

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

*ÍNDICE

1. OBJETIVO
2. ABRANGÊNCIA
3. RESPONSABILIDADES
4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES
5. DEFINIÇÕES
6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS
7. FLUXOGRAMAS
8. ANEXOS
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

<i>Edição</i>	<i>Alteração</i>
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 055; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

Elaborado por: Joyce T. Kawakami Suely Aparecida Pinheiro Palomino Biologistas	27/07/2015	Aprovado por: Prof.Dra Maria Lourdes Higuchi Pesquisadora	15/03/21
---	------------	--	----------

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para a Técnica de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) através da Eletroforese

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem, a Técnica de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) através da Eletroforese.

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável.

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas fundamentais nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. O princípio é baseado no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e conseqüentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo (ânodo). A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso em um dado momento da eletroforese moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz. Utiliza-se normalmente o gel de agarose para a separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1 kb = 1000 pares de bases). O gel de agarose é feito apenas através da mistura de um tampão e agarose, a eletroforese em gel de agarose pode ser usada como método analítico ou preparativo, isto é, quando o fragmento de DNA é recuperado e purificado a partir do gel. Frequentemente se utiliza a coloração com brometo de etídio (EtBr), uma substância mutagênica. Em adição, para a visualização do DNA corado com EtBr, é necessária a utilização de transiluminador de luz ultravioleta. Para a utilização de tal aparelho e para a o uso do brometo de etídio, é necessário o cuidado com a biossegurança não somente do manipulador, mas de todos os que compartilham o uso do laboratório.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

6.1 Preparação do gel:

A agarose, um polissacarídeo extraído de uma alga marinha vermelha e formado por resíduos de D e L galactose unidos por ligações glicosídicas α (1→3) e β (1→4), é um material gelatinoso e semelhante a gelatina incolor. Por isso, para se preparar um gel de agarose procede-se de modo similar a preparação de uma gelatina. Dissolve-se uma quantidade em gramas do pó de agarose, ajustando-se a concentração apropriada para separar os fragmentos de DNA presentes na amostra (Tabela 1), em um dado volume de tampão de eletroforese. Os dois tipos de tampão mais utilizados são TAE (Tris-acetato-EDTA). Aquece-se a mistura em forno microondas, até que a solução fique homogênea e transparente. Aguarda-se a diminuição da temperatura até aproximadamente 50°C e verte-se em uma forma (um tipo de molde específico para o preparo do gel).

6.1.2 Concentrações de agarose indicadas para a resolução dos fragmentos de DNA. Tabela 1

Concentração de agarose (% [w/v])	Faixa de tamanho dos fragmentos de DNA eficientemente separados (kb)
1,0	0,5 – 10,0
1,2	0,4 – 6,0
1,5	0,2 – 3,0
2,0	0,1 – 2,0

6.2 Sobre a solução ainda morna coloca-se um pente (uma tira de teflon denteada que ficará a 1 mm acima do fundo da forma) que servirá como molde para produzir diversas cavidades (poços) no gel. Essas minúsculas cavidades não chegam a atravessar o gel e servirão como reservatórios onde as amostras de DNA serão aplicadas. Ao esfriar e gelificar, a agarose fica com o aspecto turvo e com resistência diretamente proporcional à concentração de agarose utilizada. A seguir, a forma contendo o gel é colocada no interior da cuba de eletroforese horizontal. Na cuba o gel encontra-se entre fios de platina que atuam como cátodo e ânodo provocando a passagem de corrente elétrica gerada por uma fonte de eletricidade. Adiciona-se o mesmo tampão usado para fundir a agarose em quantidade suficiente para que o gel fique totalmente imerso tomando-se o cuidado para

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

que o nível de tampão fique pelo menos 1 mm acima do gel. A seguir retira-se cuidadosamente o pente.

6.3 **Aplicação das amostras:**

Antes da aplicação, as amostras de DNA deverão ser misturadas a um tampão de amostra. O tampão de amostra contém corantes e reagentes de alta densidade, assegurando que a amostra de DNA entre no poço pela força da gravidade. Já os corantes, azul de bromofenol e o xileno cianol, facilitam a aplicação da amostra no gel (acrescentam cor na amostra) e auxiliam no monitoramento da corrida, já que apresentam velocidade conhecida durante a migração na matriz em direção ao pólo positivo. Por exemplo, o Fonte Pente Poço Gel Tampão azul de bromofenol migra juntamente com um fragmento de DNA de aproximadamente com 0,3kb e o xileno cianol com um fragmento de 4 kb em géis de agarose de 0,5 a 1,4% em TAE.

Para permitir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA de uma dada amostra é necessário aplicar em um dos poços o marcador de massa molecular (ladder). O ladder é uma mistura de diversos fragmentos de DNA de tamanhos e concentrações conhecidos, gerados a partir da digestão de plasmídeos (tipo de DNA circular presente em bactérias) com enzimas de restrição. Ele permite inferir, por comparação, o tamanho dos fragmentos presentes na amostra analisada.

6.4 **Corrida de eletroforese:**

Após a aplicação das amostras, encaixa-se a tampa da cuba contendo os cabos que permitirão a conexão entre a cuba e a fonte de corrente contínua. Para se determinar a voltagem que será utilizada deve-se computar a distância entre os eletrodos e não o comprimento do gel. Geralmente usa-se uma voltagem de 1 a 5 V/cm. Voltagens excessivas ou muito baixas interferem na mobilidade do DNA e causam distorções na migração. Para cubas rotineiramente utilizadas pela maioria dos laboratórios de pesquisa, a voltagem varia entre 80 e 110 V. Durante a corrida o DNA sairá do poço, penetrará no gel, migrando em direção ao pólo positivo. Com isso os fragmentos serão separados de acordo com o tamanho. Os fragmentos menores migram mais rapidamente que os fragmentos maiores, pois eles apresentam maior facilidade de atravessar os poros da matriz de agarose em direção ao pólo positivo. Enquanto que fragmentos de mesmo tamanho migram praticamente juntos. No caso da utilização do azul de

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

bromofenol, quando este atingir $\frac{3}{4}$ do gel a corrente pode ser desligada. Entretanto, há variações de acordo com o tamanho do fragmento de DNA de interesse. Se o fragmento for muito grande, aguarda-se a separação dos fragmentos maiores na parte superior do gel e não há tanta preocupação com a parte inferior. Neste caso, o corante pode até sair do gel.

6.5 **Análise e registro dos resultados:**

O método mais usual para se visualizar o DNA em géis de agarose é por coloração com brometo de etídeo (EtBr) de fórmula $C_{21}H_2OBrN_3$. Esse corante se intercala entre as bases dos ácidos nucléicos e, na presença de luz Ultra Violeta (entre 260 e 360nm), fluoresce em vermelho alaranjado (590nm). Com este método pode-se detectar uma quantidade igual ou maior que 10 ng de DNA e a intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de DNA presente na amostra.

O brometo de etídeo pode ser utilizado de 3 diferentes formas: aplicado diretamente no gel (uso mais frequente), no tampão da amostra a ser aplicada, ou após a corrida quando o gel é submergido em solução de EtBr. No entanto, não é recomendada a incorporação do brometo de etídeo no gel porque esse corante interfere no padrão de migração das diversas conformações que a molécula de DNA pode assumir. Segundo, e não menos importante, devido à contaminação da vidraria, da cuba e demais utensílios usados na preparação do gel.

6.6 **Fatores que influenciam a migração do DNA:**

A mobilidade eletroforética do DNA através do gel de agarose é influenciada por vários fatores que serão discutidos a seguir.

6.6.1 **Tamanho e conformação do DNA:**

O tamanho dos fragmentos de DNA é o principal fator que influencia a migração em gel de agarose. Pode-se dizer que este seria o fator crítico e alvo da análise. Uma molécula de DNA migra na matriz de agarose com mobilidade inversamente proporcional ao log10 de sua massa molecular, que, por sua vez, é função do tamanho e da forma da molécula. Assim, o tamanho do fragmento do DNA em pares de base, ou seja, sua sequência linear, é o fator que, em princípio, deveria influenciar a migração no gel. Entretanto, nem sempre o DNA encontra-se linear e descondensado e tais fatores podem alterar a

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 6/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

migração do fragmento no gel, pois interferem na passagem da molécula de DNA pelos poros. As moléculas de DNA circular podem assumir formas como: relaxada (com corte, isto é, nick) ou superenovelada (supercoiled). Estas formas não migram de acordo com o tamanho do DNA durante a eletroforese, podendo atravessar a malha do gel em velocidades superiores ou inferiores ao padrão. No entanto, quando estas moléculas circulares são linearizadas, ou seja são clivadas em um ponto e assumem uma forma linear, então a corrida na eletroforese obedece ao tamanho da molécula. Sob algumas condições, a forma circular superenovada migra mais rapidamente que a forma linear; e sob outras condições acontece o inverso. Outro exemplo é o DNA genômico, pois sua estrutura condensada e complexa não permite que os fragmentos migrem de acordo com o tamanho em pares de base e sim, fiquem presos nos poros do gel devido à sua estrutura densa e irregular que não permite que os fragmentos travassem. Assim, a mobilidade das formas do DNA no gel não depende somente do tamanho da molécula, mas da densidade, torção do DNA e de outros fatores que serão discutidos a seguir.

6.6.2 **Concentração de agarose:**

A concentração da agarose desempenha papel importante na separação eletroforética, pois determina a porosidade do gel, que por sua vez, influencia diretamente na capacidade de migração das moléculas de DNA. Portanto, o tamanho dos poros desta matriz é inversamente proporcional à concentração de agarose utilizada e diretamente proporcional ao tamanho dos fragmentos de DNA que se deseja separar. Vale ressaltar que a agarose, apesar de apresentar um custo elevado, pode ser reciclada e reutilizada em eletroforese analítica. Para isso é necessário descontaminá-la dos resíduos de brometo de etídio, equilibrá-la em água, desidratá-la e transformá-la novamente em pó (Reiniger et al, 2004).

6.6.3 **Presença do brometo de etídeo no gel:**

A mobilidade dos fragmentos de DNA é influenciada pela presença do brometo de etídeo. O fato desse agente se intercalar entre os pares de bases provoca mudanças na conformação e na flexibilidade da molécula de DNA. Na ausência de brometo as moléculas circulares superenovadas (forma I) migram mais rápido do que as moléculas lineares (forma III) de mesma massa molecular. Já as moléculas circulares relaxadas (forma II) migram mais lentamente do que as outras duas isoformas topológicas. Na

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 7/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

presença de EtBr os superenovelamentos negativos (geralmente encontrados no DNA de procarioto) são gradualmente removidos, causando a diminuição na mobilidade do DNA. Porém, altas concentrações de brometo acarretam na formação de superenovelamento positivo e conseqüente aumento da mobilidade das moléculas. Além disso, a corrida da forma linear é reduzida em cerca de 15% quando comparada a migração da mesma molécula na ausência do agente intercalante. Assim, dependendo do objetivo do experimento o uso de altas concentrações do brometo de etídeo é uma estratégia que permite separar a forma circular superenovelada das formas circular relaxada e linear.

6.6.4 **Voltagem e tipo de tampão de eletroforese aplicada:**

A corrente elétrica, a composição e a força iônica do tampão influenciam na migração do DNA. Em uma faixa de baixa voltagem, a taxa de migração de fragmentos de DNA linear é proporcional à voltagem aplicada. Entretanto, o aumento de voltagem faz com que a linearidade seja perdida. Desta forma, os grandes fragmentos de DNA migram mais rápido do que os pequenos havendo formação de “rastros” que refletem a má resolução dos fragmentos. Em baixa força iônica, a migração é lenta e em alta força iônica há uma super condutividade elétrica que gera calor e pode derreter o gel dentro da cuba além de desnaturar o DNA. Os tampões mais utilizados em eletroforese de DNA são o TAE (Tris-acetato-EDTA) e o TBE (Tris-borato-EDTA), ambos compostos pelo elemento tamponante, o Tris ou (hidroximetil) aminometano. Ressalta-se que o Acetato (ácido acético) ou Borato (ácido bórico) são utilizados para ajustar o valor de pH da solução e atuam como eletrólitos para a manutenção da corrente. Enquanto que o EDTA (ácido etienodiaminotetracético) presente em ambos os tampões serve como um agente quelante que sequestra íons de magnésio entre outros. Isto é particularmente interessante para proteger o DNA via inibição de nucleases que dependem da presença de magnésio para degradar o DNA. A seleção dos tampões de eletroforese TAE ou TBE depende do objetivo do experimento. O TAE possui a menor capacidade tamponante, no entanto, apresenta maior poder de resolução para moléculas grandes de DNA quando comparado ao TPE (Tris fosfato EDTA) ou TBE. Por sua vez o tampão TBE é preferido para a separação de moléculas pequenas de DNA, menores do que 1 kb, e para longas corridas devido a sua maior capacidade tamponante. No caso do DNA ser posteriormente recuperado do gel e utilizado, por exemplo, em um experimento de

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 8/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

clonagem, prefere-se o uso de TAE, pois o Borato presente no TBE é um potente inibidor de várias enzimas.

Tampão de corrida:TAE 50X – SOLUÇÃO ESTOQUE 242 g de Tris Base 57,1 mL de ácido acético glacial 100 mL de 0,5 M EDTA* (pH 8,0). *Ajustar o pH da solução de EDTA com NaOH Armazenar a temperatura ambiente TAE 1x – SOLUÇÃO DE USO: 20 ml TAE 50x + 980ml água de injeção	Tampão de amostra: Azul de bromofenol 0,25% Xileno cianol FF 0,25% Glicerol 30% Armazenar em aliquotas de 1mL à 4°C
Gel Agarose 1% 1g de agarose 100ml Tampão TAE (1x) Dissolver a agaroseno micro-ondas por aproximadamente 1 minutos. Aguardar esfriar (aproximadamente 50°C) antes de colocar a solução no molde.	Solução de Brometo de etidium 0,5µg/ml 100ml tampão TAE (1x) 5µl brometo de etidium 10mg/ml
Cuba de eletroforese: Marca: SCIE-PLAS - Modelo: HU-13	Fonte de eletroforese: Marca: E-C Apparatus Corporation - Modelo: EC 105

6.7 Eletroforese para DNA ou produto de PCR

- 6.7.1 Preparar gel de agarose 1% em solução de TAE 1x sem brometo de etídio (final= 0,5µg/ml). Antes de preparar o gel, colocar os moldes na base de acrílico (para evitar o vazamento do gel) ou vedar o molde com fita crepe;
- 6.7.2 Dissolver no micro-ondas a agarose com Tampão TAE 1x; Aguardar a temperatura ficar próxima de 50°C para colocar no molde, colocar o pente com a quantidade de orifícios desejada e aguardar o endurecimento;
- 6.7.3 Colocar TAE 1x na cuba de eletroforese até o nível marcado, colocar o gel na cuba (junto com a base de preparo e retirar o pente). Adicionar corante de corrida à amostra (verificar indicação na bula do kit comercial). Em média, 1ul de corante:5ul do DNA ou produto de PCR, colocar um padrão de peso molecular (ladder) específico para a corrida de eletroforese (diluído de acordo com o fabricante); Tampar a cuba (Obs: O eletrodo é fixo na tampa. Prestar atenção na hora de colocar o gel e aplicar as amostras para que

as amostras sejam aplicadas onde o eletrodo preto esta, pois as amostras correm do negativo (preto) para o positivo (vermelho).

- 6.7.4 Antes de começar a corrida certificar-se que o botão “RANGE SELECT” esteja selecionado para “LOW” e o botão “MILLIAMPS/VOLTS” esteja em “VOLTS”. Colocar o cabo de energia na tomada, conectar os eletrodos na fonte (preto com preto / vermelho com vermelho). Ligar o botão “OI “ no botão “VOLTAGE SELECT” selecionar 90V. A corrida poderá demorar até 1 hora (dependendo da concentração da agarose), mas o ideal é que o gel seja visualizado a cada 20/30 minutos para acompanhar a corrida.
- 6.7.5 Quando o corante estiver na região desejada, desligar o botão “ O I” Destampar a cuba, retirar a base com o gel e colocar o gel na cuba com tampão TAE + Brometo de etidium (concentração final 0,5µg/ml)
- 6.7.6 Expor no transiluminador e fotografar no Sistema de fotodocumentação. Se necessário, Imprimir a imagem.



- 6.8 **Limpeza:** Após o uso limpar com uma gaze com álcool 70°C, o local e guardar o material utilizado. Conservar o local limpo e organizado

7. FLUXOGRAMAS

- 7.1 Não aplicável.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 029
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 10/10
Assunto: Análise de concentração de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) por eletroforese/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

8. ANEXOS

8.1 Não aplicável.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

9.1 A ANÁLISE DE DNA POR ELETROFORESE. Autores: Elisete Marcia Corrêa e Patrícia Abrão Possik.