a **Tabela 1** e a **Tabela 2** no trabalho a ser entregue, descrevendo as possíveis conclusões no caso de um crescimento conforme o previsto e de um crescimento diferente do previsto.

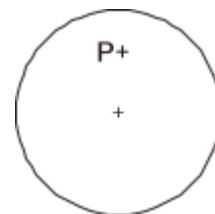
Previsões para cada placa:



placa CL



placa CL/amp



placa CL/amp/ara

Respostas à **Tabela 1** e à **Tabela 2** do **Anexo 5**:

Tabela 1: Grupo de controle P- (bactérias não transformadas)

Conteúdo da placa:	Crescimento previsto	Conclusão, caso o crescimento previsto ocorra	Conclusão, caso o crescimento previsto não ocorra
Caldo Luria (CL)	+++	<i>As bactérias não transformadas estão vivas e o Caldo Luria é capaz de sustentar seu crescimento</i>	<i>Problema com as bactérias, Caldo Luria ou métodos</i>
Caldo Luria ampicilina (CL/amp)	-	<i>A ampicilina mata as bactérias não transformadas</i>	<i>Problema com a ampicilina</i>

Tabela 2: Grupo experimental P+ (bactérias transformadas)

Conteúdo da placa:	Crescimento o previsto	Conclusão, caso o crescimento previsto ocorra	Conclusão, caso o crescimento previsto não ocorra
Caldo Luria (CL)	+++	<i>As bactérias transformadas estão vivas e o Caldo Luria é capaz de sustentar seu crescimento; as bactérias não foram afetadas pelo processo de transformação</i>	<i>Problema com as bactérias, Caldo Luria ou processo de transformação</i>
Caldo Luria ampicilina (CL/amp)	+	<i>Algumas bactérias transformadas têm plasmídeos com resistência à ampicilina</i>	<i>A transformação não funcionou</i>
Caldo Luria ampicilina arabinose (CL/amp/ara)	+	<i>Algumas bactérias transformadas têm plasmídeos com resistência à ampicilina</i>	<i>Problema com a arabinose; a transformação não funcionou</i>

ESTRATÉGIA: muitos estudantes têm dificuldade de entender os controles e podem se beneficiar de uma discussão a respeito do cultivo de bactérias não transformadas e transformadas em cada condição. Ajude-os a entender que cada controle tem o objetivo de fornecer uma resposta a um questionamento útil, a saber:



- As células são viáveis?
- A ampicilina mata as células não transformadas?

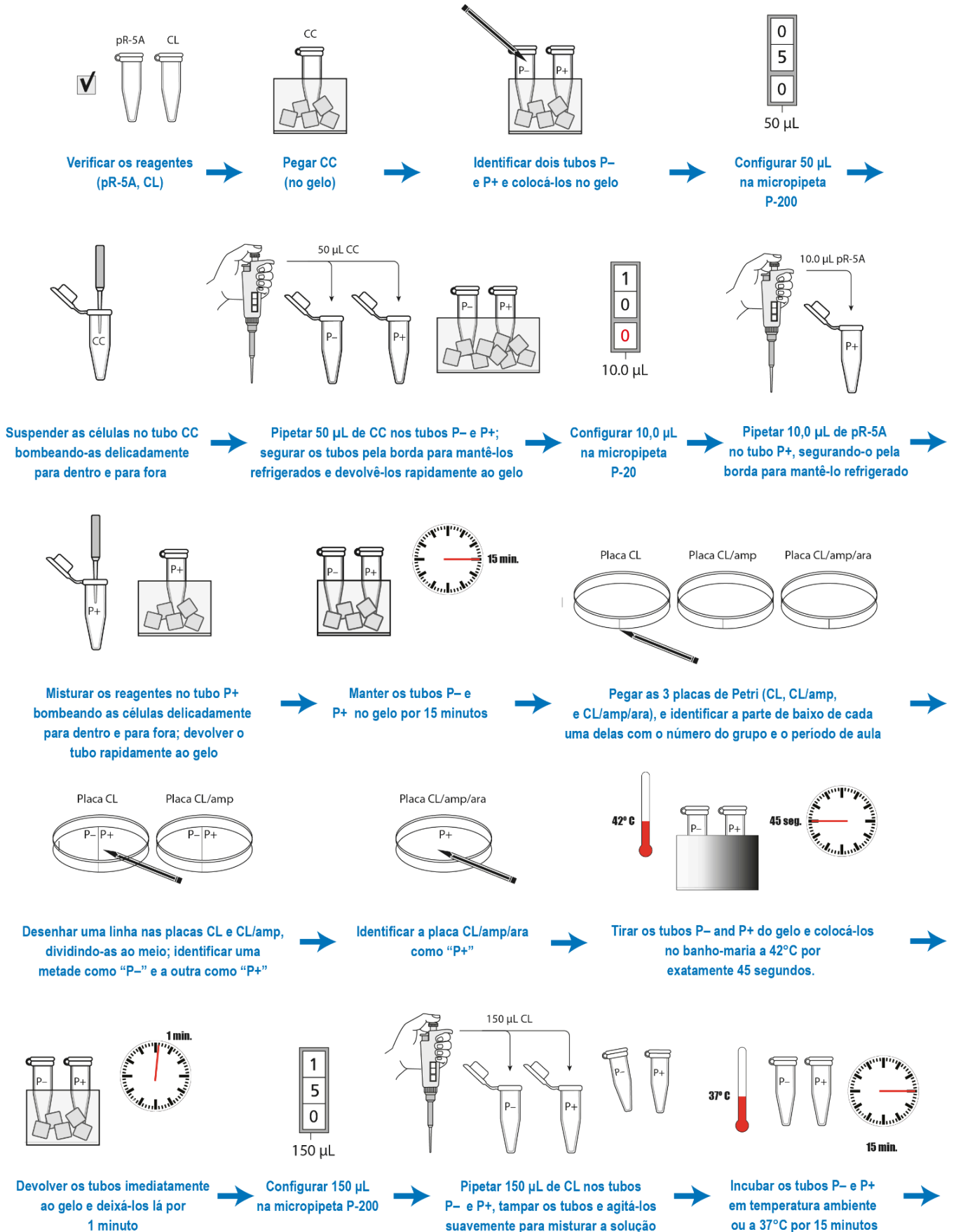
- As células são viáveis depois do procedimento de transformação?
- A transformação foi bem-sucedida no sentido de que algumas células adquiriram resistência à ampicilina?
- Alguma célula transformada produz RFP?

Você pode pedir aos estudantes que considerem um cenário em que as células foram transformadas e colocadas na placa CL/amp/ara, mas não cresceram e vocês não fizeram nenhum tipo de controle. Ajude-os a entender que somente se o pesquisador tiver cultivado as bactérias realizando cada controle, ele conseguirá determinar por que o procedimento de transformação não funcionou.

Se os estudantes perguntarem por que as células não transformadas não são colocadas na placa CL/amp/ara, diga a eles para refletirem se isso responde a um questionamento útil que esclarece o sucesso do experimento.

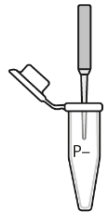
4. Vá até a seção *Métodos*, leia as páginas 67 a 71 do Guia do Estudante e faça uma breve descrição das etapas, usando palavras e um fluxograma. *As respostas vão variar.*
Os fluxogramas dos estudantes podem ser parecidos com o seguinte diagrama:

Laboratório 5A Fluxograma

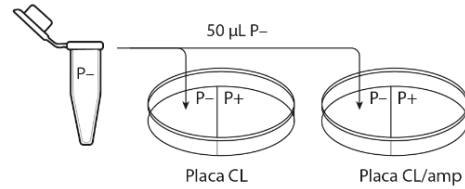




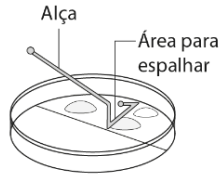
Configurar 50 µL na micropipeta P-200



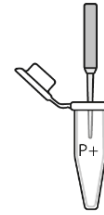
Bombear a pipeta delicadamente algumas vezes no tubo P-



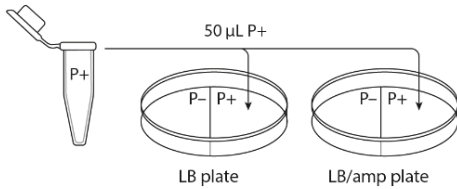
Pipetar 50 µL da solução do P- nas metades das placas CL e CL/amp identificadas como P- e fechá-las imediatamente após dispensar a solução do tubo P-



Usar uma alça para espalhar as células P- sobre as metades P- das placas CL (1º) e CL/amp (2º) e fechá-las



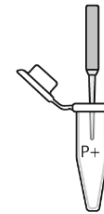
Com uma nova ponteira bombear a pipeta delicadamente algumas vezes no tubo P+



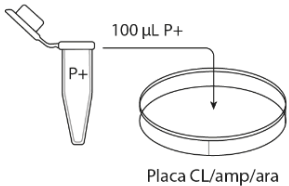
Pipetar 50 µL da solução do P+ nas metades das placas CL e CL/amp identificadas como P+ e fechá-las após dispensar a solução do tubo P+



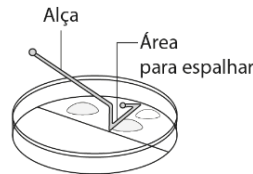
Configurar 100 µL na micropipeta P-200



Bombear a pipeta delicadamente algumas vezes no tubo P+



Pipetar 100 µL da solução do P+ em várias seções da placa CL/amp/ara e fechá-la



Usar uma alça para espalhar as células P+ sobre as metades P+ das placas CL (1o) e CL/amp (2o), depois sobre a placa CL/amp/ara e fechá-las



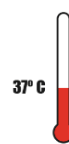
Deixar as placas descansar com a abertura virada para cima por 5 minutos



Com uma fita adesiva, unir as três placas e escrever na fita o número do grupo e o período de aula



Colocar as placas na incubadora a 37 °C e de cabeça para baixo



Incubar as placas por 24 a 36 horas a 37 °C ou em temperatura ambiente por 48 horas



Examinar as placas e anotar no caderno a quantidade de crescimento em cada metade da placa

Enquanto os tubos P- e P+ estão na incubadora na etapa 11, peça aos estudantes que discutam as perguntas da seção **PARE E PENSE** e anotem as respostas individualmente. Deixe que os estudantes compartilhem com a turma as respostas e reflexões.

Possíveis respostas às perguntas da seção **PARE E PENSE**:



- Qual é a diferença no tratamento da cultura de bactérias do tubo P+ e da cultura de bactérias do tubo P-? (*Cultura é uma população isolada de células*). Qual é o objetivo da cultura de bactérias do tubo P-?
A cultura de bactérias do tubo P+ é misturada com os plasmídeos recombinantes, já a cultura de bactérias do tubo P- não é misturada com os plasmídeos recombinantes. O objetivo da cultura de bactérias do tubo P- é garantir que as células e as condições de crescimento funcionem como o esperado. A cultura de bactérias do tubo P- deve se desenvolver bem no Caldo Luria e morrer quando exposta ao antibiótico ampicilina.
- Por que as células precisam de tempo para se recuperar após o choque térmico?
O choque implica estresse às bactérias pelo calor. Deixar as bactérias assentarem sem sujeitá-las a nenhuma condição dá às células tempo para voltar ao seu estado usual.
- Por que as células são incubadas a 37 °C?
As bactérias estão adaptadas para crescer dentro do corpo humano, que mantém essa temperatura.
- Você utilizou técnicas de assepsia nesta atividade. Por que isso é importante?
As técnicas de assepsia podem evitar a transferência de bactérias do experimento ao ambiente e do ambiente ao experimento.

Ao final do laboratório, lembre os estudantes de que eles precisam colocar todos os materiais que tiveram contato com as células de *E. coli* no saco de lixo de resíduos biológicos identificado.

SESSÃO 3

IDEIAS PRINCIPAIS: as células bacterianas transformadas com o plasmídeo pARA-R são identificadas por um processo de seleção que utiliza as sequências que foram modificadas no plasmídeo.



Os estudantes vão continuar o Laboratório 5A. (10 min)

Peça a eles que retirem suas placas das incubadoras e anotem os resultados no caderno¹⁷. Se você for realizar o Laboratório 6, guarde algumas placas com colônias vermelhas ou rosa brilhante e peça aos estudantes que coloquem as demais placas no saco de lixo de resíduos biológicos.

Caso vá realizar o Laboratório 6, mostre aos estudantes como preparar uma cultura em suspensão para a bactéria transformada, na preparação para o Capítulo 6. (5 min)

Siga as instruções passo a passo na seção **Preparação** (*Cultivo de bactérias para purificação de proteínas*, na página 116 deste guia). Remova as colônias de células transformadas das placas e coloque-as em uma cultura em suspensão em um frasco de agitação.

¹⁷ N. do E.: lembre-se que a ampicilina é um antibiótico da família das penicilinas e pode causar alergia em pessoas que tenham propensão. Questione a sala para saber se algum estudante é alérgico a antibióticos ou à injeção de Benzetacil (os alunos podem não saber que se trata de um antibiótico injetável). Caso alguém se manifeste, oriente essa pessoa a não manipular as placas de Petri com meio de cultura.

Essas células e os plasmídeos pARA-R que elas contêm vão se multiplicar nos próximos dias.

Revisem o que é transcrição, tradução e a relação entre genes, proteínas e características. (10 min)

ESTRATÉGIA: a revisão é importante porque ajuda os estudantes a aplicarem seus conhecimentos prévios ao experimento.



Aproveite essa revisão para abordar as lacunas no conhecimento, identificadas nas respostas às perguntas 2 e 3 da seção *O QUE VOCÊ JÁ SABE?*. Consulte a **Figura 5A.2** na página 71 do Guia do Estudante durante a revisão.

Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as PERGUNTAS do Capítulo 5A e anotem as respostas individualmente. Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes. (20 min)

Peça a eles que reflitam sobre seu conhecimento a respeito do processo de seleção para identificar as células bacterianas transformadas com o plasmídeo pARA-R e a expressão gênica, respondendo às *PERGUNTAS do Capítulo 5A*.

Possíveis respostas às *PERGUNTAS do Capítulo 5A*:

1. Veja os resultados de sua transformação. Os resultados reais são iguais aos resultados previstos? Se não, que diferenças você observou e quais seriam as explicações para essas diferenças?
As respostas vão variar. No caso de resultados inesperados, ajude os estudantes a pensar no que pode ter acontecido. Existem muitos procedimentos que podem dar errado e afetar os resultados.
2. Quantas colônias vermelhas havia na placa CL/amp/ara?
As respostas vão variar. Todos os grupos devem ter poucas colônias expressando RFP, a menos que cometam algum erro na realização dos procedimentos.
3. Por que as colônias vermelhas apareceram apenas na placa CL/amp/ara e não na placa CL/amp?
O gene rfp não pode ser expresso, a menos que a célula receba arabinose, já que o operon arabinose apenas ativará o promotor do gene rfp na presença de arabinose.
4. Os plasmídeos recombinantes são produzidos para que consigam se replicar na célula, independentemente da replicação cromossômica. Por que é importante ter várias cópias de um plasmídeo recombinante em uma célula?
Na engenharia genética, o objetivo é fabricar muito produto, como a insulina. Quanto mais cópias do plasmídeo e de seu gene, maior a fabricação de produto na célula.
5. Como as informações codificadas no gene *rfp* são expressas na forma de traços? Use seus conhecimentos sobre expressão gênica e a relação entre DNA, RNA, proteína e traços.
O gene rfp dos plasmídeos é formado por DNA, e o gene é copiado no RNA mensageiro. Esse processo se chama transcrição. O RNA mensageiro é usado para fabricar a proteína no ribossomo, ligando-se às moléculas de RNA de transferência que combinam códons e aminoácidos; os aminoácidos são então unidos para formar a proteína. Esse processo se chama tradução. A proteína pode contribuir para uma característica e, neste caso, a RFP é responsável pela cor vermelha das células.

6. Por que as bactérias conseguem produzir proteína humana, como a insulina, ou uma proteína da anêmona-do-mar, como a RFP?

A estrutura e o código do DNA, além da maquinaria celular que realiza os processos de transcrição e tradução, são os mesmos em todos os organismos vivos.

ESTRATÉGIA: durante a discussão, empregue as seguintes práticas:

- Dê aos estudantes tempo para refletir sobre as respostas dos colegas.
- Peça esclarecimentos.
- Peça explicações.
- Reformule frases.
- Peça exemplos.
- Peça evidências.
- Forneça exemplos e contraexemplos.
- Peça aos estudantes que complementem uma explicação.
- Peça aos estudantes que avaliem uma resposta.



CAPÍTULO 6

COMO CONSEGUIR O QUE PRECISAMOS

VISÃO GERAL

Neste capítulo, os estudantes vão realizar as etapas finais do processo de engenharia genética, obtendo e separando uma proteína de interesse fabricada por um gene clonado. Os estudantes vão ler sobre o crescimento das células bacterianas, o modo como a conformação da proteína está relacionada à sua função, o enovelamento da proteína e o papel dos aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos tanto no enovelamento quanto na separação da proteína. No laboratório, vão fazer a lise da bactéria transformada e usar a cromatografia em coluna para separar a RFP do resto das proteínas celulares.

CONHECIMENTO PRÉVIO

Os estudantes já devem saber:

- A relação entre DNA, genes, proteínas e traços; mais especificamente que os genes têm o código para a produção de uma proteína e as proteínas são moléculas usadas na fabricação e no funcionamento da célula, sendo, portanto, responsáveis pelos traços.
- As bactérias se reproduzem de forma assexuada por meio da divisão celular.
- As proteínas são biomoléculas grandes formadas por uma ou mais cadeias longas compostas de blocos construtores chamados aminoácidos.
- As proteínas têm muitas funções, entre elas agir como enzima (acelerar as taxas de reação), transportar moléculas, sinalizar ou formar estruturas.
- As ligações não covalentes baseadas em atrações elétricas fracas podem se formar entre moléculas diferentes ou dentro de uma molécula.
- As moléculas ou íons que são solúveis em água formam ligações não covalentes fracas baseadas em atrações elétricas fracas.

OBJETIVOS DE APRENDIZADO

Ao final deste capítulo, os estudantes vão saber:

- Descrever as condições favoráveis ao crescimento de bactérias.
- Explicar como a conformação (forma tridimensional) de uma proteína está relacionada à sua função.
- Explicar como ocorre o enovelamento da proteína.
- Explicar como a cromatografia em coluna separa as proteínas.

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar como a conformação de uma proteína está relacionada à sua função. Para isso, analise as respostas à pergunta 1 da seção de *PERGUNTAS do Capítulo 6* (página 87 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de descrever como ocorre o enovelamento da proteína. Para isso, analise as respostas à pergunta 2 da seção de *PERGUNTAS do Capítulo 6* (página 87 do Guia do Estudante).
- Avalie a capacidade de cada estudante de explicar como a cromatografia em coluna separa as proteínas. Para isso, analise as respostas à primeira pergunta da seção *PARE E PENSE* do Laboratório 6, Parte B (página 85 do Guia do Estudante) e às perguntas 3 a 5 da seção de *PERGUNTAS do Capítulo 6* (página 87 do Guia do Estudante).

SEQUÊNCIA SUGERIDA DE ATIVIDADES

SESSÃO 1

- Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS do Capítulo 6** com os estudantes. (5 min)
- Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção *O QUE VOCÊ JÁ SABE?* e compartilhem as respostas. (10 min)
- Peça aos estudantes que leiam o texto **“Como produzir a proteína de interesse”** e respondam às perguntas da seção *REFLITA*. (20 min)
- Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes às perguntas da seção *REFLITA* sobre o texto **Como produzir a proteína de interesse**. (10 min)

SESSÃO 2

- Peça aos estudantes que leiam o parágrafo introdutório do Laboratório 6, compartilhem suas respostas às perguntas da seção *ANTES DO LABORATÓRIO* e realizem a Parte A. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas à pergunta da seção *PARE E PENSE*. (45 min)

SESSÃO 3

- Os estudantes devem realizar as atividades do Laboratório 6, Parte B. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas da seção *PARE E PENSE*. (30 min)
- Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as *PERGUNTAS do Capítulo 6* e anotem as respostas individualmente. Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes. (15 min)

PREPARAÇÃO

Antes de começar, você deve se familiarizar com os procedimentos utilizados neste capítulo, com a preparação necessária e com os materiais que você vai usar. As instruções presumem que você vai precisar de materiais para 12 grupos de 2 ou 3 estudantes. Multiplique as quantidades de acordo com o número de estudantes e de turmas.

REVISE AS PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E OS PROCEDIMENTOS DE DESCARTE DE RESÍDUOS PARA O LABORATÓRIO 6

Revise com os estudantes as precauções de segurança e procedimentos de descarte de resíduos nas páginas 23 e 24 deste guia.

COLUNAS DE CROMATOGRAFIA

Um ou dois dias antes do laboratório, verifique se as colunas estão em pé e se a válvula está na posição correta (horizontal = fechada). Se a resina parecer estar nas laterais de alguma das colunas ou estiver seca, adicione vários milímetros de etanol a 20% à coluna. Deixe o etanol escorrer até aproximadamente 2 mm acima da camada de resina.

ATENÇÃO: depois do laboratório de cromatografia, adicione etanol a 20% à camada de resina com a válvula fechada. As colunas devem estar em pé e com a válvula fechada.

PREPARAÇÃO DA ALÍQUOTA DOS REAGENTES PARA O LABORATÓRIO 6, PARTE A

Um ou dois dias antes do laboratório, monte os suportes com os reagentes necessários:

1. Coloque identificações nos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL da seguinte maneira:
 - 12 tubos com a identificação "TE"
 - 12 tubos com a identificação "TLis"
2. Pipete os reagentes nos tubos identificados, da seguinte maneira:
 - 200 µL de tampão de eluição nos tubos "TE"
 - 160 µL do tampão de lise nos tubos "TLis"
3. Tampe os tubos. Armazene o tampão de lise no freezer.

ATENÇÃO: os outros reagentes podem ser armazenados em temperatura ambiente.

CULTIVO DE BACTÉRIAS PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Exatamente um dia antes de começar o Laboratório 6, prepare uma cultura em suspensão de bactérias que tenham sido transformadas com o plasmídeo pARA-R (fornecidas no kit).

1. Reúna os seguintes materiais:
 - Alça de inoculação
 - Células transformadas (EC, fornecidas no kit)
 - Frasco estéril com caldo CL/amp
 - Tampa ventilada para o frasco
 - Frasco de agitação
 - Tubo estéril com arabinose (500 mg/mL)
2. Prepare a cultura em suspensão:
 - Usando a alça de inoculação¹⁸, transfira assepticamente 500 µL de células transformadas para o frasco estéril com o caldo CL/amp.
 - Coloque a tampa ventilada no frasco e segure com firmeza.
 - Agite e incube o frasco (a 37 °C) por 4 a 5 horas. O caldo CL/amp deve ficar turvo, indicando que as células estão crescendo.
 - Adicione uma quantidade suficiente de arabinose estéril ao frasco de modo que a concentração final de arabinose seja 5 mg/mL de caldo CL/amp.
 - Continue a agitação do frasco de um dia para outro.
 - Verifique se a cultura está na cor vermelho brilhante na manhã seguinte. Se a cultura não estiver na cor vermelho brilhante, o procedimento não funcionou.

REÚNA OS MATERIAIS PARA O LABORATÓRIO 6, PARTE A

ATENÇÃO: reúna os materiais no dia do laboratório.

1. Identifique 12 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL como “EC”.
2. Pipete 1.000 µL (1 mL) da cultura em suspensão de *E. coli* da placa CL/amp/ara nos tubos “EC”.

ATENÇÃO: cada grupo vai precisar de 1.000 µL (1 mL) adicionais da cultura em suspensão de *E. coli* da placa CL/amp/ara durante o laboratório; um estudante de cada grupo vai levar até você o tubo EC para que você adicione essa solução.

3. Prepare 12 conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:
 - Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga com os seguintes reagentes (preparados acima):
 - Tubo de microcentrífuga com a cultura de *E. coli* da placa CL/amp/ara (EC)
 - Tubo de microcentrífuga com tampão de eluição (TE)
 - Tubo de microcentrífuga com tampão de lise (TLis)
 - Coletor de resíduos líquidos, como um béquer pequeno
 - Micropipeta P-200

¹⁸ N. do E.: diferentemente da alça de Drigalski, as alças de inoculação têm um formato circular em sua extremidade, que permite a captura de pequenas gotas de solução líquida. Essa extremidade circular pode vir em diferentes tamanhos, definidos pelo volume que são capazes de conter.

- Caixa de ponteiras descartáveis
- Marcador permanente
- Coletor para descarte de ponteiras e tubos de microcentrifuga usados (um coletor para cada 2 grupos)
- Saco de lixo de resíduos biológicos para os materiais que entraram em contato com as células de *E. coli*

4. Coloque a microcentrifuga no centro da sala para que todos os grupos possam compartilhá-la.

INCUBAÇÃO DAS CÉLULAS COM O TAMPÃO DE LISE DE UM DIA PARA OUTRO

Ao final do Laboratório 6, Parte A, peça aos grupos que entreguem a você seus tubos EC identificados com o número do grupo e o período de aula. Incube as células em temperatura ambiente de um dia para outro. Se os estudantes forem realizar a Parte B no dia seguinte à Parte A, mantenha os tubos em temperatura ambiente. Do contrário, coloque os tubos no freezer até o dia do próximo laboratório. No início do dia da Parte B, leve os lisados celulares congelados ao refrigerador para descongelarem, exceto os lisados da primeira aula do dia, que devem ser descongelados em temperatura ambiente.

REÚNA OS MATERIAIS PARA O LABORATÓRIO 6, PARTE B

ATENÇÃO: Reúna os materiais no dia do laboratório.

1. Prepare 12 conjuntos de materiais de modo que cada um tenha:
 - Suporte de plástico com o tubo de células lisadas da Parte A (EC)
 - Os seguintes reagentes:
 - Tampão de ligação (TLig), 4,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - Tampão de lavagem (TLav), 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - Tampão de eluição (TE), 10 mM Tris e 1 mM EDTA¹⁹
 - Tampão de equilíbrio da coluna (TEqC), 4,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ATENÇÃO: cada tampão poderá ser fornecido de duas maneiras: em 12 tubos de 15 mL ou em um recipiente maior. Se você tiver tubos de 15 mL, distribua um para cada grupo. Se você tiver um recipiente maior, despeje 10 mL de cada tampão em um conjunto de frascos para que sejam compartilhados por dois grupos.

- 2 tubos de microcentrifuga de 1,5 mL
- Coluna de cromatografia
- Coletor de resíduos líquidos, como um béquer pequeno
- Micropipeta P-1.000
- Caixa de ponteiras descartáveis
- Coletor para descarte de ponteiras e tubos de microcentrifuga usados (um coletor para cada dois grupos)

2. Coloque a microcentrifuga no centro da sala para que todos os grupos possam compartilhá-la.

¹⁹ O EDTA é um agente quelante que sequestra os íons metálicos.

METODOLOGIA DE ENSINO

SESSÃO 1

IDEIAS PRINCIPAIS: as bactérias transformadas podem ser cultivadas e colhidas para fornecer a proteína fabricada pelo gene clonado. A separação das proteínas requer conhecimento da estrutura proteica. As proteínas realizam a maioria das funções celulares, como catálise, transporte, sinalização e formação de estruturas. Para realizar essas funções, as proteínas se dobram e assumem conformações específicas, o que expõe os sítios de ligação que se conectam a moléculas específicas. É difícil separar as proteínas em seu estado de enovelamento, por isso a separação só é possível com o desenovelamento das proteínas em soluções salinas chamadas tampões. Após o desenovelamento, o método de separação por cromatografia em coluna é viável porque proteínas diferentes têm quantidades diferentes de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Uma solução de tampão com as proteínas desenoveladas é despejada na coluna de cromatografia que tem esferas revestidas de resina, que se ligam às proteínas mais hidrofóbicas enquanto as proteínas mais hidrofílicas passam pela coluna. Outras soluções de tampão vão liberar as proteínas ligadas à coluna, fazendo com que se enovelem de novo.



Leia a **INTRODUÇÃO** e os **OBJETIVOS do Capítulo 6** com os estudantes. (5 min)

A **INTRODUÇÃO** explica o objetivo principal do capítulo, e o relaciona à Introdução do Programa. Os **OBJETIVOS do Capítulo 6** informam o foco de aprendizagem necessário aos estudantes durante as atividades propostas neste capítulo. Explique o que você vai avaliar neste capítulo e quais são suas expectativas em relação ao desempenho dos estudantes.

Peça aos estudantes que respondam às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** e compartilhem suas respostas. (10 min)

A seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?** ativa o conhecimento dos estudantes sobre o crescimento bacteriano e as proteínas, além de revelar lacunas no aprendizado. Divida a turma em duplas e peça a eles que respondam às perguntas, anotem suas respostas e compartilhem suas ideias para que você possa avaliar o que eles sabem ou não sobre crescimento bacteriano e proteínas.

Possíveis respostas às perguntas da seção **O QUE VOCÊ JÁ SABE?**:

1. Como as bactérias se reproduzem?
Normalmente, as bactérias se reproduzem por fissão binária, que é um tipo de reprodução assexuada. A célula cresce e se divide para formar duas células idênticas (às vezes chamadas de células filhas), que são geneticamente iguais à célula mãe.
2. Por que às vezes as proteínas são chamadas de moléculas “burro de carga”?
As proteínas realizam quase todos os processos celulares e formam as estruturas celulares.
3. Como a conformação (forma ou enovelamento) de uma proteína pode ser importante para a sua função?
Concentre-se em uma das seguintes funções da proteína: agir como enzima (acelerar as taxas de reação), transportar moléculas, sinalizar ou formar estruturas.
Se uma proteína é uma enzima (catalisador), sua forma pode manter os reagentes em uma posição que acelera a reação. Se uma proteína transporta outras moléculas ou age como um sinal, sua forma pode

combinar com a de outra molécula para se prender a ela. Se uma proteína forma uma estrutura, sua forma pode combinar-se com outras proteínas que também compõem essa estrutura.

4. O polipeptídeo é uma molécula linear longa quando é formado, mas dobra-se imediatamente, assumindo uma conformação tridimensional específica, que chamamos de proteína. Quais propriedades dos aminoácidos de uma proteína controlam o processo de enovelamento?

A menos que os estudantes já tenham estudado sobre o enovelamento de proteínas, eles não serão capazes de responder a essa pergunta. O enovelamento da proteína é o resultado da formação de ligações não covalentes fracas entre aminoácidos, a tendência que os aminoácidos hidrofóbicos têm de ser guardados no interior da proteína, e da formação de pontes dissulfeto covalentes entre aminoácidos que contêm enxofre.

Peça aos estudantes que leiam o texto “Como produzir a proteína de interesse” e respondam às perguntas da seção REFLITA. (20 min)

Nesse texto os estudantes vão aprender como as células bacterianas crescem em condições favoráveis e como a conformação da proteína está relacionada à sua função. Eles vão ler sobre o enovelamento da proteína e aprender que um fator nesse processo é a tendência que os aminoácidos hidrofóbicos têm de ser guardados no interior da proteína. Também vão aprender que as quantidades relativas de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade das proteínas são usadas para separar as proteínas na cromatografia em coluna. Peça aos estudantes que anotem as respostas às perguntas da seção REFLITA nos cadernos e que se lembrem de consultar o **Glossário** para descobrir o significado dos termos científicos que não conhecem.

Promova uma discussão sobre as respostas às perguntas da seção REFLITA a respeito do texto “Como produzir a proteína de interesse”. (10 min)

Avalie o conhecimento de cada estudante sobre crescimento bacteriano, enovelamento e função da proteína e sobre como a cromatografia em coluna separa as proteínas. Para isso, analise as respostas às perguntas da seção REFLITA.

Possíveis respostas às perguntas da seção REFLITA:

- Por que o frasco de agitação pode ser melhor para promover o crescimento das células bacterianas do que uma placa?

As células têm melhor acesso ao alimento e a oxigênio no frasco de agitação porque elas se movimentam livremente, em vez de ficarem umas sobre as outras como em uma placa.

- Se o gene de interesse é controlado por um operon, como o operon arabinose, qual é o melhor momento para ativar o gene? Lembre-se que:
- A produção de proteína retira energia do processo de crescimento celular e da divisão celular.
- Um número maior de células produzirá mais proteínas.
- As proteínas podem ser degradadas com o tempo.

Um bom momento para ativar um gene de interesse seria entre a metade e o final da fase log. Nesse ponto, existe uma grande quantidade de células saudáveis. No início da curva de crescimento, existem poucas células e menos proteína. No final da curva de crescimento, existem células velhas com proteínas que estão sendo degradadas, o que pode afetar a capacidade da célula de produzir proteínas em grandes quantidades.

- Se a mutação altera um aminoácido, como essa alteração pode afetar o enovelamento da proteína e sua função?

A alteração pode gerar uma proteína com enovelamento incorreto, sem a conformação correta para realizar sua função. Essa mutação pode causar uma doença genética.

- Se você fosse tentar usar a cromatografia em coluna para separar a insulina de uma mistura de proteínas, usaria os mesmos tampões de ligação, lavagem e eluição usados para a RFP ou usaria tampões com diferentes concentrações de sal? Explique sua resposta.

O estudante deve afirmar que faria novos tampões com diferentes concentrações de sal para levar em consideração as quantidades relativas de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos das proteínas. A concentração de sal do tampão de eluição deve fazer com que a proteína de interesse se enovele de novo e seja liberada da coluna.

SESSÃO 2

IDEIAS PRINCIPAIS: para obter uma grande quantidade de RFP, as células bacterianas que foram transformadas pelo plasmídeo pARA-R, conforme identificadas pelo processo de seleção, são cultivadas em condições de crescimento favoráveis e alimentadas com arabinose para ativar o gene *rfp*. Em seguida, as células bacterianas são lisadas para liberar o conteúdo celular.



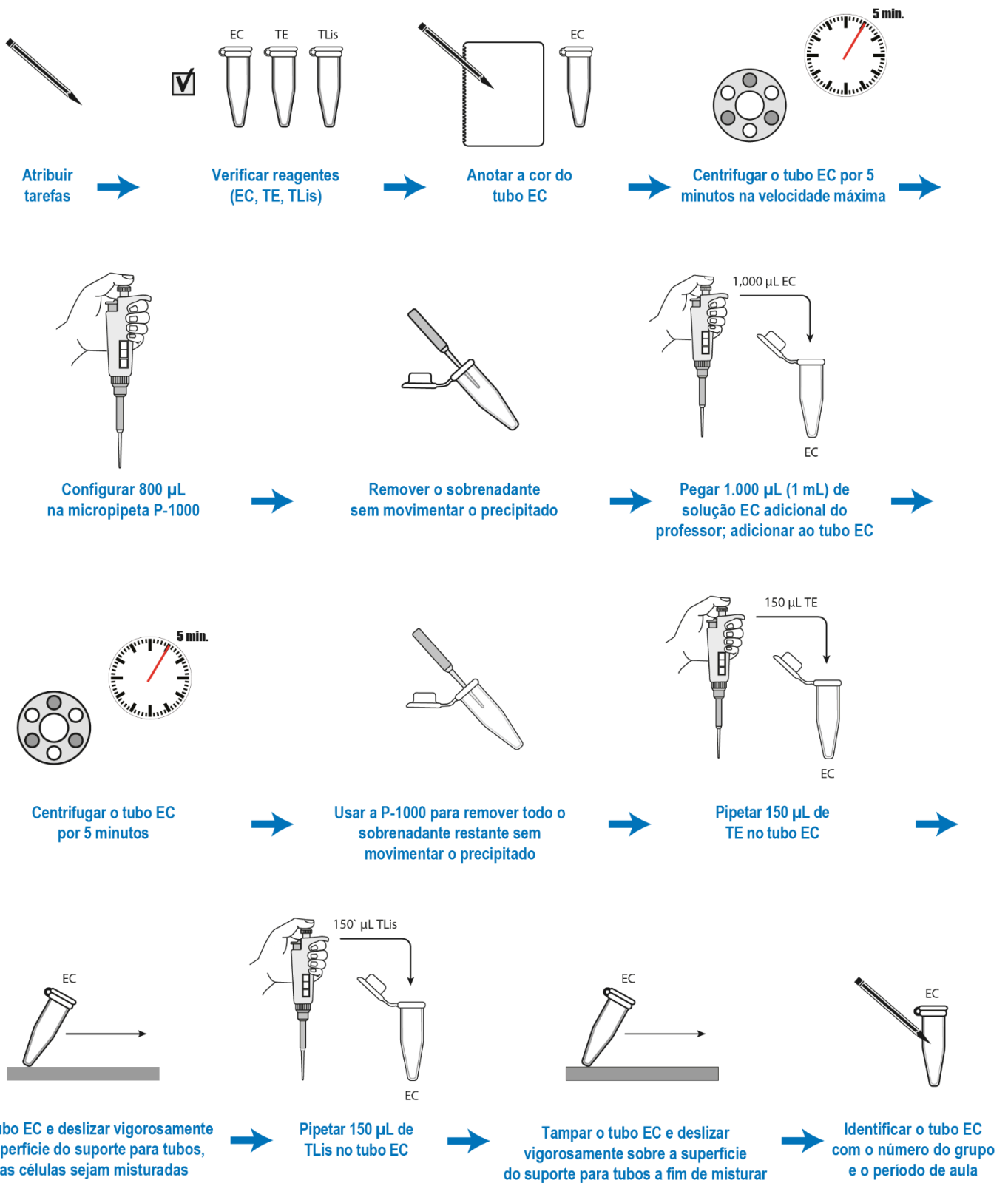
Peça aos estudantes que leiam o parágrafo introdutório do Laboratório 6, compartilhem as respostas às perguntas da seção ANTES DO LABORATÓRIO e realizem a Parte A. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas à pergunta da seção PARE E PENSE. (45 min)

Esse laboratório é realizado em dois dias. Na Parte A, os estudantes lisam as bactérias que foram cultivadas e alimentadas com arabinose para ativar o gene *rfp*. Os estudantes vão discutir em grupos as perguntas da seção ANTES DO LABORATÓRIO e anotar as respostas individualmente. Depois eles devem compartilhar as respostas com a turma.

Possíveis respostas às perguntas da seção ANTES DO LABORATÓRIO:

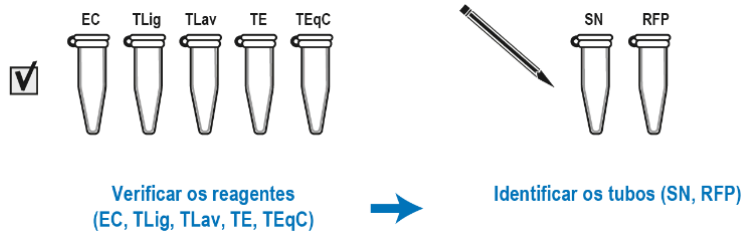
1. Na cromatografia em coluna, como as soluções com diferentes concentrações de sal, que desenovelam as proteínas em graus diferentes, podem ser usadas para ajudar a purificar a RFP?
As proteínas são desenoveladas no tampão de ligação, que tem uma concentração de sal elevada. Quando adicionadas à coluna, as proteínas hidrofóbicas no tampão de ligação aderem às esferas na coluna, ao passo que as proteínas hidrofílicas passam pela coluna. As proteínas hidrofóbicas que aderem à coluna podem ser liberadas adicionando tampões com concentrações de sal mais baixas. Esses tampões permitem que as proteínas se enovelem de novo, e essa ação as libera da coluna. Vários tampões diferentes podem ser adicionados para liberar proteínas com diferentes quantidades relativas de aminoácidos hidrofóbicos.
2. Leia a seção Métodos, Parte A (páginas 83 e 84 do Guia do Estudante) e Parte B (páginas 85 e 86 do Guia do Estudante) e faça uma breve descrição das etapas usando palavras e um fluxograma. As respostas vão variar. Os fluxogramas dos estudantes podem ser parecidos com os apresentados a seguir:

Laboratório 6 Fluxograma da Parte A

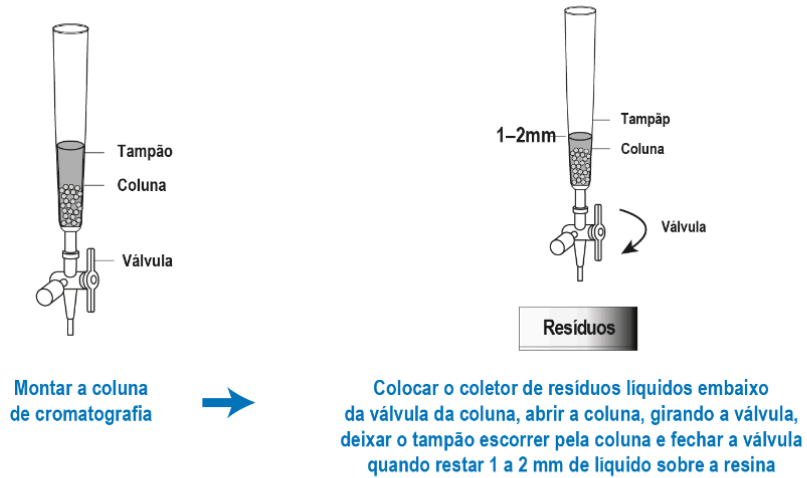


Laboratório 6 Fluxograma da Parte B

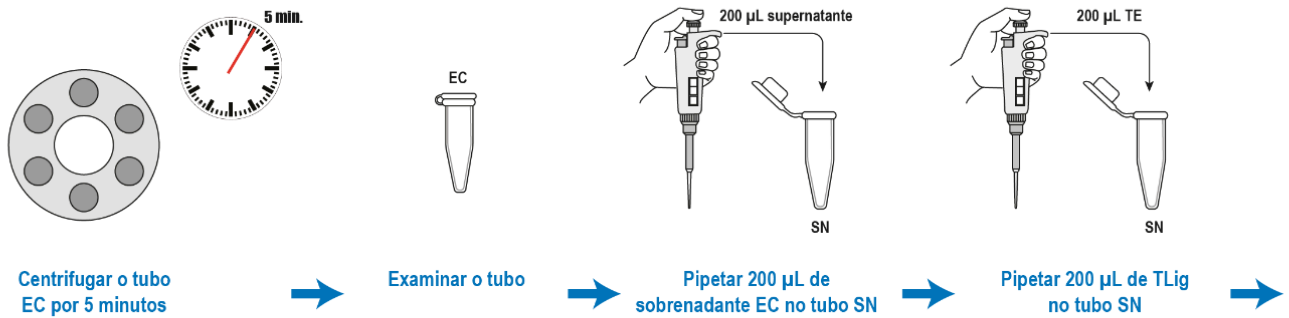
Um membro do grupo:



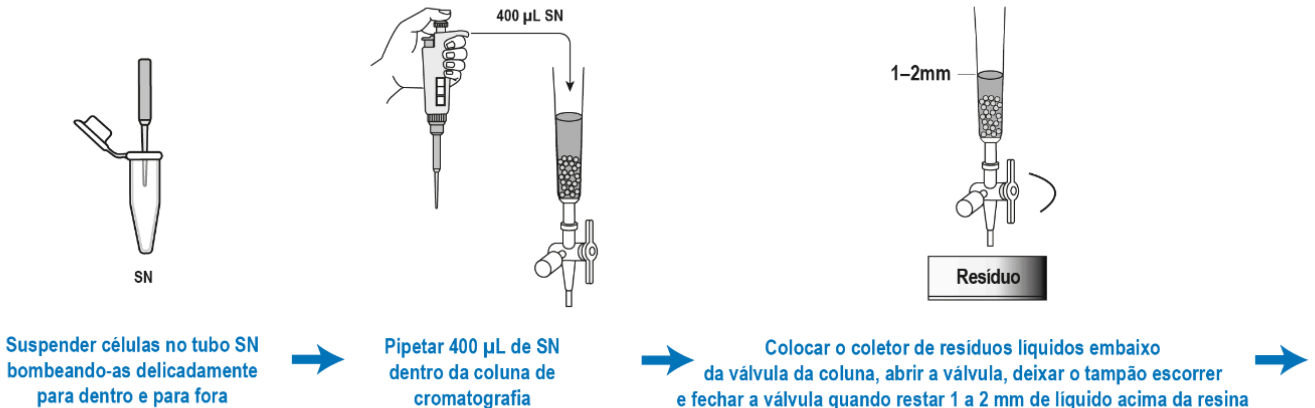
Um membro do grupo:



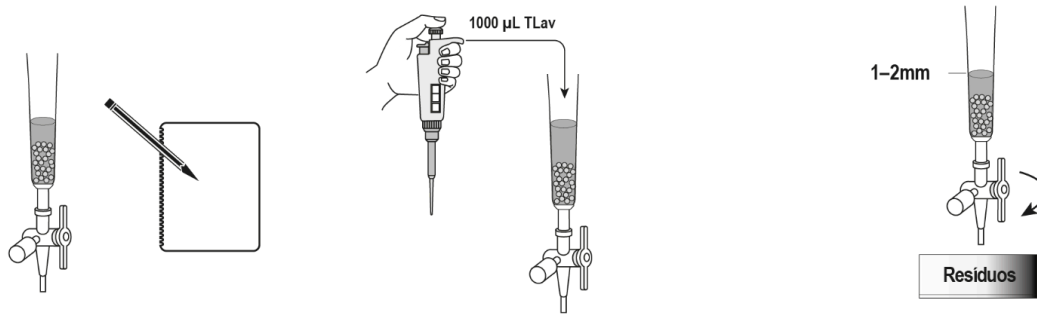
Um membro do grupo:



Todos do grupo:



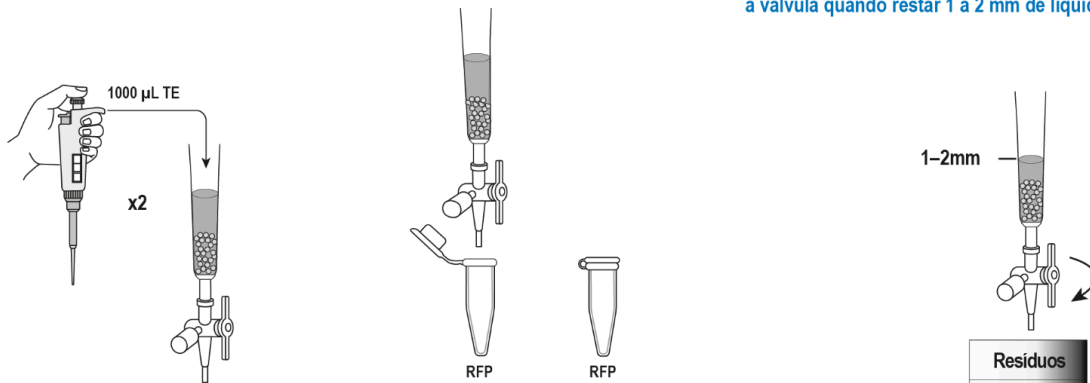
Laboratório 6 Fluxograma da Parte B (Continuação)



Localizar a RFP e anotar as observações no caderno

Pipetar 1.000 µL de TLav dentro da coluna de cromatografia

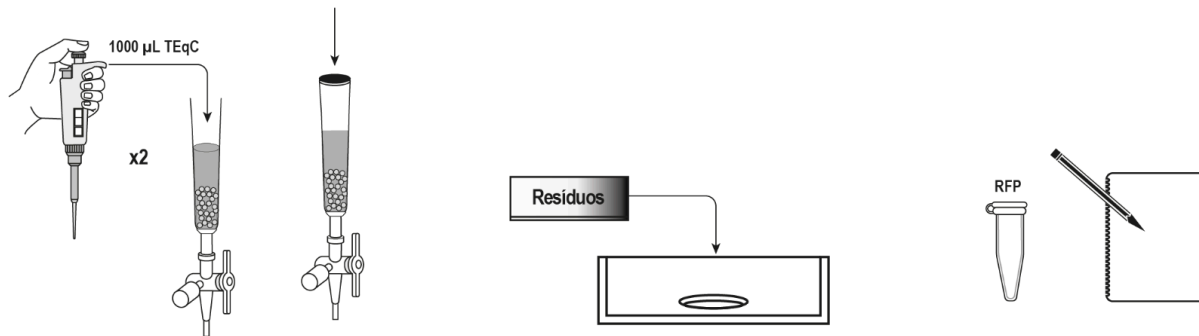
Colocar o coletor de resíduos líquidos embaixo da válvula da coluna, abrir a válvula, deixar o tampão escorrer e fechar a válvula quando restar 1 a 2 mm de líquido acima da resina



Pipetar mais duas vezes 1.000 µL de TE dentro da coluna de cromatografia

Colocar o tubo RFP embaixo da válvula, abrir a válvula, deixar apenas a parte vermelha da eluição escorrer, fechar a válvula e tampar bem o tubo

Colocar o coletor de resíduos líquidos embaixo da válvula da coluna, abrir a válvula, deixar o tampão escorrer e fechar a válvula quando restar 1 a 2 mm de líquido acima da resina



Pipetar duas vezes 1.000 µL de TEqC dentro da coluna de cromatografia e tampar a coluna bem para a próxima aula

Despejar o conteúdo do coletor de resíduos líquidos no ralo da pia

Comparar a intensidade das cores do tubo RFP com a das cores dos tubos dos outros grupos e anotar as observações no caderno

Enquanto as células cultivadas ficam na microcentrífuga por 5 minutos na Parte A, etapa 3, peça aos estudantes que discutam as perguntas da seção *PARE E PENSE* e anatem as respostas individualmente. Os estudantes devem compartilhar as respostas com a turma.

Possíveis respostas às perguntas da seção *PARE E PENSE*:

- Como é possível determinar onde a RFP está em cada etapa de separação?
A RFP tem uma fluorescência vermelha, podendo ser facilmente identificada.
- Qual é a cor do sobrenadante? E do precipitado? Quais são os componentes de cada um?
O precipitado é rosa claro ou vermelho, e o sobrenadante é transparente. O precipitado contém células inteiras de E. coli com RFP, enquanto o sobrenadante contém o meio de crescimento (caldo Luria).

RECURSOS: mostre um vídeo sobre o enovelamento da proteína para ajudar os estudantes a visualizarem o processo (disponível no site do programa)²⁰.



CONHECIMENTO CIENTÍFICO: INSULINA RECOMBINANTE

Muitas proteínas são compostas de cadeias de peptídeos separadas que estão conectadas por pontes dissulfeto. A insulina é uma dessas proteínas. Ela é composta de duas cadeias de peptídeos: a cadeia A (que tem 21 aminoácidos) e a cadeia B (que tem 30 aminoácidos). Na produção de insulina humana recombinante, as duas cadeias são produzidas separadamente e purificadas; depois, são misturadas e ligadas em uma reação que forma as pontes dissulfeto, produzindo a insulina humana recombinante.

SESSÃO 3

IDEIAS PRINCIPAIS: assim que as células bacterianas que produziram a RFP são lisadas, a proteína é separada das demais proteínas da célula pelo método da cromatografia em coluna, que se vale das diferenças de hidrofobicidade das proteínas. Para separar a RFP, que é uma proteína muito hidrofóbica, a coluna de cromatografia é preenchida com esferas revestidas de resina que se unem às proteínas hidrofóbicas que foram desnoveladas em uma solução de tampão de ligação. O tampão de lavagem libera as proteínas hidrofóbicas moderadamente da resina e o tampão de eluição libera a RFP da resina. Tanto o tampão de lavagem quanto o tampão de eluição têm uma concentração de sal menor que o tampão de ligação e, portanto, fazem com que as proteínas ligadas se enovelam de novo.



Os estudantes devem realizar as atividades do Laboratório 6, Parte B. Durante o laboratório, peça a eles que compartilhem com a turma as respostas às perguntas da seção *PARE E PENSE*. (30 min)

Na Parte B deste laboratório de dois dias, os estudantes vão usar a cromatografia em coluna para separar a RFP do resto das proteínas celulares.

²⁰ N. do E.: essa indicação se refere ao vídeo [Protein Folding](#), que até o momento não recebeu legendas em português. Para facilitar a compreensão de estudantes que não têm domínio da língua inglesa, sugerimos a utilização da animação também chamada [Protein Folding](#), que, apesar de ter os controles também em inglês, permite uma livre exploração dos estudantes para que eles infiram como o caráter hidrofílico/hidrofóbico dos aminoácidos influencia do processo de enovelamento da proteína.

Enquanto as células lisadas ficam na microcentrifuga por 5 minutos na etapa 6, peça aos estudantes que discutam as perguntas da seção *PARE E PENSE* e anotem as respostas individualmente. Os estudantes devem compartilhar as respostas com a turma.

Possíveis respostas às perguntas da seção *PARE E PENSE*:

- Você usará três tampões neste laboratório: tampão de ligação (TLig), tampão de lavagem (TLav) e tampão de eluição (TE). Qual é a função de cada um?
O TLig causa o desenovelamento das proteínas, fazendo com que as proteínas hidrofóbicas se unam às esferas revestidas de resina na coluna. O TLav causa o enovelamento moderado das proteínas hidrofóbicas, liberando-as da resina. O TE causa o enovelamento da RFP, liberando-a da resina.
- Qual é a cor do sobrenadante? E do precipitado? Quais são os componentes de cada um?
O precipitado é branco, enquanto o sobrenadante é rosa. O precipitado contém restos celulares, enquanto o sobrenadante contém os tampões de eluição e de lise (TE e TLis), além da proteína fluorescente vermelha e outras proteínas citoplasmáticas.

Separe os estudantes em grupos pequenos e peça a eles que discutam as *PERGUNTAS do Capítulo 6* e anotem as respostas individualmente. Promova uma discussão sobre as respostas dos estudantes. (15 min)

Peça aos estudantes que reflitam sobre seu conhecimento a respeito de conformação das proteínas, enovelamento das proteínas e separação de proteínas por cromatografia em coluna, respondendo às *PERGUNTAS do Capítulo 6*.

Possíveis respostas às *PERGUNTAS do Capítulo 6*:

1. Por que a conformação de uma proteína é importante para que ela realize sua função?
Uma conformação específica resulta em sítios de ligação do lado de fora da proteína. Os sítios de ligação permitem que a proteína se una a outras moléculas, que é a forma como a proteína realiza suas funções. As proteínas podem realizar uma de quatro funções: catalisar reações, transportar moléculas, fornecer um sinal ou formar estruturas.
2. Quais propriedades dos aminoácidos de uma proteína estão relacionadas ao enovelamento?
A sequência dos aminoácidos determina o enovelamento. O enovelamento da proteína é o resultado da formação de ligações de hidrogênio fracas entre aminoácidos, a tendência que os aminoácidos hidrofóbicos têm de ser guardados no interior da proteína, e a formação de pontes dissulfeto covalentes entre aminoácidos que contêm enxofre.
3. O eluato que contém RFP é menos ou mais brilhante do que no lisado celular após a centrifugação? Se há uma diferença notável na intensidade da cor vermelha, qual seria a possível causa?
O eluato é mais brilhante que o lisado celular. O eluato contém principalmente RFP separada, enquanto o lisado celular contém todas as proteínas celulares.
4. Que característica da RFP é usada como base da separação por cromatografia em coluna?
A RFP tem mais aminoácidos hidrofóbicos que aminoácidos hidrofílicos e, quando desenovelada, adere à resina das esferas da coluna.

5. Como o procedimento de cromatografia em coluna pode ser ajustado ou modificado para aumentar a pureza da amostra de RFP?

Usando mais tampões de lavagem que tenham maior gradação na concentração de sal durante o processo de eluição ou coletando o eluato vermelho em pequenos lotes, deixando apenas os lotes do meio.

ESTRATÉGIA: durante a discussão, empregue as seguintes práticas:



- Dê aos estudantes tempo para refletir sobre as respostas dos colegas.
- Peça esclarecimentos.
- Peça explicações.
- Reformule frases.
- Peça exemplos.
- Peça evidências.
- Forneça exemplos e contraexemplos.
- Peça aos estudantes que complementem uma explicação.
- Peça aos estudantes que avaliem uma resposta.