

Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese consiste no movimento de partículas carregadas numa matriz sob a ação de um campo elétrico - os catiões (iões de carga positiva) movem-se para o cátodo (pólo negativo), e os aniões (iões de carga negativa) movem-se para o ânodo (pólo positivo). A agarose é um polissacárido que forma um polímero linear originando uma matriz sólida (gel) na qual são aplicadas as amostras (em poços). A mobilidade dos ácidos nucleicos nestes géis 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 carga elétrica negativa, a sua migração é limitada pelo atrito causado pela malha de agarose. Moléculas maiores movem-se mais lentamente do que moléculas mais pequenas.

A visualização dos ácidos nucleicos no gel de agarose é possível devido à adição de um corante que se intercala entre as bases do DNA (ex. GreenSafe, brometo de etídio, GelRed entre outros). Após exposição a radiação ultravioleta (254 a 366 nm), o agente intercalante emite fluorescência permitindo a visualização do DNA.

1. Preparar um gel de agarose a 0,8 % em tampão de eletroforese, num volume final de 50 ml.
2. Fundir a agarose no micro-ondas (cerca de 1 min). Deixar arrefecer até conseguir agarrar no frasco com a mão. Adicionar 1 μ l de GreenSafe, agitar e despejar a solução no suporte (sem fazer bolhas).
3. Colocar o pente de espessura adequada no suporte.
4. Esperar que o gel solidifique.
5. Colocar o suporte com o gel de agarose na tina de eletroforese. Adicionar tampão de corrida até cobrir a superfície do gel.
6. Preparar as amostras:
 - Digestões ou PCR: 10 μ l + 2 μ l tampão de amostra [6x]
 - Plasmídeo não digerido: volume equivalente a 500 ng + 2 μ l tampão de amostra [6x].
7. Aplicar as amostras nos poços.
8. Reservar o primeiro poço para o marcador molecular – 2,5 μ l (já contém tampão de amostra).
9. Ajustar a voltagem para 80 V e deixar migrar até que o Orange G atinja pelo menos o meio do gel.
10. Analisar o gel sob radiação ultravioleta (UV) e proceder a registo fotográfico.
11. Discutir os resultados obtidos.

Notas: O tampão de amostra contém Orange G. O tampão de eletroforese (TAE ou TBE)



permite a condução da corrente elétrica entre os eletrodos e também é importante para manter um estado de ionização constante da amostra durante a separação, pois alterações no valor de pH do meio alteram a carga das moléculas durante a separação.