

Extração de DNA plasmidial

Eletroforese de DNA

Para manipulação genética e análise de expressão gênica devemos ser capazes de obter preparações puras de DNA e RNA!

Recordando: Estrutura do DNA

Emparelhamento de bases!

Cadeias do DNA são antiparalelas!

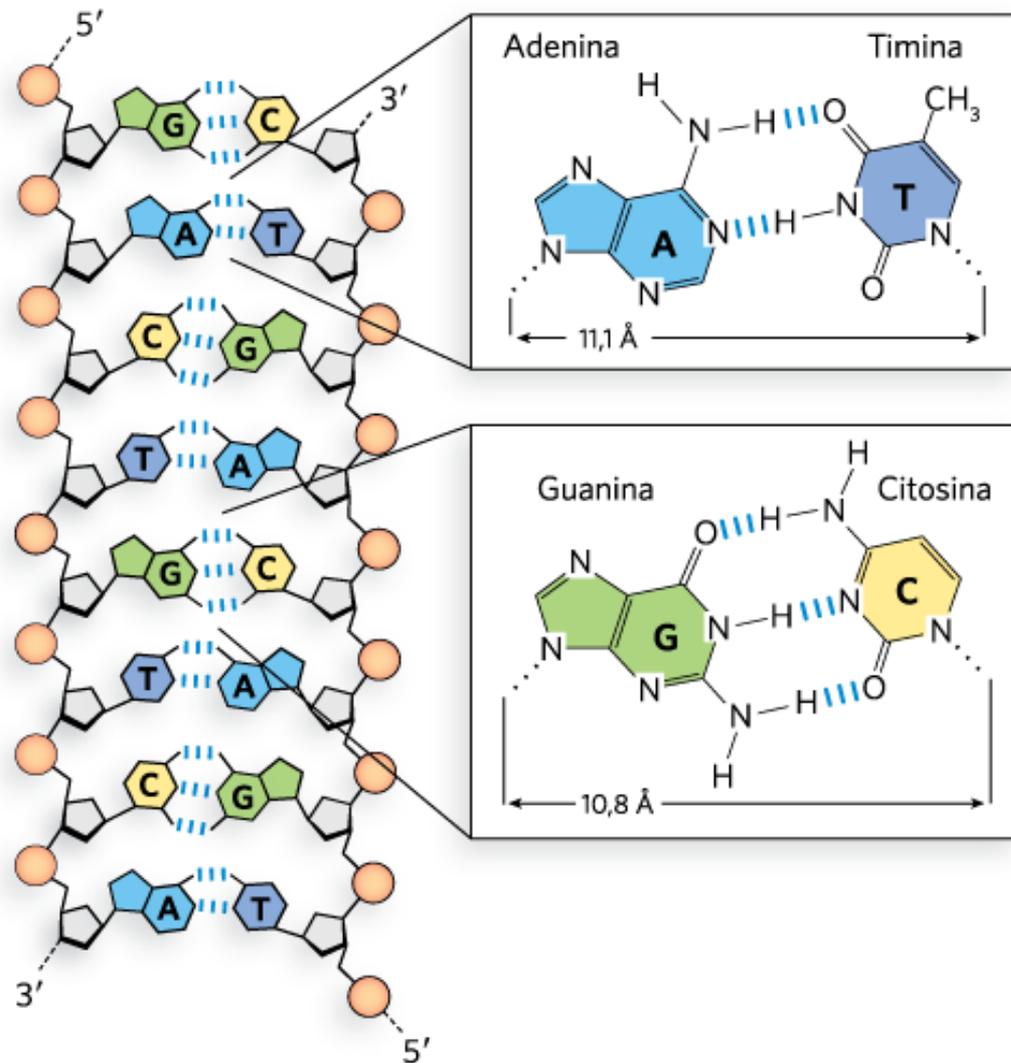


FIGURA 6-11 Padrão das pontes de hidrogênio formadas no pareamento de bases de Watson-Crick. As pontes de hidrogênio estão representadas por três linhas azuladas.

Recordando: Estrutura do DNA

O DNA circular não tem pontas livres e isso cria uma tensão de giro e provoca a formação de superhélice.

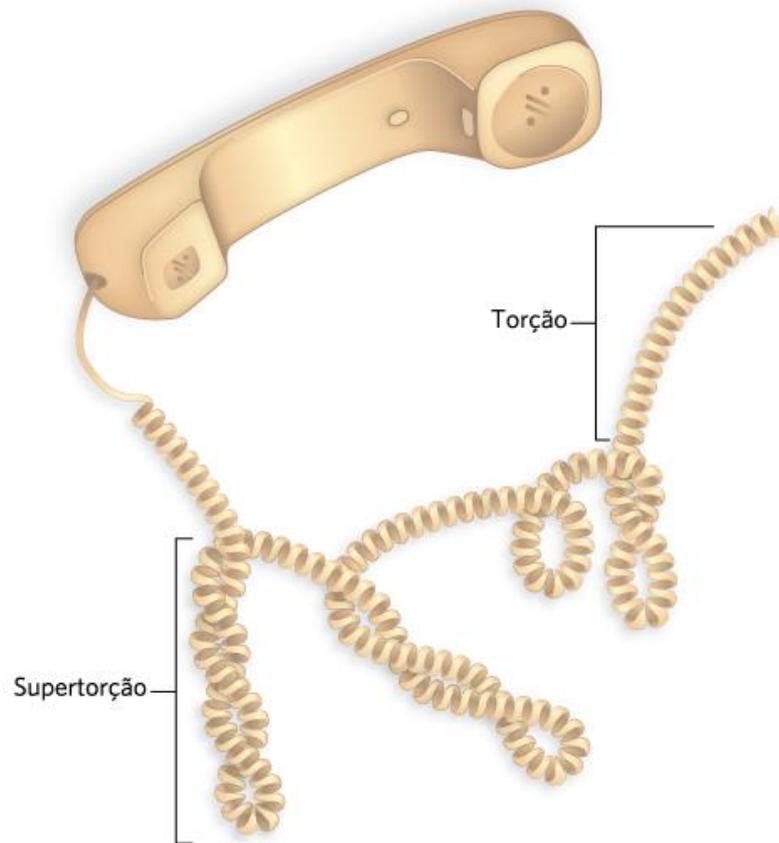


FIGURA 9-6 Supertorções. O cordão de um telefone antigo é torcido como uma hélice de DNA, e o cordão torcido pode se supertorcer.

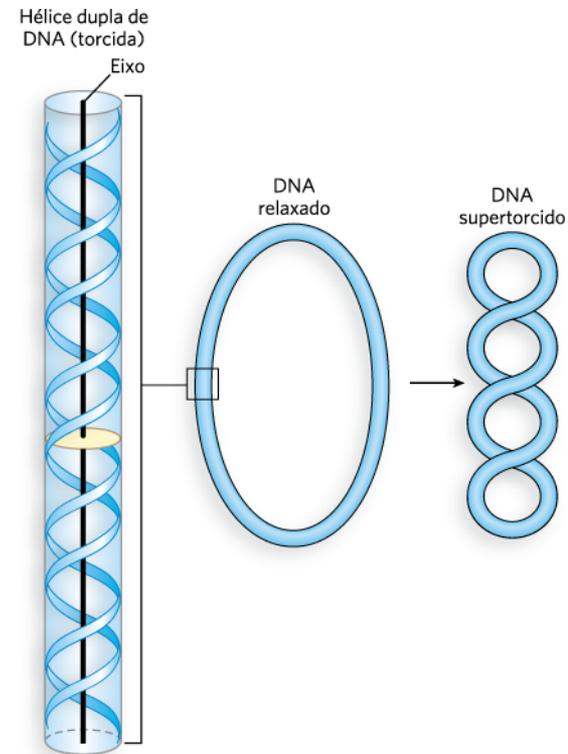


FIGURA 9-7 Supertorção do DNA. Quando se torce sobre si mesma, a fita dupla do DNA forma uma nova hélice, ou super-hélice. Normalmente, a super-hélice de DNA é chamada de supertorcida. [Fonte: Adaptada de N. R. Cozzarelli, T.C. Boles, and J. H. White, in *DNA Topology and Its Biological Effect* (N. R. Cozzarelli and J. C. Wang, eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990, pp. 139-184.]

**Um DNA circular está sujeito a essa torção.
Veja o exemplo nessa foto de microscopia eletrônica.**

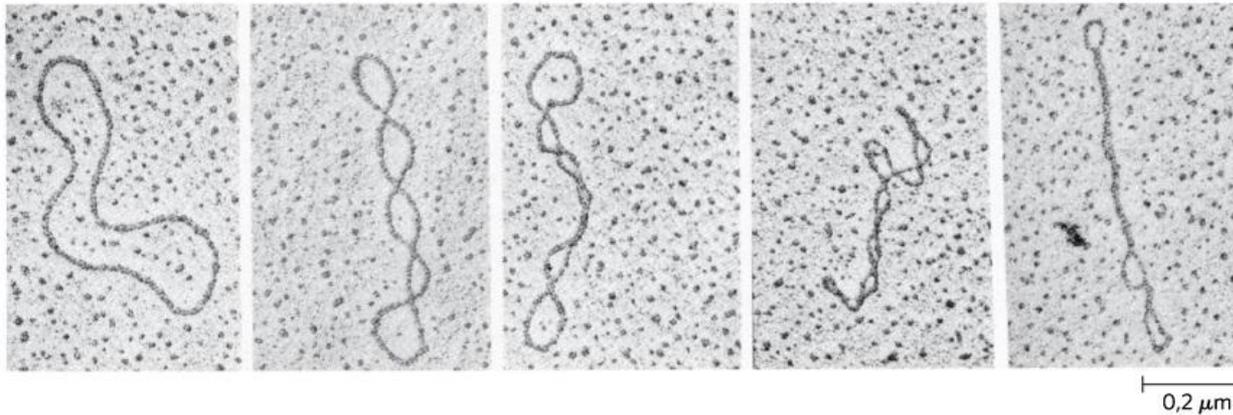
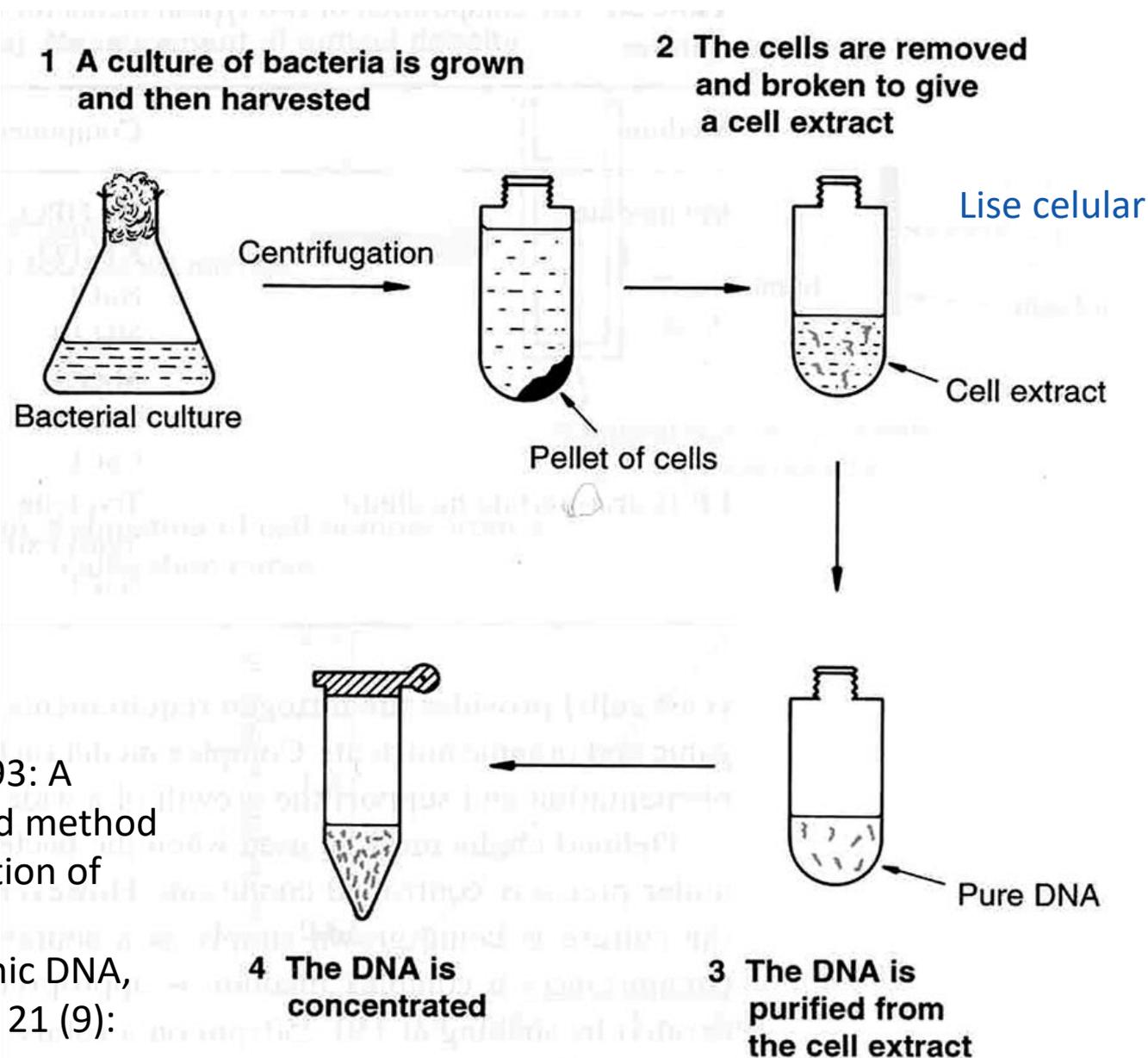


FIGURA 9-9 DNA plasmidial circular fechado relaxado e supertorcido. A micrografia eletrônica de varredura à extrema esquerda mostra o DNA relaxado. Supertorções crescentes são apresentadas da esquerda para a direita. [Fonte: Laurien Polder, de A. Kornberg, *DNA replication*, W. H. Freeman, 1980, p.29.]

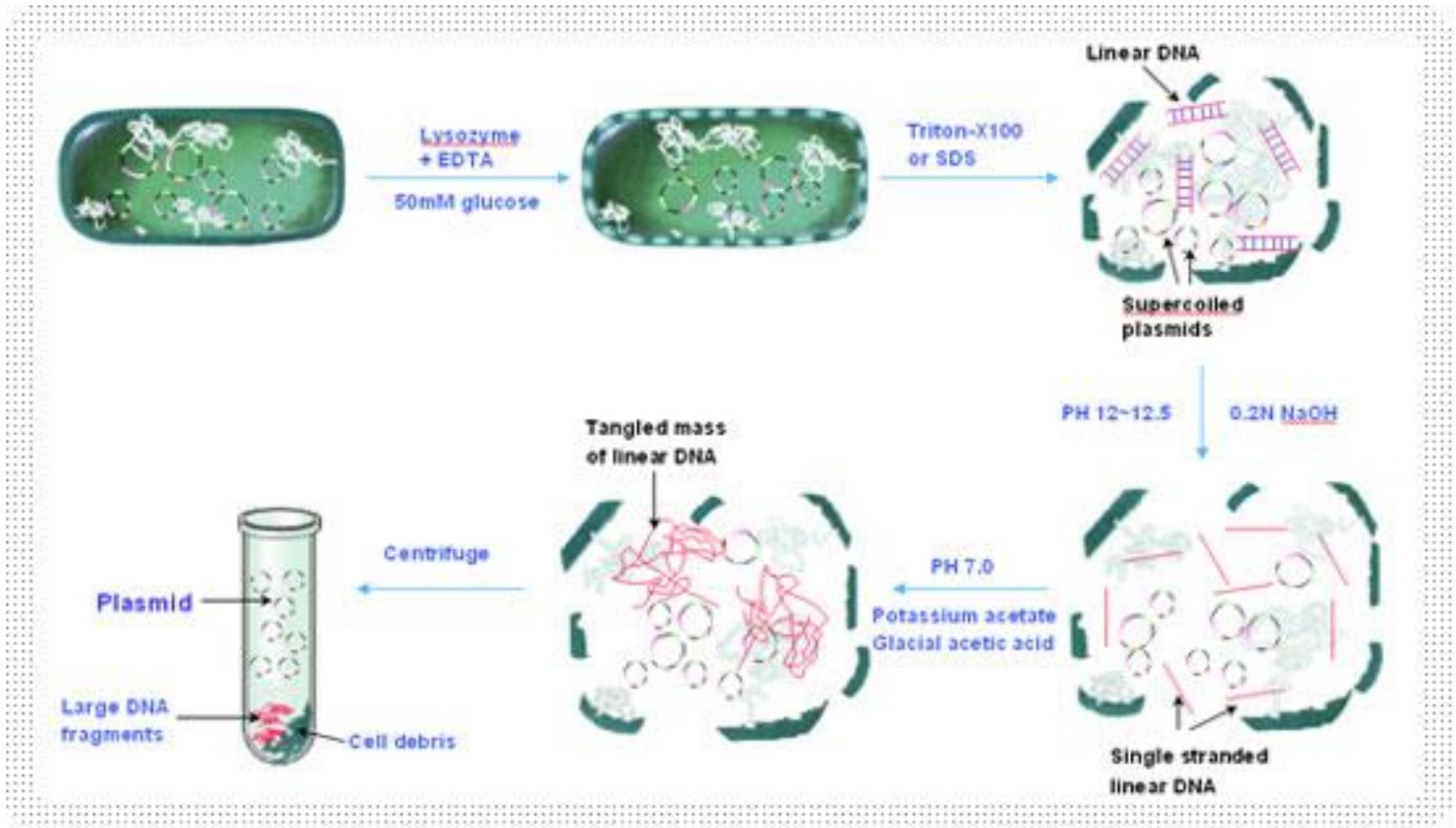
Visão Geral: purificação de DNA



Chen & Kuo 1993: A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA, *Nuc. Acids Res.* 21 (9): 2260.

Purificação de DNA plasmidial por lise alcalina

E os plasmídeos? Como separá-los do DNA cromossômico?



Precipitação do DNA com etanol

O etanol depleta a camada de hidratação em torno do DNA

- Permitindo a interação de cátions com os fosfatos de carga negativa
- Reduzindo as forças de repulsão entre diferentes fitas de DNA
- Causando agregação e precipitação do DNA

Eletroforese em Gel

- Eletroforese é o movimento de moléculas através de uma corrente elétrica
- Ácidos nucleicos se movem de um polo negativo para o polo positivo.



Princípios de Eletroforese

Géis podem ser feitos de substâncias como agarose ou poliacrilamida.

- **Agarose** – açúcar complexo isolado de algas marinhas. O gel possui poros de tamanho grande, e são bons para separar moléculas grandes rapidamente

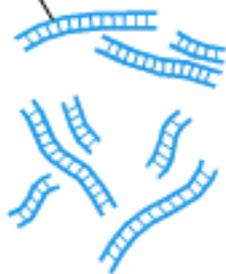


- **Poliacrilamida** – polímero da acrilamida, derivada do ácido acrílico. Para DNA, é usada para separar moléculas pequenas

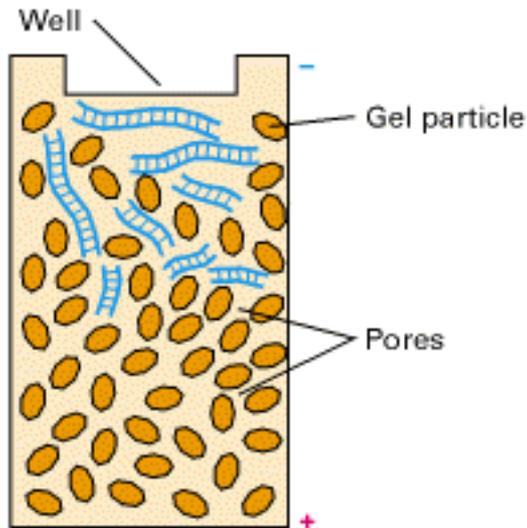
É um polímero, ou seja, a estrutura do gel é mantida por ligações covalentes.

Princípios de Eletroforese

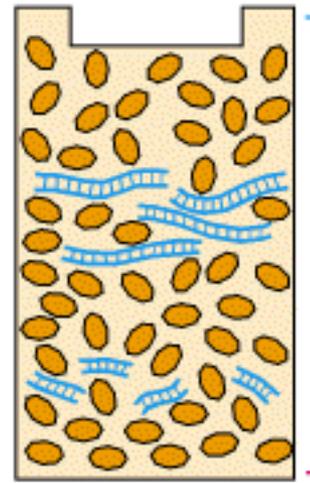
DNA restriction fragments



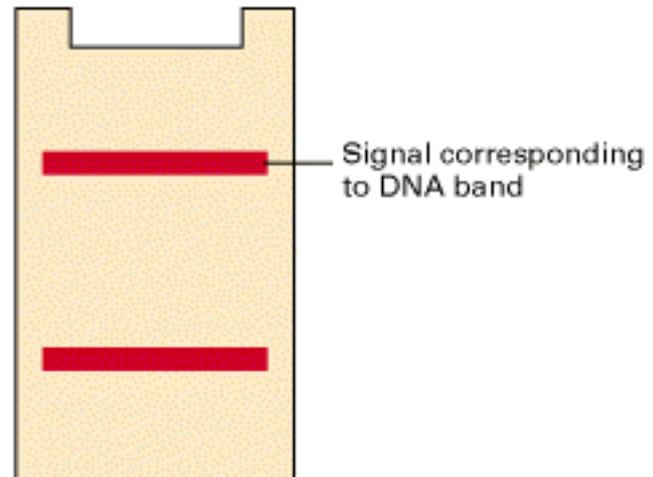
Place mixture in the well of an agarose or polyacrylamide gel. Apply electric field



Molecules move through pores in gel at a rate inversely proportional to their chain length



Subject to autoradiography or incubate with fluorescent dye



Tampão de eletroforese

- Conduzem a corrente elétrica e protegem o DNA de degradação
- Tris Borato EDTA (TBE), Tris Acetato EDTA (TAE), Tris Fosfato EDTA (TPE) são os mais frequentemente usados.

Métodos de Detecção

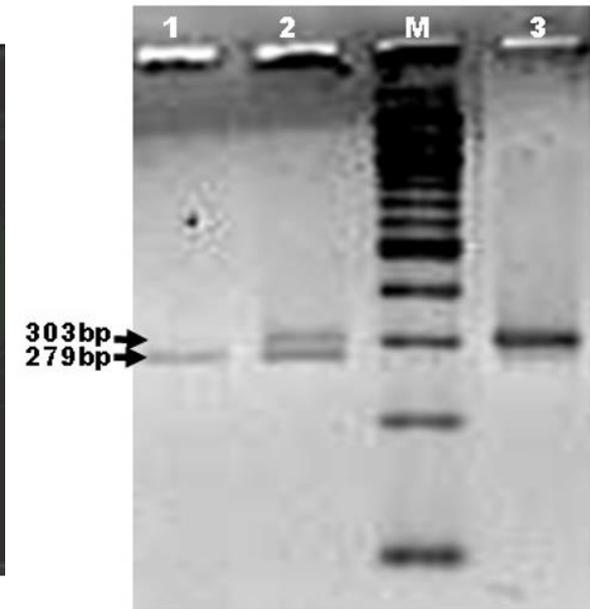
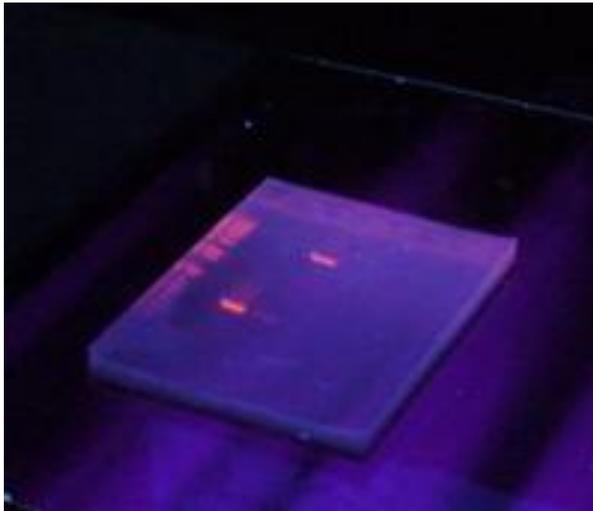
- Coloração antes ou durante a eletroforese
- **Brometo de Etídio**: agente intercalante que fluoresce com a luz UV.
- **SyBr green/SyBr gold/Gel Red**: outros intercalantes, menos mutagênicos ou menos absorvidos pela pele.
- **Coloração com prata**: mais sensível, geralmente usada apenas em géis de poliacrilamida.
- Alternativamente, **autoradiografia** de DNA marcado com radioatividade.

Princípios de Eletroforese

<https://dnlc.cshl.edu/resources/animations/gelectrophoresis.html>

Eletroforese de DNA

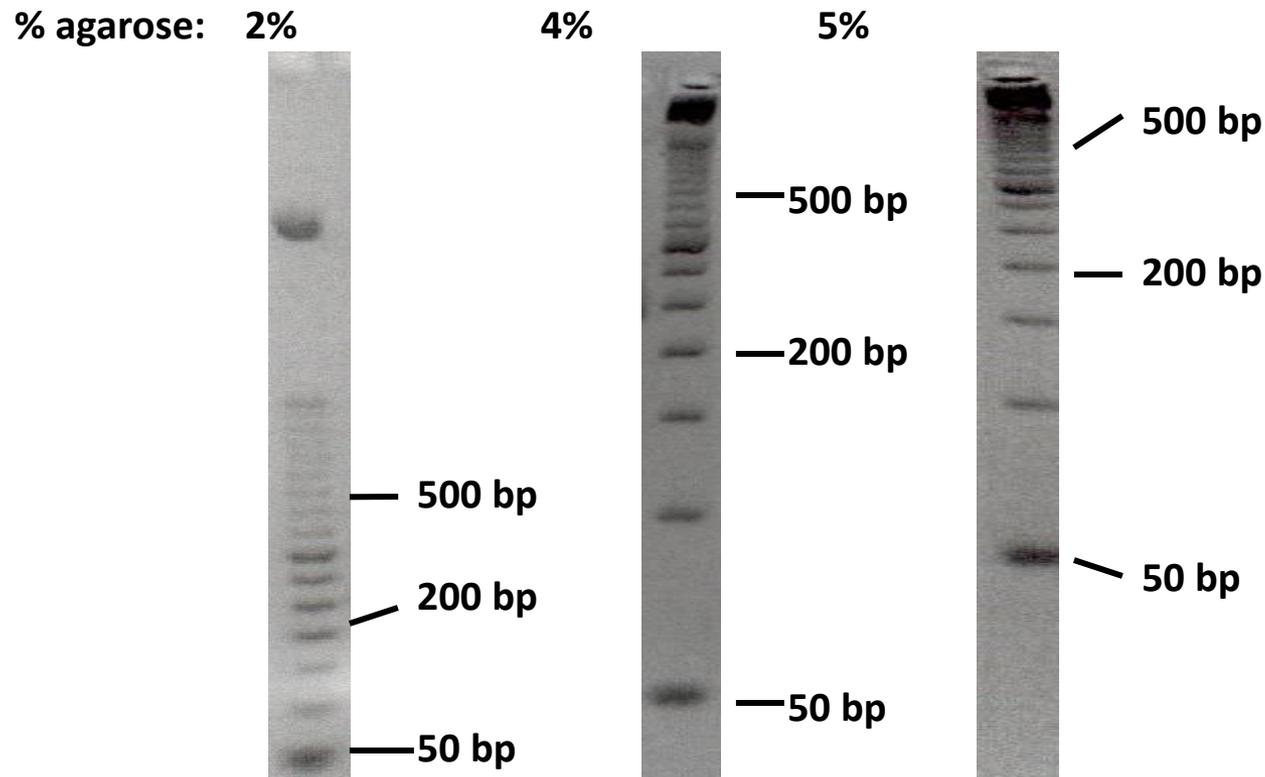
A agarose é utilizada para analisar amostras de DNA na faixa de 50 pb a 50 kpb



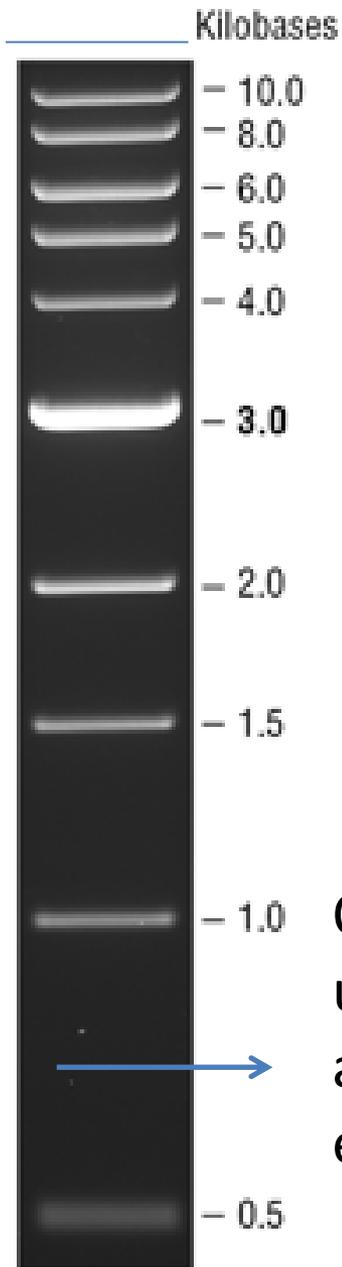
303bp →
279bp →

Eletroforese de DNA

A concentração do gel vai afetar a **resolução** de fragmentos de diferentes faixas de tamanho.



Eletroforese de DNA



Dist. em cm	Tamanho em pb
0,74	10000
1,33	8000
2,1	6000
2,65	5000
3,53	4000
4,95	3000
7,3	2000
9,13	1500
11,73	1000
15,53	500

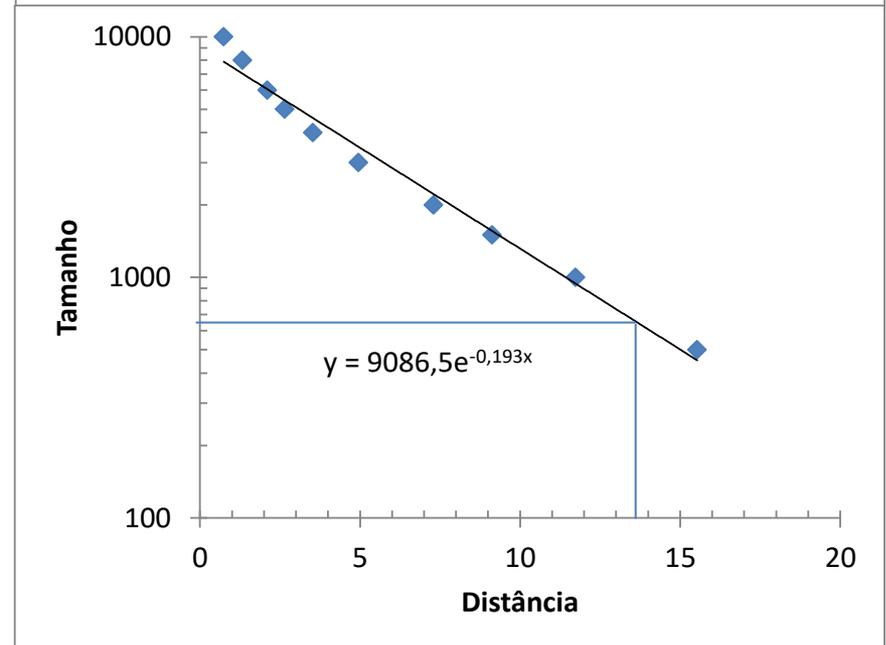
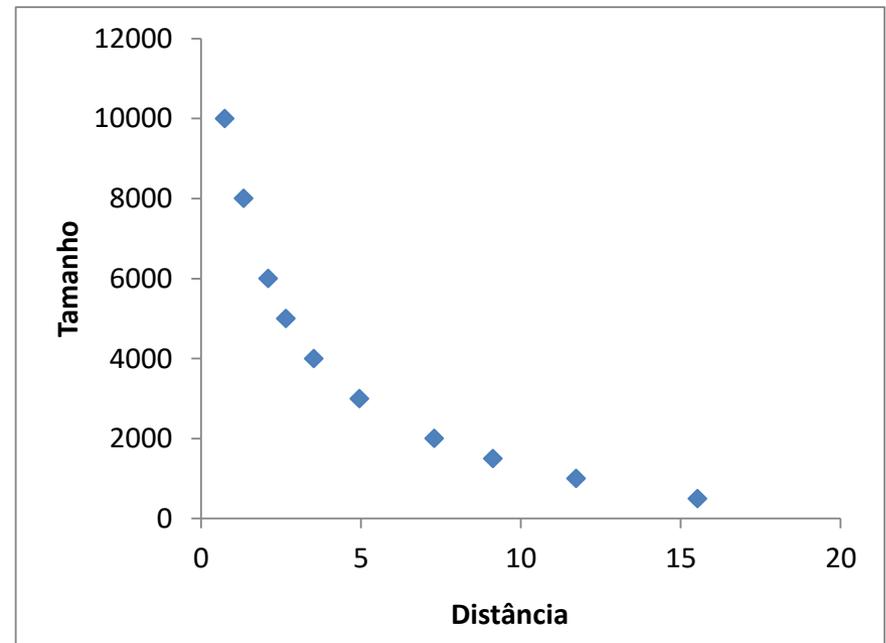
Os fragmentos são separados, movendo-se para o pólo positivo a uma taxa inversamente proporcional ao logaritmo da sua dimensão!!!

Eletroforese de DNA

Dist. em mm	Tamanho em pb
0,74	10000
1,33	8000
2,1	6000
2,65	5000
3,53	4000
4,95	3000
7,3	2000
9,13	1500
11,73	1000
15,53	500

No exemplo acima: uma banda exatamente entre 1000 e 500 pb teria migrado 13,63 cm:

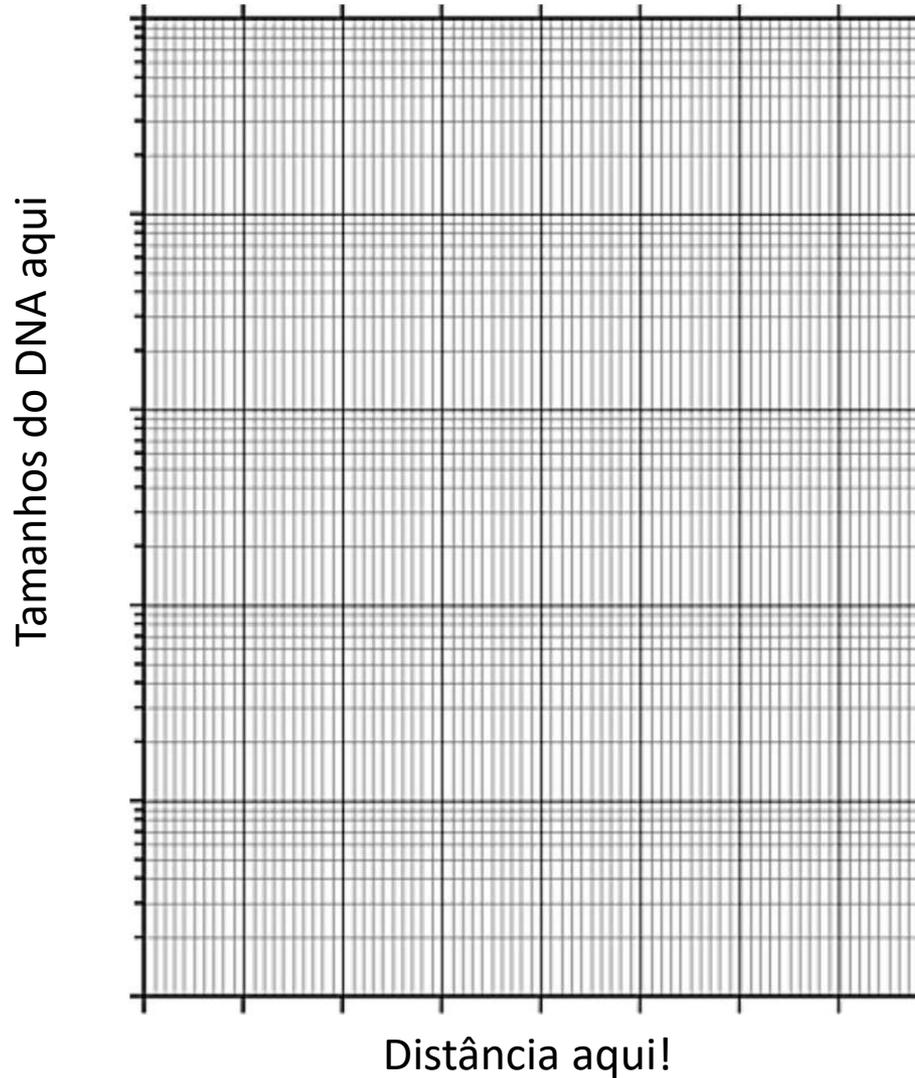
Aplicando a fórmula: o tamanho é 654 pb!!!



Eletroforese de DNA

Mas eu não sei usar o excel...

Faz na mão!!! Papel milimetrado semi-log!



Migração das diferentes topologias de DNA plasmidial

E os plasmídeos, como migram durante a eletroforese?

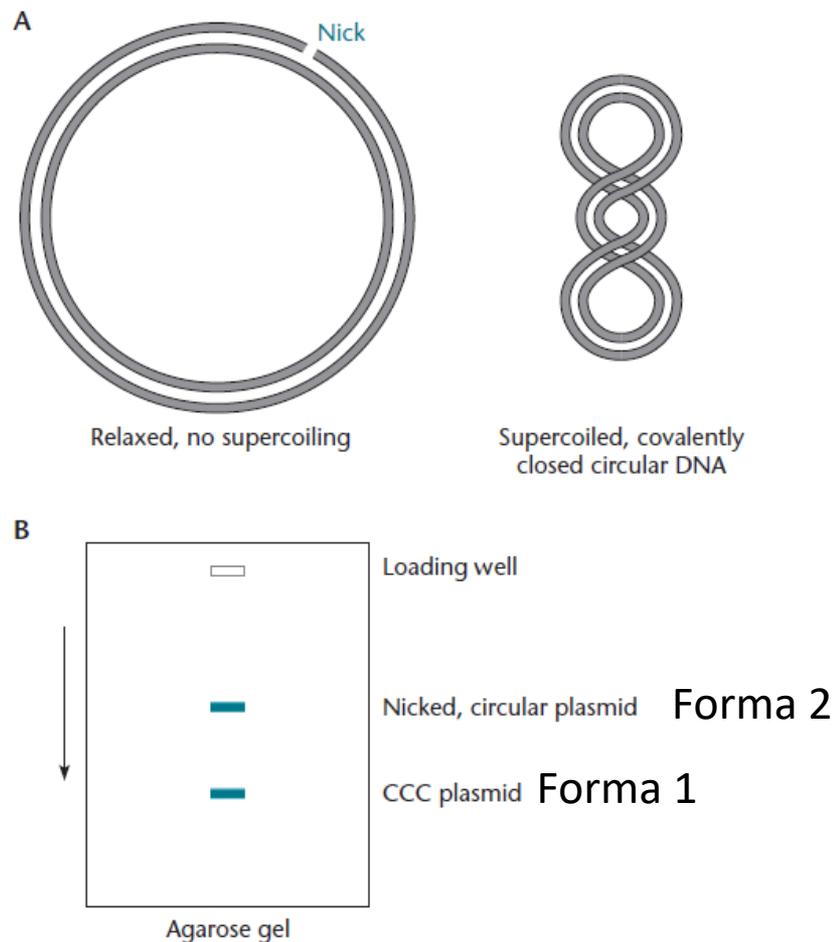
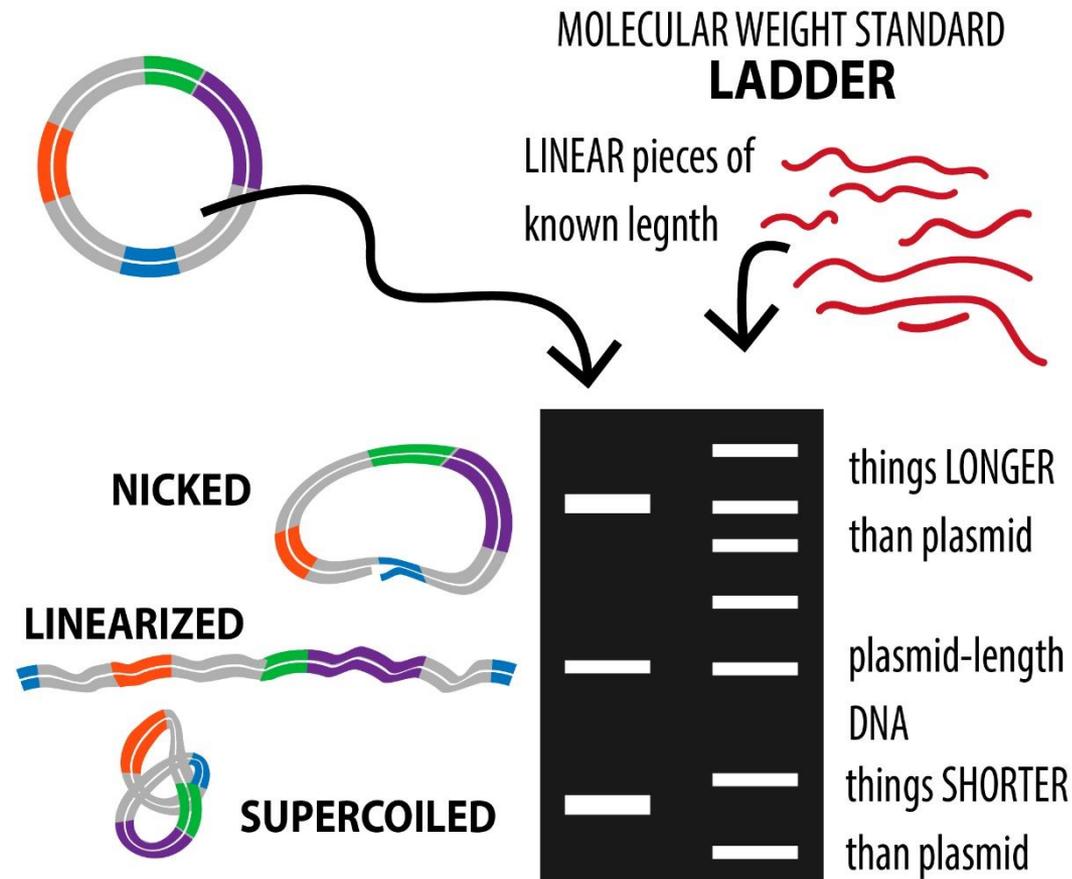


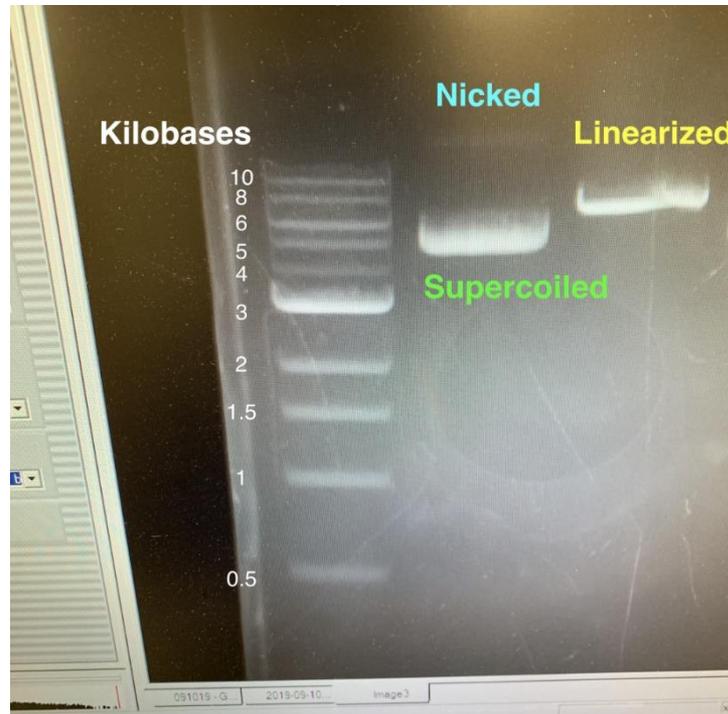
Figure 4.1 Supercoiling of a covalently closed circular (CCC) plasmid. **(A)** A break in one strand relaxes the DNA, eliminating the supercoiling and making the DNA less compact. **(B)** Schematic diagram of an agarose gel showing that the covalently closed supercoiled circles run faster on a gel than the nicked relaxed circles. Depending on the conditions, linear DNA and covalently closed circular DNA run in approximately the same position as nicked relaxed circles of the same length. The arrow shows the direction of migration. doi:10.1128/9781555817169.ch4.f4.1

Migração das diferentes topologias de DNA plasmidial

What's the TOPOLOGY of this PLASMID?



Migração das diferentes topologias de DNA plasmidial



<https://thebumblingbiochemist.com/365-days-of-science/dna-topology-and-how-it-influences-what-bands-on-your-agarose-gel-youll-see-agarose-gel-electrophoresis-reptation-linearization-etc/>