

Aula Prática 02: ELETROFORESE DE DNA GENÔMICO

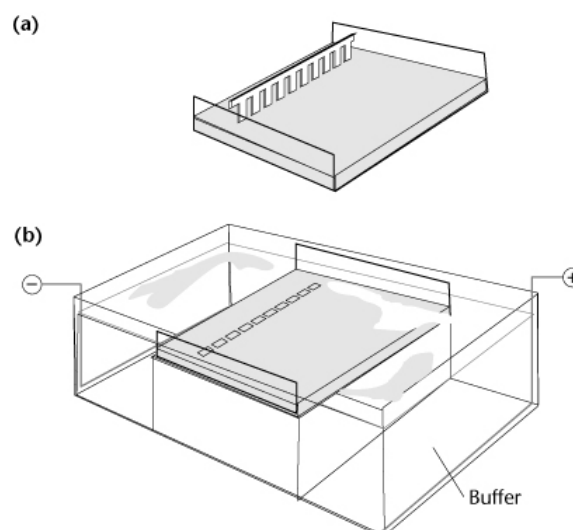
Para eletroforese de DNA, há dois tipos principais de técnicas:

- 1) Eletroforese em gel de agarose: a agarose é um polissacarídeo extraído de uma alga marinha que, quando solidificada, forma uma rede porosa. Esta rede tem o tamanho de seus poros dependente da concentração de agarose utilizada para fazer o gel. Dessa forma, maiores concentrações produzem poros menores, dificultando a migração de grandes moléculas de DNA. Geralmente, o gel de agarose é utilizado para separação de fragmentos de DNA de tamanhos superiores a 50 pb e tem menor capacidade de resolução que o de acrilamida. Porém, ele apresenta maior extensão de separação, sendo que longos fragmentos de DNA (até 20.000 pb) podem ser separados em gel de agarose dependendo das concentrações usadas. A agarose não é tóxica.
- 2) Eletroforese em gel de poliacrilamida: a poliacrilamida é uma mistura de acrilamida (polímero linear) e bisacrilamida (polímero em forma de "T"). Geralmente, a poliacrilamida é utilizada para separar fragmentos de DNA com tamanho inferior a 500 pb. A acrilamida é neurotóxica.

A. Procedimento

Utilizaremos a eletroforese em gel de agarose 0,8% para analisar a presença e a integridade do DNA genômico extraído da bactéria *Streptomyces clavuligerus*.

- 1) Prepare um gel de agarose 0,8%: Pese 0,4 g de agarose, coloque em um erlenmeyer e adicione 50 mL de tampão de corrida TAE 1X (Tris-acetato-EDTA). Aqueça a mistura na chapa aquecedora, em agitação, até a completa solubilização da agarose (a solução torna-se límpida).
- 2) Espere esfriar até uma temperatura onde seja possível encostar-se ao erlenmeyer e adicione 5 μ L de solução do corante *Sybr Safe* (10.000X concentrado, Invitrogen).
- 3) Verta o gel sobre o berço, coloque o pente para formar os poços e espere solidificar (cerca de 15 min). Vide figura (a) a seguir.
- 4) Cuidadosamente, retire o pente do gel e coloque-o na cuba de corrida preenchida com tampão de corrida TAE 1X. Vide figura (b) a seguir.



- 5) Misture 2 μL de DNA genômico e 1 μL de tampão de amostra (solução contendo: 20% (m/v) de Ficoll 400; 0,1 M de EDTA pH 8,0; 0,1% (m/v) de SDS e 0,25% (m/v) de azul de bromofenol).
- 6) Aplique a mistura em um poço do gel de agarose 0,8%. Em outro poço, aplique a mistura de 1 μL do tampão de amostra com 1 μL do marcador de tamanho pares de bases (Gene Ruler 1 kb plus ladder, Fermentas).
- 7) Ligue a cuba de eletroforese a 110 V por aproximadamente 30 min.
- 8) Utilize o transiluminador no comprimento de onda de 470 nm para analisar o resultado.

B. Questões

- 1) Por que as moléculas de DNA, ao serem submetidas a um campo elétrico, migram em direção ao eletrodo positivo?
- 2) A velocidade de migração é dependente de qual característica da amostra de fragmentos de DNA?
- 3) Quais são as funções do tampão de amostra e do tampão de corrida?
- 4) Por que há Ficoll ou glicerol no tampão de amostra?
- 5) Por que é necessário colocar um marcador do tamanho de pares de bases?
- 6) A visualização do DNA na eletroforese poderia ser feita por coloração do gel com brometo de etídeo e visualização em 260 nm. Por que é usado *Sybr Safe* e luz a 470 nm ao invés de brometo de etídeo?