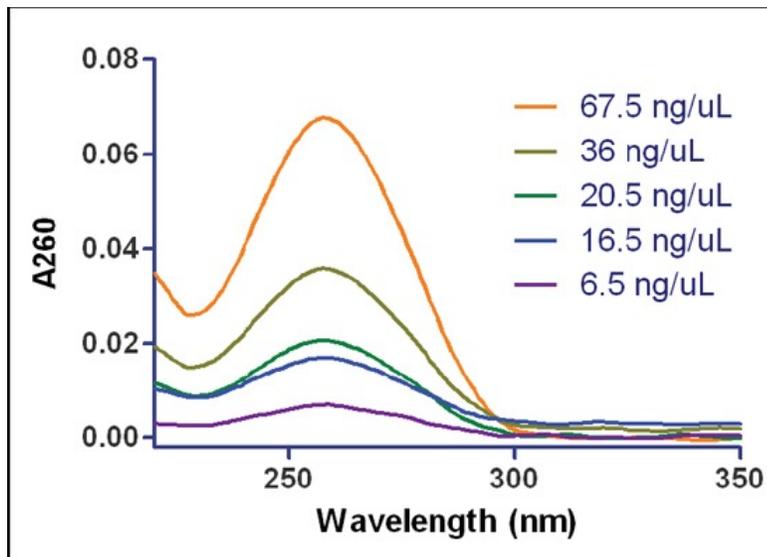


Quantificação de ácidos nucleicos

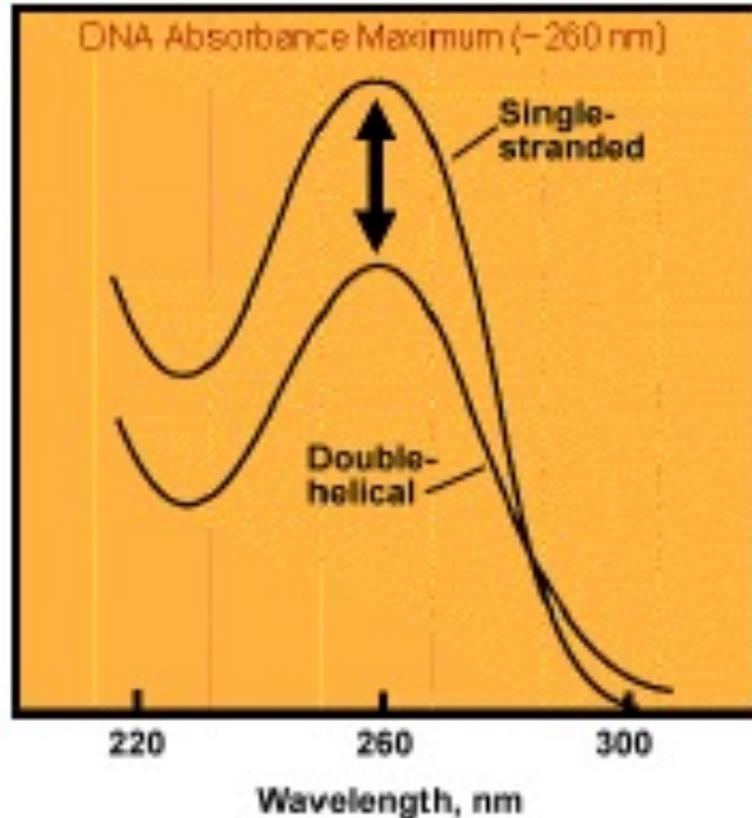


Nanodrop: aparelho que utiliza o princípio da espectrofotometria mas necessita apenas de um pequeno volume de amostra (1-2 μl)

“As bases púricas e pirimídicas dos nucleótidos absorvem luz ultravioleta (UV) na gama de comprimentos de onda compreendidos entre 200 nm e 350 nm, **apresentando um pico de absorção máxima a cerca de 260 nm**. Assim, quanto mais luz for absorvida pela amostra de ácido nucleico, mais elevada será a sua concentração. Usando a Lei de Lambert-Beer é possível relacionar a quantidade de luz absorvida em função da concentração da molécula que absorve essa luz.”



Quantificação de ácidos nucleicos



A absorvência a 260 nm é maior para nucleótidos isolados, intermédia para DNA de cadeia simples (ssDNA), ou RNA, e menor para DNA de cadeia dupla (dsDNA). A absorvência a 260nm é proporcional à quantidade de ácidos nucleicos:

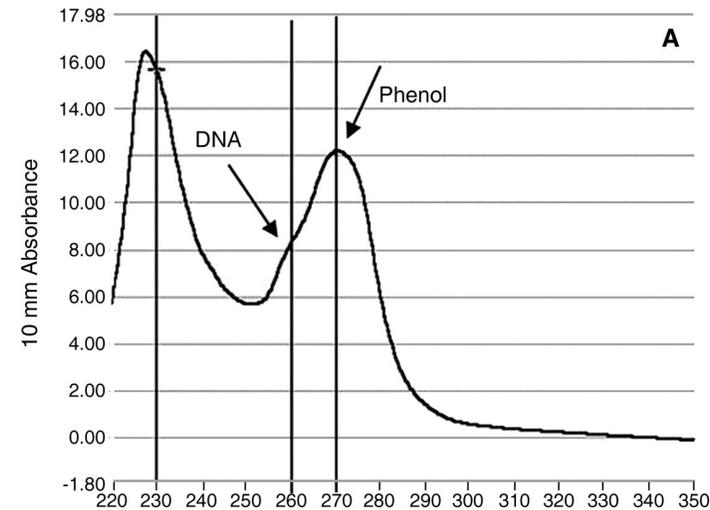
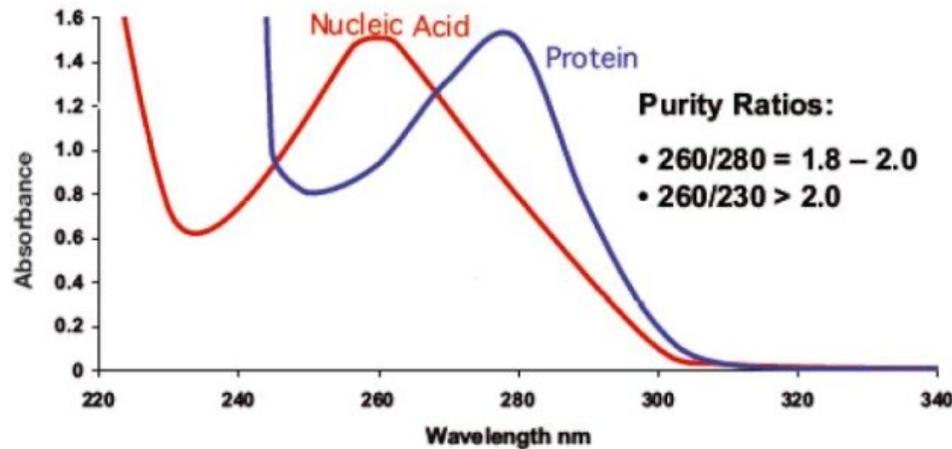
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 33 \mu\text{g/ml ssDNA}$
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 40 \mu\text{g/ml ssRNA}$
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 20 - 30 \mu\text{g/ml oligonucleótido}$

Cálculo das concentrações de DNA e RNA:

- $[\text{DNA } \mu\text{g/ml}] = \text{DO}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{fator de diluição}$
- $[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = \text{OD} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{fator de diluição}$

Quantificação de ácidos nucleicos

As propriedades óticas são usadas não só para detetar e quantificar os ácidos nucleicos, mas também para **avaliar o seu grau de pureza**. Dependendo do protocolo de extração, as preparações podem conter contaminantes tais como proteínas, álcoois, fenóis e sais, capazes de interferir com a quantificação rigorosa das biomoléculas purificadas por sobreposição dos perfis de absorvência.



Importante: cálculo das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}

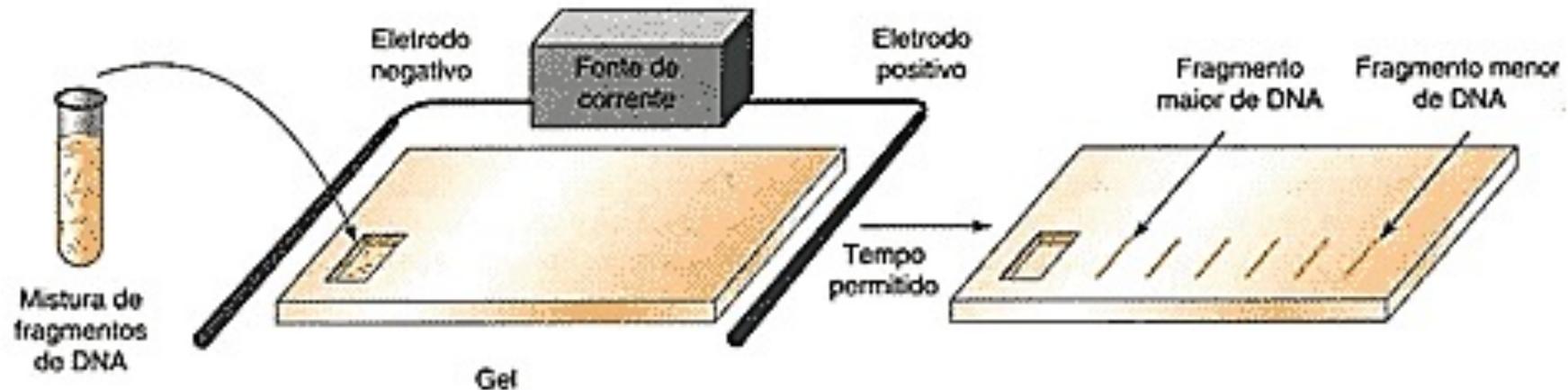
A_{260}/A_{280} deve estar entre 1.8 e 2.0. Se < 1.8 - contaminação com proteínas ou fenóis

A_{260}/A_{230} deve estar entre 2.0 e 2.2. Se < 2.0 - contaminantes que absorvem a 230, ex. EDTA, carboidratos, sais, ureia

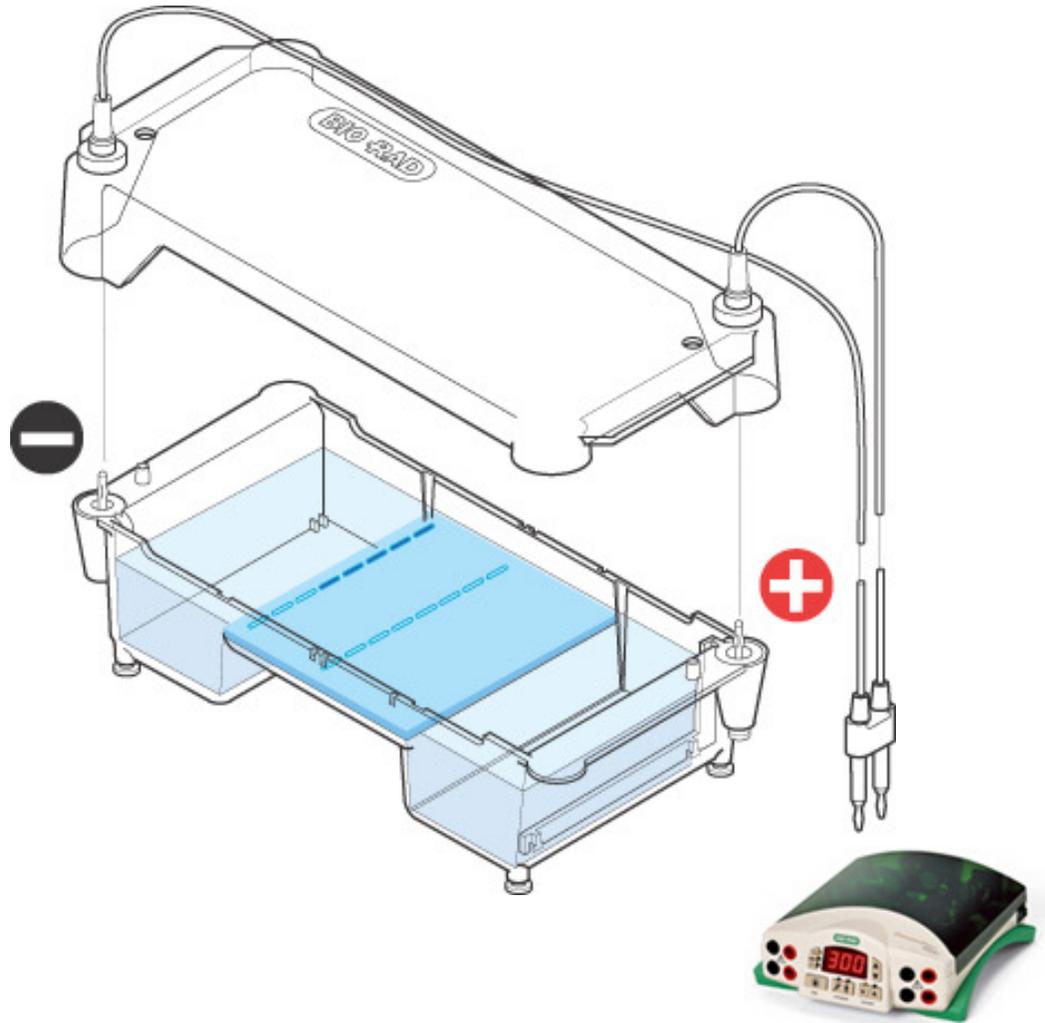
Eletroforese em gel de agarose

Eletroforese na análise de ácidos nucleicos:

“A eletroforese consiste no movimento de partículas carregadas sob a ação de um campo elétrico. Sob a ação de um campo elétrico, os catiões (íons de carga positiva) movem-se para o cátodo (polo negativo), e os aniões (íons de carga negativa) movem-se para o ânodo (polo positivo), com velocidades diferentes. A diferente velocidade de migração está relacionada com a carga e/ou massa molecular das moléculas em análise.”



Eletroforese em gel de agarose

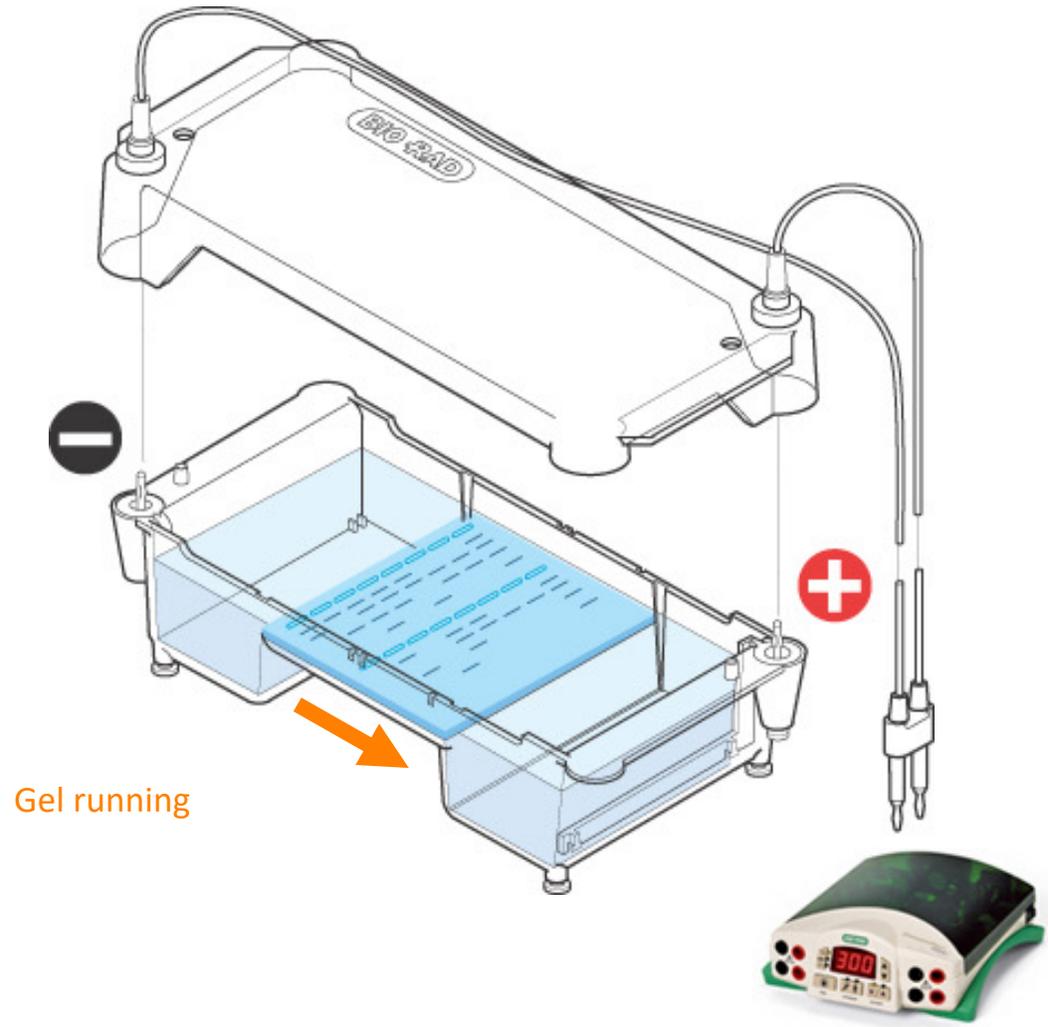


Técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas numa matriz semi-sólida durante a aplicação de uma diferença de potencial.

A eletroforese normalmente é utilizada para separar **proteínas** e moléculas de **DNA** e **RNA**.

As moléculas são separadas de acordo com a sua dimensão; as de menor massa irão migrar mais rapidamente.

Eletroforese em gel de agarose



A agarose é um polissacarídeo:
Usada em concentrações de 0,5 a 2%
Fácil de preparar
Não-tóxico
Ampla capacidade de separação de fragmentos
Baixa resolução

Componentes

*“A migração de moléculas lineares é inversamente proporcional ao logaritmo da sua dimensão. **A mobilidade é influenciada pela massa molecular relativa dos próprios ácidos nucleicos, pela porosidade do gel, pela forma e carga das moléculas.** No entanto, uma vez que as moléculas de DNA têm todas carga elétrica negativa, a migração é limitada pelo **atrito** causado pela malha de agarose”*

Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution(kb = 1000)
0.5%	1 kb to 30 kb
0.7%	800 bp to 12 kb
1.0%	500 bp to 10 kb
1.2%	400 bp to 7 kb
1.5%	200 bp to 3 kb
2.0%	50 bp to 2 kb

Table 1: Correct Agarose Gel Concentration for Resolving DNA Fragments

Componentes

Tampão de eletroforese:

“A mobilidade eletroforética do DNA é afetada pela composição e força iônica do tampão de eletroforese. Na ausência de íons a mobilidade do DNA é nula (ou quase) devido à falta de condutância elétrica. Os dois principais tampões utilizados como eletrólitos durante a eletroforese em gel de agarose são TBE e TAE. “

Tipos de tampões:

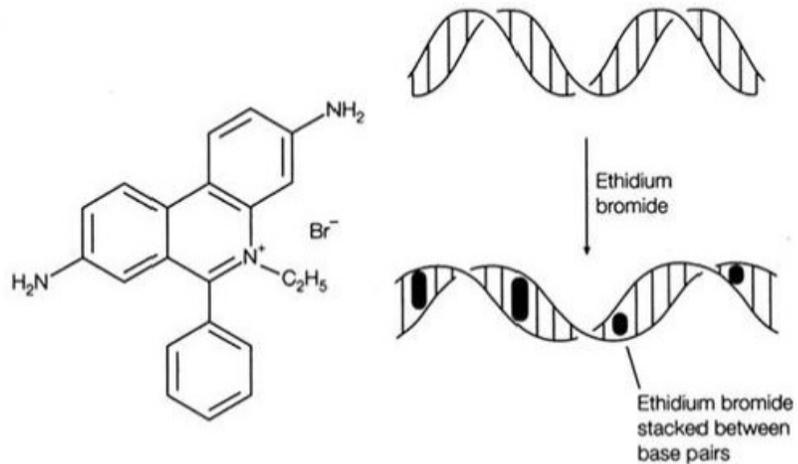
a) TAE (Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer – Tampão de eletroforese-Tris-acetato-EDTA)

b) TBE (Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer – Tampão de eletroforese-Tris-borato-EDTA)

Componentes

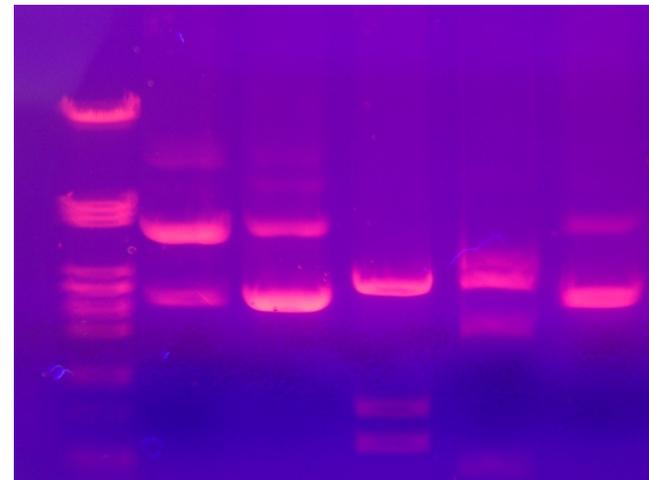
Agentes Intrecalantes:

- brometo de etídio



O corante intercala-se no DNA durante a sua migração no gel, emitindo uma fluorescência vermelho alaranjada após exposição a radiação ultravioleta (254 a 365 nm).

-Gel red
-Sybr green
-Green safe

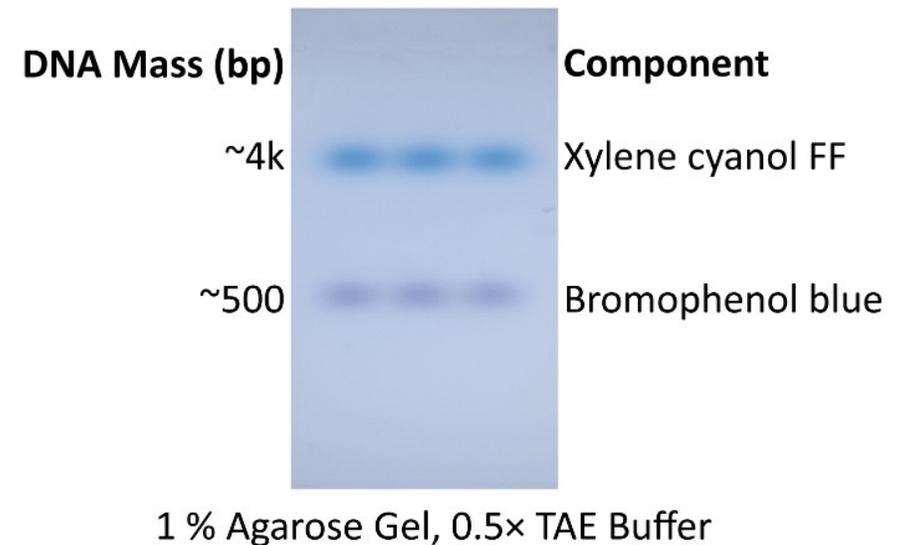


Componentes

Tampão de amostra (*loading buffer*):

Há várias receitas de tampão de amostra. Ex. o tampão de amostra contém sacarose ou glicerol para conferir à amostra uma densidade superior à do tampão de eletroforese – facilita a deposição da amostra no poço. Também contém um corante (ex. azul de bromofenol) para acompanhar a migração das amostras no gel, durante a eletroforese.

Nenhum destes componentes é intercalante, apenas permitem acompanhar a migração eletrofororética



Componentes

Marcador de Massas Moleculares:

É necessário aplicar em um dos poços o marcador de massas moleculares (*ladder*) para proceder à estimativa visual da dimensão dos fragmentos de DNA

O *ladder* é uma mistura de diversos fragmentos de DNA de tamanhos e concentrações conhecidos (atualmente gerados por síntese *in vitro*).

Permite inferir, por comparação, a dimensão dos fragmentos presentes nas amostras em análise.

