

7. ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

João José de Simoni Gouveia

Luciana Correia de Almeida Regitano

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar, identificar e purificar moléculas carregadas (como DNA e proteínas) (Maniatis, 1987). Este método foi introduzido por Tiselius, no ano de 1937 (Brammer e Iorczeski, 2002) e é simples, rápido e capaz de separar fragmentos que não são adequadamente separados por outras técnicas (Sambrook e Russel, 2002).

A técnica apresenta basicamente um sistema de suporte (gel de agarose, por exemplo), um tampão no qual está imerso o gel e os eletrodos nas extremidades da cuba onde estão contidos o tampão e o gel.

Sob a influência de um campo elétrico, moléculas carregadas e partículas migram em direção ao pólo oposto. A carga e a massa das moléculas fazem com que elas migrem em velocidades diferentes e, portanto, propiciam a separação destas (Westermeier, 2005). Como os ácidos nucleicos (DNA e RNA) possuem carga elétrica negativa (devido ao grupamento fosfato) eles sempre migrarão em direção ao pólo positivo. Então, o fator determinante da taxa de migração será a massa da molécula (quando se fala em ácidos nucleicos, a massa é diretamente proporcional ao tamanho da molécula).

Existem vários meios de suporte que podem ser utilizados (papel filtro, membrana de celulose, gel de agarose, gel de poliacrilamida). No caso dos géis, a porosidade (que tem uma relação direta com a concentração de agarose) determina o poder de separação (Brammer, 2002).

Na escolha do tampão, o principal fator a ser considerado é sua capacidade tamponante. Os dois tampões mais utilizados na eletroforese de ácidos nucléicos são o TAE (Tris, Acetato e EDTA) e o TBE (Tris, Borato e EDTA). O TAE é mais utilizado que o TBE, porém é mais facilmente exaurido durante corridas longas ou com alta voltagem. O TBE, apesar da melhor capacidade tamponante, deve ser evitado quando se deseja purificar os ácidos nucléicos do gel (Ausubel, 1994).

Alguns fatores alteram a migração das moléculas através do gel, dentre eles podemos citar: concentração de agarose, conformação do DNA e intensidade da corrente.

A concentração de agarose atua de forma importante na eletroforese, pois ela determina a faixa de tamanho das moléculas de DNA que podem ser separadas. As relações entre concentração de agarose e resolução de moléculas lineares de DNA são apresentadas na tabela abaixo (Maniatis et al., 1982).

Tabela 1. Limites de eficiência da separação de DNA em diferentes concentrações de agarose (Maniatis, 1987)

Concentração de agarose no gel (%)	Separação de moléculas de DNA (Kb).
	Limites de eficiência
0,3	60 – 5,0
0,6	20 – 1,0
0,7	10 – 0,8
0,9	7 – 0,5
1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2,0	3 – 0,1

Para observar ácidos nucléicos em gel de agarose, deve-se corá-los e submetê-los a uma luz ultravioleta. O corante mais comum é o brometo de etídeo, que se intercala entre as bases do DNA (Ausubel, 1994).

7.1. Protocolo para análise de produtos de amplificação e fragmentos de digestão em gel de agarose

- **gel 1%** → 0,3 g de agarose para 30 mL de gel, que deve ser preparado com tampão Tris-Borato-EDTA 1X. Para isso, aplicar 5 µl de produto de amplificação + 1 µl de *loading buffer*.
- **gel 4%** → 1,2 g de agarose de baixo ponto de fusão para 30 mL de gel, que deve ser preparado com tampão Tris-Borato-EDTA 1X. Utilizado para analisar o resultado das digestões com enzimas de restrição. Aplicar todo o produto da digestão (13 µl) + 2,6 µl de *loading buffer*.

1. Pesar a agarose
2. Colocá-la em um erlenmeyer contendo o volume necessário de tampão TBE 1X
3. Aquecer no forno de microondas até iniciar a ebulição (aproximadamente 30 segundos em potência média para um gel de 30 mL). Agitar o frasco e retornar ao forno de microondas por mais alguns segundos
4. Aguardar a redução da temperatura para aproximadamente 60 ° C e adicionar Brometo de Etídeo, na quantidade indicada para cada gel
5. Verter no molde previamente nivelado e colocar os pentes
6. Após a solidificação, colocar o gel na cuba de eletroforese e cobrir com tampão TBE 1X

7. Aplicar as amostras acrescidas de *loading buffer* e aplicar a corrente de acordo com o tamanho do gel
 - A eletroforese deve ser realizada em TBE 1X, a uma voltagem constante na faixa de 2 a 5 V/cm (considerando a distância entre os eletrodos). Após a corrida, submergir o gel por 20 minutos em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL e visualizá-lo sob luz ultra-violeta. Caso o fundo do gel esteja muito corado, pode-se lavar o excesso de brometo por submersão em TBE 1X por 5 a 10 minutos
- ☛ O Brometo de etídio é um potente agente mutagênico. Utilizar luvas e máscara para preparar a solução estoque e manipular os géis
- ☛ A luz ultra-violeta produz queimaduras severas. Utilize máscara/óculos de proteção adequados

7.2. GEL DESNATURANTE PARA RNA

Adriana Mércia Guaratini Ibelli

Para analisar moléculas de RNA podem ser utilizados géis de agarose e poli(acrilamida), desnaturantes ou não. As propriedades desta eletroforese são basicamente semelhantes às de eletroforese de DNA (Patel, 1994).

A qualidade das moléculas de RNA pode ser analisada em gel de agarose normal, feito com tampão (TBE, TAE) com água DEPC ou em gel desnaturante. Devido a interações intramoleculares, as moléculas de RNA podem dobrar-se, alterando a estrutura secundária e afetando a migração das moléculas no gel. O gel desnaturante soluciona este problema, pois sob condições desnaturantes as pontes de hidrogênio são rompidas e o RNA migra como molécula de fita simples. Isto

permite avaliar com acurácia a qualidade e o peso molecular do RNA (Sambrook, 2002; Maseka, 2005).

Dentre os desnaturantes existentes, o mais poderoso, além de caro e altamente tóxico é o hidróxido de metil mercúrio. Porém, o mais freqüentemente utilizado é o formaldeído, mas pode haver variantes de géis utilizando tiocianato de guanidina, formamida e DMSO. A utilização de cada um deles apresenta vantagens e desvantagens de acordo com a escolha do tipo de gel, poliacrilamida ou agarose, diferentes níveis de toxicidade e potencial de desnaturação (Patel, 1994).

Os géis polimerizados com formaldeído não coram satisfatoriamente as amostras, de forma que o brometo de etidíó deve ser colocado em cada amostra individualmente, e não no gel, como comumente utilizado (Regitano, 2001).

Outro diferencial no gel desnaturante de agarose é a utilização de MOPS (3-N-morfolino ácido propanosulfônico). O MOPS é um excelente tampão para manutenção de sistemas biológicos em pH neutro. É muito utilizado em biologia molecular e bioquímica.

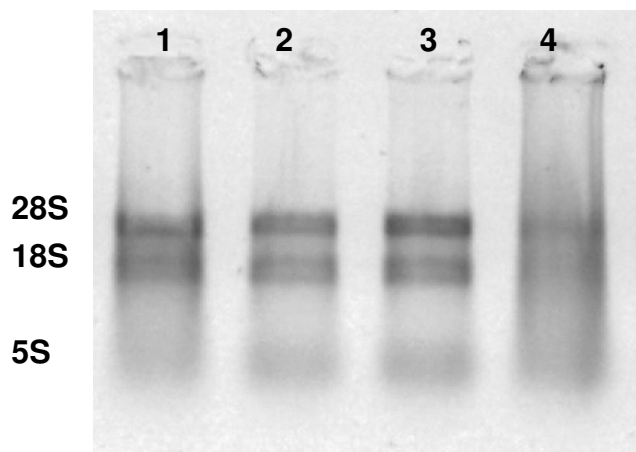


Figura 2. Exemplo de separação eletroforética. Nos números 1 a 3 são mostradas as bandas 28S, 18S e 5S do RNA, indicando integridade das amostras. O número 4 exemplifica uma amostra de RNA degradada.

7.2. PROTOCOLO DE GEL DESNATURANTE DE AGAROSE 1% COM FORMALDEÍDO (adaptado de Lúcia Elvira Alvares (2001):

Reagente	Quantidade
Agarose (1%)	0,3 g
Buffer 5X (1 x)	6,0 mL
Formaldeído (2,2M)*	5,4 mL
Água DEPC	18,6 mL
Total	30 mL

* verificar se o pH do formaldeído é superior a 4

A vidraria utilizada para a preparação do gel, assim como a cuba de eletroforese devem estar previamente tratadas contra ação de RNAses. Todas as soluções empregadas devem ser feitas com água DEPC.

Tampão de corrida 5X

Reagente	Quantidade
MOPS (100 mM)	20,6 g
Acetato de sódio 0,05 M (40 mM)	800 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0 (5 mM)	10 mL

1. Pesar o MOPS
2. Dissolvê-lo em acetato de sódio 0,05 M. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 2N e completar o volume para um litro de água DEPC
3. Adicionar o EDTA 0,5 M pH 8,0. Guardar protegido da luz
4. Diluir este tampão para concentração final de 1X com água DEPC

Tampão da Amostra

Reagente	Quantidade
Tampão de Corrida 5X	300 µL
Formamida (50 %)	750 µL
Formaldeído (10 %)	150 µL
Azul de bromofenol (0,4 %)	0,004 g
Água DEPC	300 µL

1. Acrescentar 3 μL do tampão da amostra para cada 1 μL de RNA
2. Acrescentar 1 μL de brometo de etídio (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
3. Incubar as amostras por 15 minutos à 65 °C
4. Transferir para um recipiente contendo gelo
5. Centrifugar rapidamente para recolher o conteúdo no fundo do tubo
6. Manter em gelo até aplicar as amostras no gel

7.3. ELETROFORESE EM SISTEMA CAPILAR

Gustavo Gasparin

Durante décadas, a eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose foi intensamente utilizada como uma das ferramentas mais importantes dos laboratórios de biotecnologia e bioquímica para a análise de macromoléculas. Nos últimos anos, porém, a eletroforese capilar tem apresentado vantagens em relação à técnica de eletroforese em placas. Para a análise simultânea de amostras, instrumentos de eletroforese capilar com arranjo de capilares são os mais utilizados. Existem aparelhos que possuem desde um único capilar, até 384 capilares, possibilitando a maximização do tempo necessário para as mais diferentes análises, desde detecção de resíduos de explosivos e drogas, até testes de paternidade.

A separação das macromoléculas é conduzida em tubos de dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 36 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito. O uso do capilar fornece vantagens sobre as placas de gel devido às razões geométricas, em que há uma elevada relação entre a área superficial e o volume interno, permitindo a dissipação eficiente do calor gerado pela corrente elétrica, e possibilitando a aplicação de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm),

o que resulta em separações de alta eficiência, alto poder de resolução, e reduzido tempo de análise.

Em geral, um aparelho de eletroforese capilar básico consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida), eletrodos (de platina, normalmente), e um detector apropriado. A fonte de alta tensão é aplicada nos eletrodos de platina situados nos reservatórios contendo uma solução eletrolítica apropriada. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios da solução, para completar o contato elétrico. As amostras normalmente são introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos, nos quais uma diferença de potencial é estabelecida entre o capilar e o recipiente que contém a amostra, durante um tempo pré-determinado.

O detector localiza-se em algum ponto do capilar, próximo ao reservatório de saída.

A eletroforese capilar em gel (CGE) é utilizada exclusivamente para separação de macromoléculas, tais como oligonucleotídeos, fragmentos de DNA, e proteínas. Teve início com a aplicação nas separações de DNA por tamanho molecular, utilizando colunas preenchidas com gel, denominados géis químicos: um capilar é tratado com um reagente que estabiliza o gel junto à parede do capilar, através de ligações covalentes. Esse método foi descartado dado o grande número de problemas que surgiram, tais como aparecimento de bolhas (perda de condutividade), introdução limitada de amostra, retenção de fragmentos com alto peso molecular, e degradação do gel por hidrólise. Tais problemas levaram à formulação de novos sistemas, que foram denominados géis físicos.

Géis físicos são matrizes poliméricas hidrofílicas, dissolvidas em tampão apropriado, que não são ligados à parede do capilar, podendo assim ser substituídos

a cada separação, o que permite o aproveitamento do mesmo capilar por centenas de vezes, sem perda de eficiência. A uma dada concentração de polímero, as fitas poliméricas individuais começam a interagir umas com as outras, formando uma estrutura em rede dentro do capilar, possibilitando a separação dos fragmentos de DNA. A concentração polimérica ótima depende do tamanho do DNA a ser separado.

7.4. PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO EM SISTEMA CAPILAR

Antes da injeção no capilar, as amostras são desnaturadas em presença de formamida, para evitar que a formação de estruturas secundárias afete a velocidade de migração. Um padrão de tamanhos conhecidos é aplicado junto com as amostras para permitir a estimativa do tamanho dos fragmentos analisados.

Procedimento:

1. Preparar o MIX de formamida + padrão interno de tamanho de fragmentos: para cada amostra, colocar 8,85 μL de formamida Hi-Di e 0,15 μL de padrão (GS 500 ROX).
2. Aplicar esses 9 μL de MIX em um pocinho da placa de corrida
3. Aplicar 1 μL de produto de PCR da sua amostra por pocinho
4. Desnaturar as amostras (já na placa de corrida) durante 5 minutos à 95°C
5. Colocar as amostras imediatamente no gelo após a desnaturação, permanecendo por 5 minutos.
6. Preparar a injeção das amostras no computador, através do software *Data Collection*