QBQ-1354: Biologia Molecular

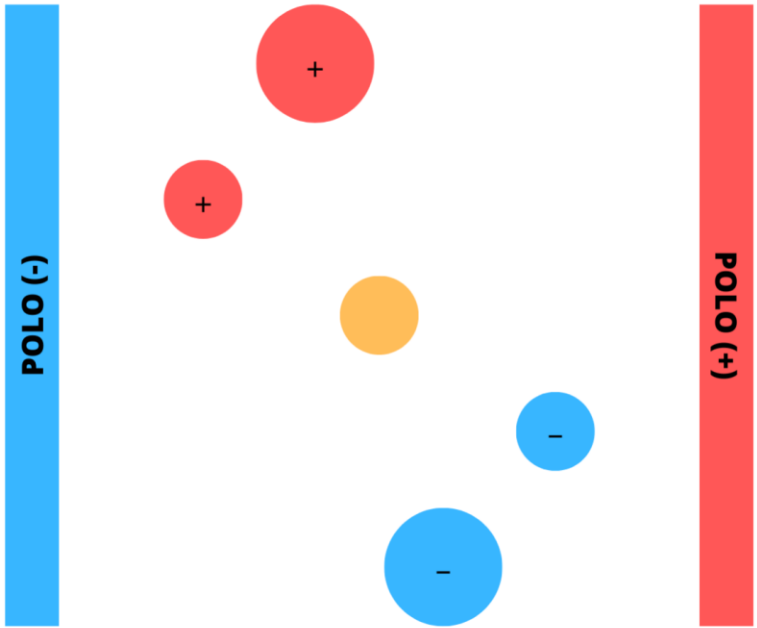
Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose

Vitor Saldanha

São Paulo, 2023

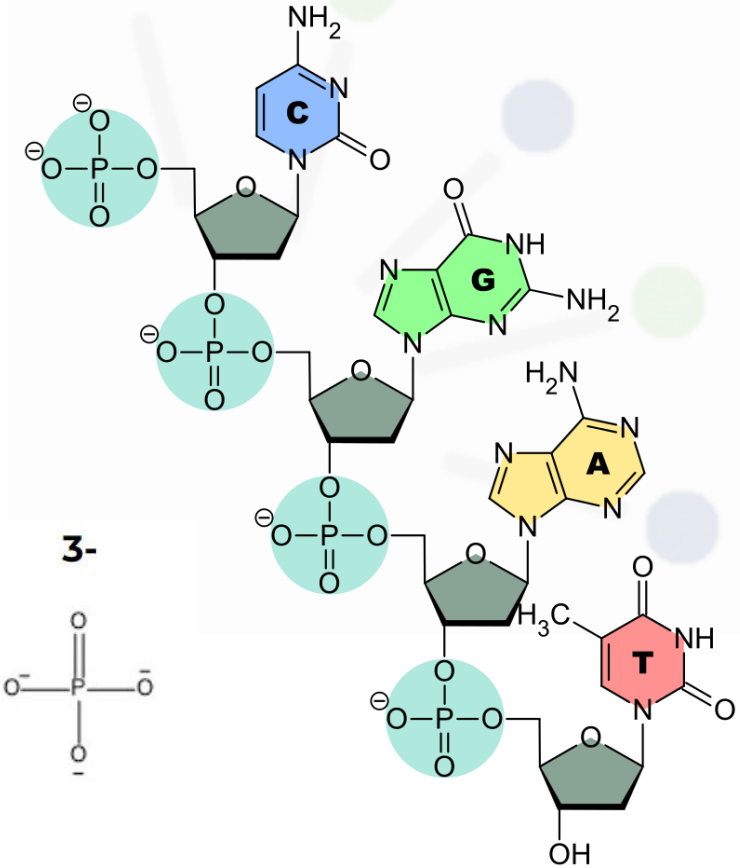
Eletroforese: princípios

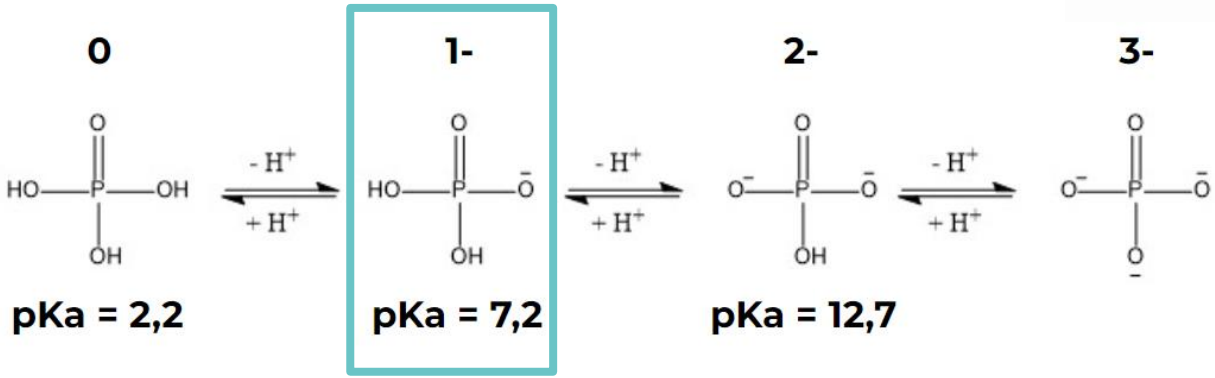
- Grego: **Eléktron** (carga) + **Phorós** (movimento, transporte)
- Partículas **carregadas** se movimentam em velocidades **diferentes** por um meio após aplicação de corrente elétrica



Eletroforese de DNA

- Em pH fisiológico (~ 7,0-7,4): carga **negativa**
- Grupo fosfato (derivado do ácido fosfórico)





Disponível em: <en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Nucleic_Acid/DNA/DNA_structure#>. Acesso em: 17 jun. 2023

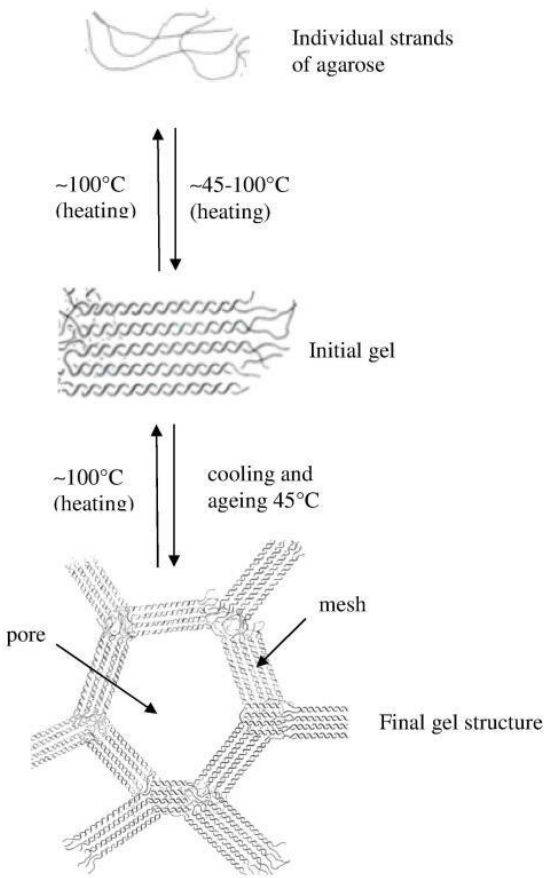
Eletroforese de DNA: reagentes

1) **Matriz** (meio): Gel de agarose
   - Agarobiose
     - D-galactose + 3,6-anidro-L-galactopiranose

   - Concentração do gel
     - 0,4% - 3%: tamanho molecular (kb) das espécies de DNA presentes na amostra

Disponível em: <britannica.com/science/red-algae>. Acesso em: 17 jun. 2023

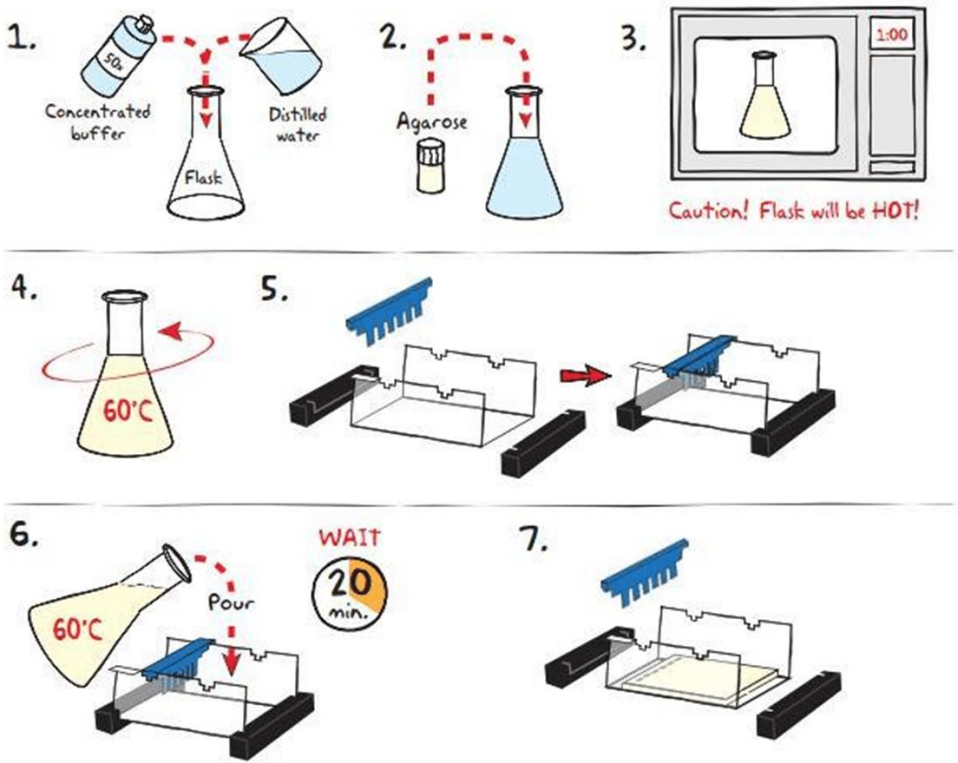
Disponível em: <sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/a9539>. Acesso em: 17 jun. 2023



(GOLAWSKA, 2014)

Eletroforese de DNA: reagentes

1) **Matriz** (meio): Gel de agarose - Preparo

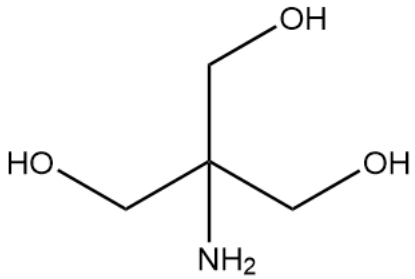


Disponível em: <https://www.edvotek.com/quick-guide-sybr-safe>. Acesso em: 17 jun. 2023

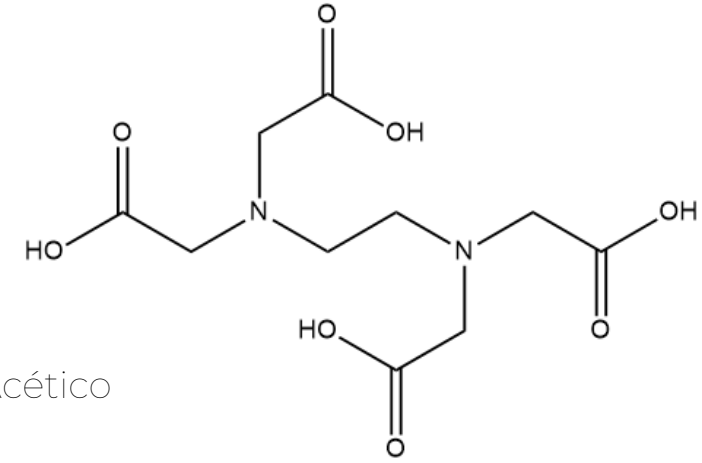
Eletroforese de DNA: reagentes

2) **Tampão de corrida (TAE/TBE)**: manter o pH constante e inibir nucleases

Amina primária: Tris(hidroximetil)aminometano

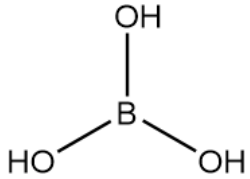


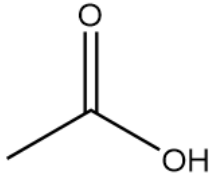
Agente quelante: EDTA



Ácido fraco: Bórico ou Acético

TBE (DNA >3kb) ←

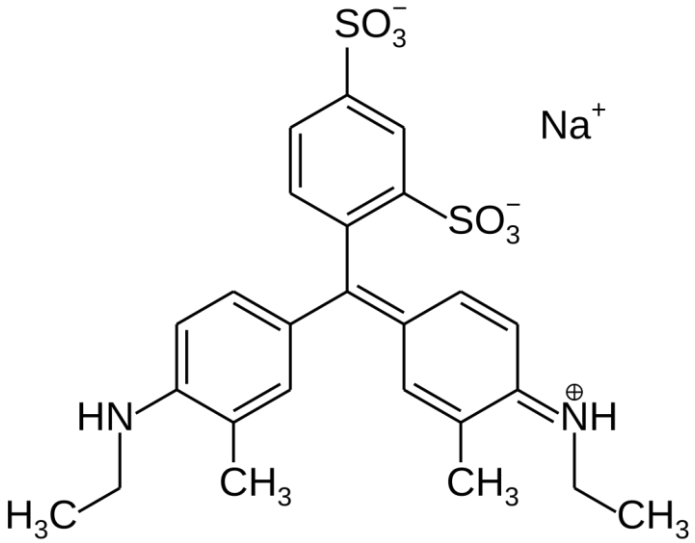




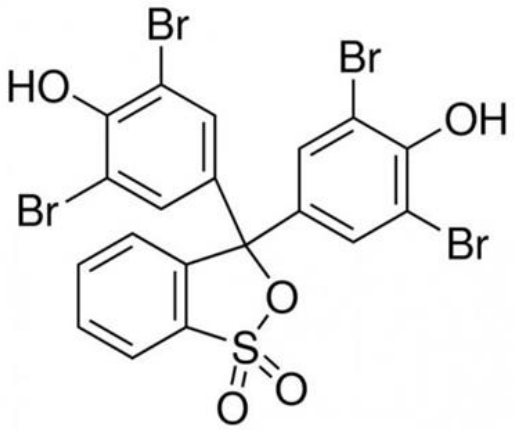
→ TAE (DNA <2kb)

Eletroforese de DNA: reagentes

3) **Tampão de amostra**: mostrar o avanço da corrida - Glicerol (30-40%) + Corante



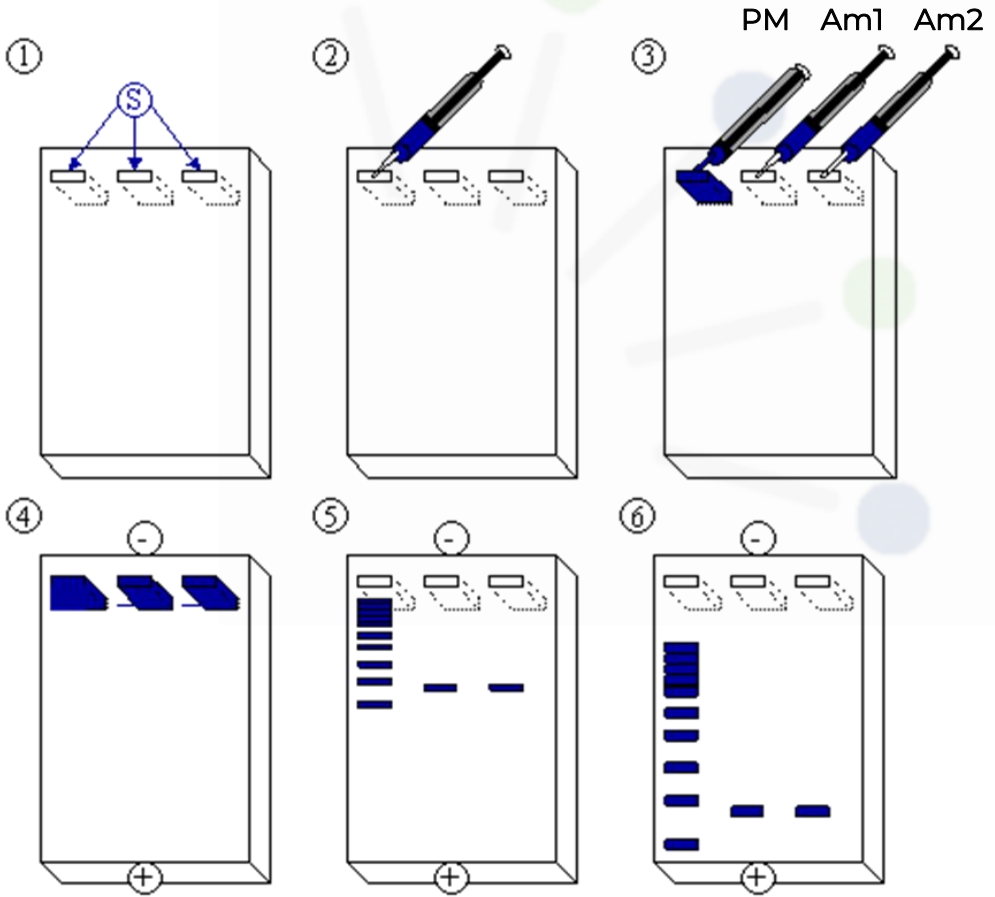
Xileno de cianol: 4000 pb



Azul de bromofenol: 300 pb

Eletroforese de DNA: reagentes

4) **Marcadores de peso molecular:**
Comparar os resultados obtidos com padrões de DNA com massas moleculares conhecidas



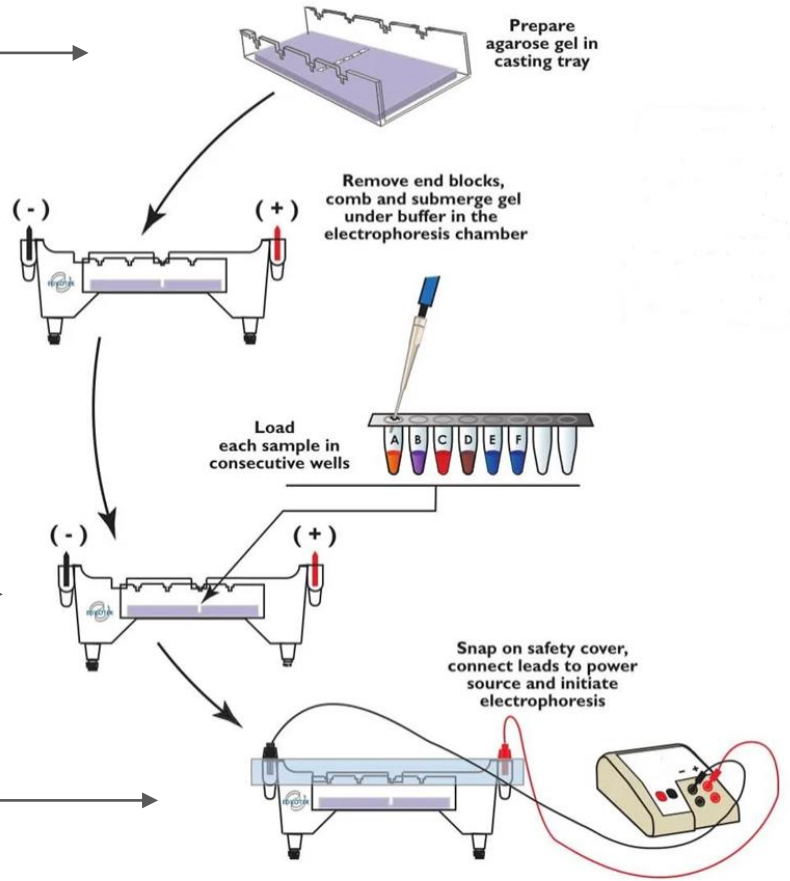
Eletroforese de DNA: metodologia

Preparo e aplicação do gel

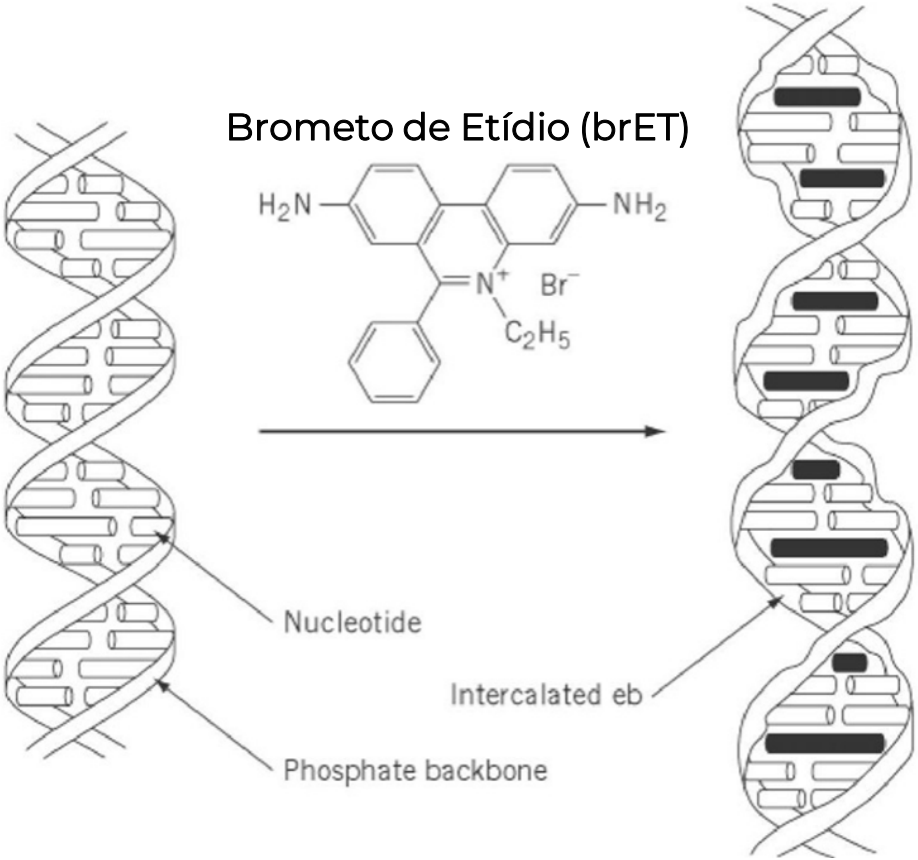
Adição do tampão de corrida até que o gel esteja submerso

Aplicação das amostras (+ tampão de amostra) e marcador de peso

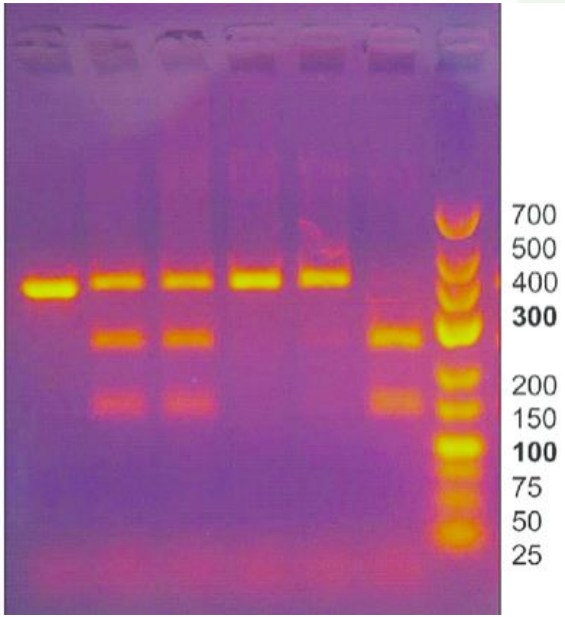
Conectar os eletrodos aos terminais e ligar o aparelho



Eletroforese de DNA: resultados



- brET: Agente Intercalante (Mutagênico)
- Complexo brET-DNA é **fluorescente**
  - λ_{abs} = 270 nm (ultravioleta)
  - λ_{emi} = 605 nm (laranja)



Referências

[1] GOLAWSKA, S. et al. Are agarose-sucrose gels useful for studying the probing and feeding behavior of aphids? **Australian Journal of Crop Science**, 2014. v. 8, n. 2, p. 263-270.

[2] LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2014.

[3] ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**, 3a ed. Mercado Aberto, 2003.