

## QBQ2457- Lab 2 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR

As alíquotas de 5µL da PCR e separadas na aula anterior serão analisadas em gel de agarose 1% em TAE (Tris-acetato-EDTA) para confirmar a obtenção do amplicon no tamanho esperado. A eletroforese das amostras será conduzida juntamente com um padrão de tamanho em pares de bases (DNA ladder). Dependendo do tamanho da cuba e do tipo de pente utilizado, o gel comporta até 7 a 16 amostras além do DNA ladder, isto é um gel para cada 3 grupos deverá ser suficiente.

***ATENÇÃO: O gel contém brometo de etídeo, um possível carcinógeno. Portanto, use luvas na manipulação. CUIDADO COM O BROMETO DE ETÍDEO!!!***

- Pese 1 grama de agarose e coloque em um erlenmeyer;
- Coloque 100mL do tampão TAE 1x no erlenmeyer, vede a boca com plástico filme, deixando alguns furos, e leve ao microondas, aquecendo de 30 em 30 segundos, até a solução tornar-se límpida e transparente;

***Use luvas térmicas para evitar queimaduras e óculos de proteção!***

- Enquanto aguarde a solução esfriar, monte a cuba de eletroforese;
- Adicione o 10µL de brometo de etídeo (5mg/mL) somente quando a solução estiver fria e sem a emissão de vapores;
- Adicione o gel com o brometo de etídeo na cuba, coloque o pente, remova eventuais bolhas com o toque delicado usando uma ponteira e espere a solução esfriar e solidificar;
- Enquanto aguarda a solidificação do gel, prepare as amostras para aplicar no gel. Adicione 2µL do tampão de amostra 5x e 3µL de água às alíquotas de 5µL de cada produto de PCR (separadas na aula anterior e armazenadas a -20°C).
- Após a solidificação do gel, adicione tampão TAE1x a cuba até cobrir o gel, retire o pente e aplique uma amostra (10 µL) em cada poço do gel.
- Aplique também (no primeiro ou último poço) uma alíquota do marcador de tamanho (DNA ladder). Anote qual DNA Ladder (ex: Ladder 100bp - NEB #N32315) utilizou com os respectivos tamanhos em pb.
- Ligue a fonte a 80V-100V por aproximadamente 1 hora

**Neste intervalo, será continuada a atividade em sala de aula.**

- Após 1h, retorne ao laboratório e visualize o gel sobre luz UV, usando óculos de segurança.
- Documente o resultado (tire uma foto ou digitalize a imagem do gel em equipamento apropriado).
- Esperamos obter fragmentos com tamanho de ~0,5 kb.