

## Biologia Celular

### AULA PRÁTICA - Isolamento e purificação de biomoléculas: ELECTROFORESE

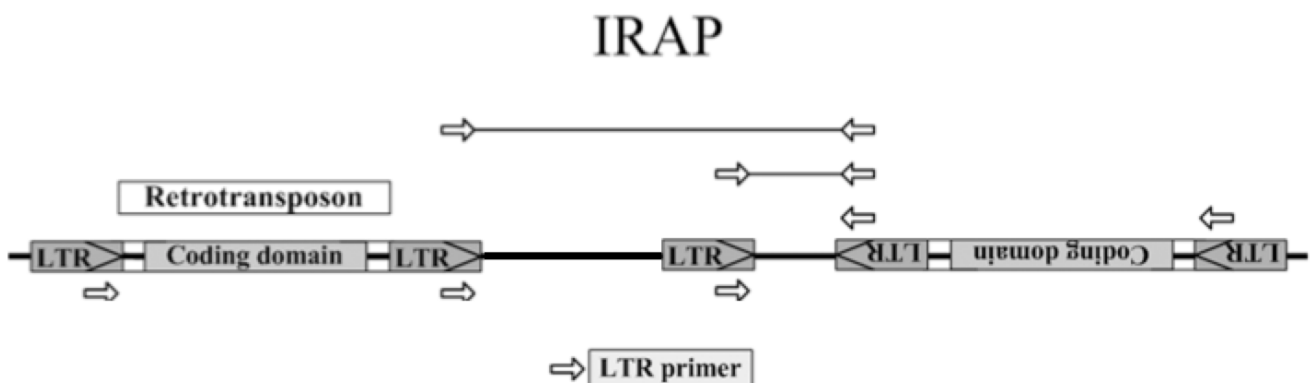
A electroforese é uma das técnicas mais utilizadas em bioquímica e biologia molecular. É usada para separar e purificar macromoléculas - proteínas e ácidos nucleicos – de acordo com a sua dimensão, carga e conformação. Moléculas carregadas são colocados num campo eléctrico, migrando para o polo positivo ou negativo ou de acordo com a sua carga e em função do seu tamanho. Em contraste com proteínas, que podem ter uma carga negativa ou positiva, os ácidos nucleicos têm uma carga negativa uniforme conferida pelos grupos fosfato, migrando para o polo positivo.

A electroforese decorre no interior de uma matriz ou gel submerso num tampão de electroforese que permite o estabelecimento de corrente eléctrica e mantém o pH a um valor relativamente constante. Para a separação de proteínas são utilizados géis de poliácridamida enquanto para ácidos nucleicos são usualmente utilizados géis de agarose.

Nesta aula pretende-se utilizar a técnica de electroforese em gel de agarose para a separação de moléculas de DNA obtidas por uma reacção de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O produto das reacções de PCR contendo a mistura de fragmentos de DNA obtida será colocada num gel de agarose que será seguidamente submetido a uma corrente eléctrica. Durante a electroforese, as diferentes moléculas de DNA migram através dos poros do gel no sentido do eléctrodo positivo devido à sua carga global negativa. Uma vez que moléculas mais pequenas têm mais facilidade de movimentação progredindo mais no gel e moléculas de maiores dimensões progredem mais lentamente, obtém-se no final uma separação da mistura de fragmentos de DNA de acordo com a sua dimensão.

#### 1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Será utilizada uma técnica denominada IRAPs (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphisms*) que envolve a realização de PCR utilizando sequências iniciadoras para retrotransposões. Os retrotransposões são usados como marcadores moleculares devido à sua elevada mobilidade e dispersão nos genomas. Para isso são utilizados primers para as suas extremidades conservadas - *Long Terminal Repeats* (LTRs) que amplificam sequências que lhe são adjacentes. IRAPs são portanto marcadores gerados pela amplificar sequências localizadas entre dois LTRs que se situam suficientemente próximo para permitir a sua amplificação. Esta técnicas tem sido usadas com sucesso na análise genómica de diferentes plantas, permitindo distinguir diferentes espécies e variedades (Kalendar *et al.* 2011).



**Legenda.** Representação da metodologia de IRAP. São utilizadas sequências iniciadoras para LTRs (setas brancas) a apontar 'para fora' da sua extremidade de forma a amplificar sequências de DNA localizadas entre LTRs que se encontram em orientações opostas. Não são amplificadas sequências localizadas entre LTRs que se encontrem na mesma orientação (Adaptado de Bento *et al.* 2008).

## Preparação do PCR:

Cada reação de PCR deve conter os seguintes reagentes:

	Volume
Tampão de PCR 10x	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6
DNA (10 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
dNTP's (0,25 mM)	0,2 $\mu$ l
Sequência iniciadora (100 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ l
Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	11,8
Total	20 $\mu$ l

No entanto, para evitar erros de pipetagem mais prováveis ao pipetar volumes muito pequenos, as reações de PCR serão preparadas a partir de uma 'master mix' previamente preparada que já contém todos os reagentes, incluindo a sequência iniciadora.

- Pipetar 15  $\mu$ l da 'master mix' e adicionar 5  $\mu$ l da solução de DNA que vai funcionar como sequência molde.
- Como controlo negativo será utilizado um tubo apenas com 'master mix' e como controlo positivo serão utilizadas sequências iniciadoras para genes ribossomais.
- Misturar fazendo uma centrifugação muito rápida durante 15 segundos (spin down).
- A reação de PCR decorre no termociclador usando o seguinte programa: desnaturação inicial 94 °C 2 min; 30 ciclos de: desnaturação a 94 °C 30 s, *annealing* partindo de 50 °C 1 min com rampa de + 0,5 °C/s até 72 °C, extensão 72 °C 2 min; extensão final 72 °C 10 min.

## 2. Electroforese de DNA

O equipamento básico para a realização da electroforese consta de dois componentes fundamentais:

- Uma fonte eléctrica, capaz de gerar uma corrente de intensidade e/ou uma diferença de potencial eléctrico constante.
- Uma tina de electroforese onde se coloca o tampão de electroforese e o gel de electroforese. A tina de electroforese tem nos seus extremos dois eléctrodos negativo e positivo.
  - Preparar o molde ou cassette onde vai ser feito o gel colocando o pente que servirá de molde aos "poços" onde será aplicada a amostra de DNA.
  - Misturar 0,5 g de agarose com 50 mL de tampão 1xTAE num balão de Erlenmeyer de 250mL para obter um gel de agarose 1% p/v.
  - Colocar o Erlenmeyer com a suspensão obtida no microondas até ferver (cerca de 1 a 2 minutos). A solução de agarose após fervura é transparente.
  - Deixar arrefecer um pouco, verter com cuidado a solução de agarose no molde previamente preparado e esperar que a agarose solidifique por arrefecimento.
  - Quando a agarose estiver solidificada, retirar cuidadosamente o pente e colocar o gel na tina horizontal de electroforese tendo o cuidado de pôr o lado dos poços mais próximo do eléctrodo negativo.

### Preparação da amostra de DNA para electroforese

- Juntar no tubo de reação de PCR 2  $\mu$ l de 6xLB (*Loading Buffer*). Misturar bem a solução fazendo uma centrifugação rápida durante 15 segundos (spin down).

### Aplicação da amostra no gel e condições de corrida

- Aplicar, com a ajuda da micropipeta, 5  $\mu$ l da amostra de DNA preparada no ponto nº3 num dos poços do gel.

- h. Fechar a tina de electroforese, ligar à fonte de alimentação dos eléctrodos (negativo e positivo). Fazer a corrida de electroforese a voltagem constante 90 V durante 30 minutos.
- i. Desligar a fonte eléctrica e seguidamente abrir a tina de electroforese.

### **Deteccção do DNA no gel de electroforese**

- j. Retirar o gel da tina de electroforese e transferi-lo para um recipiente com uma solução de GelRed, um corante de ácidos nucleicos que emite luz fluorescente vermelha.
- k. Deixar entre 15 a 30 minutos para detectar as bandas de DNA no gel.

#### Soluções:

Tampão de PCR 1X: 20 mM TRIS-HCl, pH8,8, 50 mM KCl, 0,01% Tween-20, 5% glicerol

6xLB (*Loading Buffer*): 0,05% p/v azul de bromofenol, 0,05% p/v xileno cianol FF, 40% p/v sacarose

Solução de GreenSafe Premium: 0.5µg/ml de GreenSafe Premium em 1x tampão TAE

#### Referências:

Kalendar *et al.* 2011. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers *Heredity* 106:520.

Bento M *et al.* 2008. Polyploidization as a Retraction Force in Plant Genome Evolution: Sequence Rearrangements in Triticale. *PLoS ONE* 3: e1402.