

A ANÁLISE DE DNA POR ELETROFORESE

Co – autores: Elisete Marcia Corrêa

Patrícia Abrão Possik

Eletroforese de DNA em gel

A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas fundamentais nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. O princípio é baseado no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e conseqüentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo (ânodo). A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso em um dado momento da eletroforese moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz.

O tipo de matriz que é usada (agarose ou poliacrilamida) depende do tamanho dos fragmentos de DNA que se pretende separar e visualizar. Devido à diferença no tamanho dos poros dessas matrizes, utiliza-se normalmente o gel de agarose para a separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1 kb = 1000 pares de bases) e o gel de poliacrilamida para separação de fragmentos pequenos, de até 1kb. Alternativamente para a resolução de fragmentos superiores a 1 kb pode-se utilizar a agarose com baixo ponto de fusão (*Low Melting*) que é um tipo de agarose derivada de síntese orgânica.

Apesar de ser mais efetivo para separar fragmentos pequenos, o gel de poliacrilamida apresenta algumas desvantagens. Entre elas, destaca-se o fato da poliacrilamida em solução, isto é, quando não polimerizada, ser neurotóxica. Assim, a preparação do gel exige certa cautela. Além disso, a preparação é mais laboriosa, requerendo a mistura

de componentes adicionais à poliacrilamida para ajudar na polimerização e mais tempo para que a polimerização ocorra propriamente.

Já o gel de agarose é feito apenas através da mistura de um tampão e agarose, não apresentando toxicidade. A polimerização é mais rápida e o gel pode ser reciclado após o uso, isto é, pode ser reutilizado na elaboração de outros géis. Além disso, a eletroforese em gel de agarose pode ser usada como método analítico ou preparativo, isto é, quando o fragmento de DNA é recuperado e purificado a partir do gel.

Entretanto, dependendo do método utilizado para a visualização do DNA, o gel de agarose pode ser desvantajoso. Frequentemente se utiliza a coloração com brometo de etídio (EtBr), uma substância mutagênica. Em adição, para a visualização do DNA corado com EtBr, é necessária a utilização de transiluminador de luz ultravioleta. Para a utilização de tal aparelho e para a o uso do brometo de etídio, é necessário o cuidado com a biossegurança não somente do manipulador, mas de todos os que compartilham o uso do laboratório.

Se houver a necessidade de separar fragmentos maiores do que 50 kb é necessário utilizar a eletroforese em campo pulsado (*pulse-field gel electrophoresis* – PFGE), que consiste, simplificada, de um gel submetido a uma corrente elétrica que se alterna em direções perpendiculares.

A seguir serão discutidas as quatro etapas necessárias para a realização da eletroforese em gel de agarose, a saber: preparação do gel, aplicação das amostras, corrida eletroforética e a análise e o registro dos resultados.

Preparação do gel:

A agarose, um polissacarídeo extraído de uma alga marinha vermelha e formado por resíduos de D e L galactose unidos por ligações glicosídicas α (1→3) e β (1→4), é um material gelatinoso e semelhante a gelatina incolor. Por isso, para se preparar um gel de agarose procede-se

de modo similar a preparação de uma gelatina. Dissolve-se uma quantidade em gramas do pó de agarose, ajustando-se a concentração apropriada para separar os fragmentos de DNA presentes na amostra (**Tabela 20.1**), em um dado volume de tampão de eletroforese. Os dois tipos de tampão mais utilizados são TAE (Tris-acetato-EDTA) e TBE (Tris-borato-EDTA).

Aquece-se a mistura em forno microondas ou utilizando um bico de *bunsen*, até que a solução fique homogênea e transparente. Aguarda-se a diminuição da temperatura até aproximadamente 50°C e verte-se em uma forma (um tipo de molde específico para o preparo do gel).

Tabela 20.1: Concentrações de agarose indicadas para a resolução dos fragmentos de DNA.

Concentração de agarose (% [w/v])	Faixa de tamanho dos fragmentos de DNA eficientemente separados (kb)
1,0	0,5 – 10,0
1,2	0,4 – 6,0
1,5	0,2 – 3,0
2,0	0,1 – 2,0

Adaptado de Sambrook e Russel (2001).

Sobre a solução ainda morna coloca-se um pente (uma tira de teflon denteada que ficará a 1 mm acima do fundo da forma) que servirá como molde para produzir diversas cavidades (poços) no gel. Essas minúsculas cavidades não chegam a atravessar o gel e servirão como reservatórios onde as amostras de DNA serão aplicadas. Ao esfriar e polimerizar, a agarose fica com o aspecto turvo e com resistência diretamente proporcional à concentração de agarose utilizada.

A seguir, a forma contendo o gel é colocada no interior da cuba de eletroforese horizontal (Figura 20.1). Na cuba o gel encontra-se entre fios de platina que atuam como cátodo e ânodo provocando a passagem de corrente elétrica gerada por uma fonte de eletricidade. Adiciona-se o mesmo tampão usado para fundir a agarose em quantidade suficiente para que o gel fique totalmente imerso tomando-se o cuidado para que o nível de tampão fique pelo menos 1 mm acima do gel. A seguir retira-se cuidadosamente o pente.

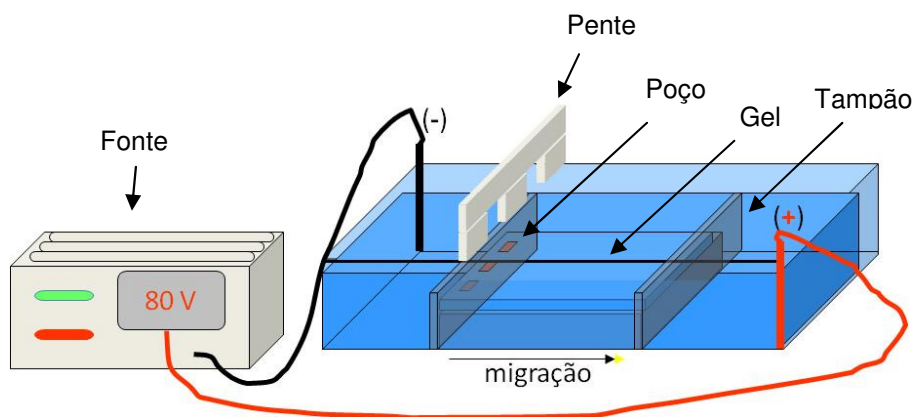


Figura 20.1: Representação esquemática dos equipamentos necessários para a realização da eletroforese em sistema horizontal (cortesia de Adriana Medaglia).

Aplicação das amostras:

Antes da aplicação, as amostras de DNA deverão ser misturadas a um tampão de amostra. O tampão de amostra contém corantes e reagentes de alta densidade (sacarose, glicerol ou ficol). Estes últimos asseguram que a amostra de DNA entre no poço pela força da gravidade. Já os corantes, azul de bromofenol e o xileno cianol, facilitam a aplicação da amostra no gel (acrescentam cor na amostra) e auxiliam no monitoramento da corrida, já que apresentam velocidade conhecida durante a migração na matriz em direção ao pólo positivo. Por exemplo, o

azul de bromofenol migra juntamente com um fragmento de DNA de aproximadamente com 0,3kb e o xileno cianol com um fragmento de 4 kb em géis de agarose de 0,5 a 1,4% em TAE. Há ainda corantes que migram mais rapidamente, como o Amarelo G, que acompanha fragmentos menores que 100pb. Estes corantes podem ser adicionados simultaneamente no tampão de amostra, ou utilizados individualmente, dependendo da disponibilidade e objetivo do experimento.

Para permitir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA de uma dada amostra é necessário aplicar em um dos poços o marcador de massa molecular (*ladder*). O *ladder* é uma mistura de diversos fragmentos de DNA de tamanhos e concentrações conhecidos, gerados a partir da digestão de plasmídeos (tipo de DNA circular presente em bactérias) com enzimas de restrição. Ele permite inferir, por comparação, o tamanho dos fragmentos presentes na amostra analisada.

Existem no mercado diversos tipos de *ladders*, que variam no tamanho dos fragmentos de DNA presentes na solução. Dentre os mais utilizados, destacam-se os marcadores *Ladder 1kb*, que contém 13 fragmentos que vão de 0,3 a aproximadamente 10 kb; e o *Ladder 100bp* que contém 14 fragmentos que variam de 0,1 a 5 kb, com duas bandas de alta intensidade em 1,5 e 2 kb.

Corrida de eletroforese:

Após a aplicação das amostras, encaixa-se a tampa da cuba contendo os cabos que permitirão a conexão entre a cuba e a fonte de corrente contínua.

Para se determinar a voltagem que será utilizada deve-se computar a distância entre os eletrodos e não o comprimento do gel. Geralmente usa-se uma voltagem de 1 a 5 V/cm. Voltagens excessivas ou muito baixas interferem na mobilidade do DNA e causam distorções na migração. Para cubas rotineiramente utilizadas pela maioria dos laboratórios de pesquisa, a voltagem varia entre 50 e 110 V.

Durante a corrida o DNA sairá do poço, penetrará no gel, migrando em direção ao pólo positivo. Com isso os fragmentos serão separados de acordo com o tamanho. Os fragmentos menores migram mais rapidamente que os fragmentos maiores, pois eles apresentam maior facilidade de atravessar os poros da matriz de agarose em direção ao pólo positivo. Enquanto que fragmentos de mesmo tamanho migram praticamente juntos.

No caso da utilização do azul de bromofenol, quando este atingir $\frac{3}{4}$ do gel a corrente pode ser desligada. Entretanto, há variações de acordo com o tamanho do fragmento de DNA de interesse. Se o fragmento for muito grande, aguarda-se a separação dos fragmentos maiores na parte superior do gel e não há tanta preocupação com a parte inferior. Neste caso, o corante pode até sair do gel.

Análise e registro dos resultados:

O método mais usual para se visualizar o DNA em géis de agarose é por coloração com brometo de etídeo (EtBr) de fórmula $C_{21}H_{27}OBrN_3$. Esse corante se intercala entre as bases dos ácidos nucléicos e, na presença de luz Ultra Violeta (entre 260 e 360nm), fluoresce em vermelho alaranjado (590nm). Com este método pode-se detectar uma quantidade igual ou maior que 10 ng de DNA e a intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de DNA presente na amostra. O brometo de etídeo pode ser utilizado de 3 diferentes formas: aplicado diretamente no gel (uso mais frequente), no tampão da amostra a ser aplicada, ou após a corrida quando o gel é submergido em solução de EtBr.

No entanto, não é recomendada a incorporação do brometo de etídeo no gel porque esse corante interfere no padrão de migração das diversas conformações que a molécula de DNA pode assumir. Segundo, e não menos importante, devido à contaminação da vidraria, da cuba e demais utensílios usados na preparação do gel.

Corantes fluorescentes atóxicos são boas opções alternativas (Yung-Sharp e Kumar, 1989) para visualizar o DNA. Alguns exemplos disponíveis no mercado são: o Azul de Metileno (Flores, et al, 1992), que não apresenta potencial mutagênico e não requer luz U.V, embora apresente a desvantagem de ser pouco sensível; o Sybr Safe[®], um corante fluorescente que cora o DNA no gel de agarose e no gel de poliacrilamida exibindo a mesma sensibilidade que o brometo de etídeo e visualizado no transiluminador de luz azul; e o *GelRed* e o *GelGreen* que pelo fato de serem termoestáveis podem ser adicionados antes da homogenização do gel.

Os grupos de moléculas de mesmo tamanho que migram na matriz de agarose assumem a forma do poço e constituem as formas chamadas de bandas de DNA. Após a visualização os resultados geralmente são fotodocumentados. No caso de géis corados com brometo de etídeo, as fotos devem ser adquiridas sob luz ultravioleta. Para tal, utiliza-se filme *Polaroid* (branco e preto) ou um software capaz de transformar em imagem a intensidade relativa de fluorescência emitida pelas bandas de DNA captadas por uma câmera fotográfica digital. Em alguns laboratórios, a fim de minimizar os potenciais efeitos danosos da luz ultravioleta, o gel corado com brometo de etídeo é colocado dentro de uma câmara e a luz U.V só é ligada com a câmara fechada. Uma câmera acoplada registra a foto do gel.

Fatores que influenciam a migração do DNA:

A mobilidade eletroforética do DNA através do gel de agarose é influenciada por vários fatores que serão discutidos a seguir.

a- Tamanho e conformação do DNA

O tamanho dos fragmentos de DNA é o principal fator que influencia a migração em gel de agarose. Pode-se dizer que este seria o fator crítico e alvo da análise.

Uma molécula de DNA migra na matriz de agarose com mobilidade inversamente proporcional ao \log_{10} de sua massa molecular, que, por sua vez, é função do tamanho e da forma da molécula. Assim, o tamanho do fragmento do DNA em pares de base, ou seja, sua sequência linear, é o fator que, em princípio, deveria influenciar a migração no gel. Entretanto, nem sempre o DNA encontra-se linear e descondensado e tais fatores podem alterar a migração do fragmento no gel, pois interferem na passagem da molécula de DNA pelos poros.

As moléculas de DNA circular podem assumir formas como: relaxada (com corte, isto é, *nick*) ou superenovelada (*supercoiled*). Estas formas não migram de acordo com o tamanho do DNA durante a eletroforese, podendo atravessar a malha do gel em velocidades superiores ou inferiores ao padrão.

No entanto, quando estas moléculas circulares são linearizadas, ou seja são clivadas em um ponto e assumem uma forma linear, então a corrida na eletroforese obedece ao tamanho da molécula. Sob algumas condições, a forma circular superenovada migra mais rapidamente que a forma linear; e sob outras condições acontece o inverso.

Outro exemplo é o DNA genômico, pois sua estrutura condensada e complexa não permite que os fragmentos migrem de acordo com o tamanho em pares de base e sim, fiquem presos nos poros do gel devido à sua estrutura densa e irregular que não permite que os fragmentos atravessem.

Assim, a mobilidade das formas do DNA no gel não depende somente do tamanho da molécula, mas da densidade, torção do DNA e de outros fatores que serão discutidos a seguir.

b- Concentração de agarose

A concentração da agarose desempenha papel importante na separação eletroforética, pois determina a porosidade do gel, que por sua vez, influencia diretamente na capacidade de migração das moléculas de DNA. Portanto, o tamanho dos poros desta matriz é inversamente proporcional à concentração de agarose utilizada e diretamente proporcional ao tamanho dos fragmentos de DNA que se deseja separar.

Vale ressaltar que a agarose, apesar de apresentar um custo elevado, pode ser reciclada e reutilizada em eletroforese analítica. Para isso é necessário descontaminá-la dos resíduos de brometo de etídio, equilibrá-la em água, desidratá-la e transformá-la novamente em pó (Reiniger et al, 2004).

c- Presença do brometo de etídeo no gel

A mobilidade dos fragmentos de DNA é influenciada pela presença do brometo de etídeo. O fato desse agente se intercalar entre os pares de bases provoca mudanças na conformação e na flexibilidade da molécula de DNA. Na ausência de brometo as moléculas circulares superenoveladas (forma I) migram mais rápido do que as moléculas lineares (forma III) de mesma massa molecular. Já as moléculas circulares relaxadas (forma II) migram mais lentamente do que as outras duas isoformas topológicas.

Na presença de EtBr os superenovelamentos negativos (geralmente encontrados no DNA de procarioto) são gradualmente removidos, causando a diminuição na mobilidade do DNA. Porém, altas concentrações de brometo acarretam na formação de superenovelamento positivo e conseqüente aumento da mobilidade das moléculas. Além disso, a corrida da forma linear é reduzida em cerca de 15% quando comparada a migração da mesma molécula na ausência do agente intercalante.

Assim, dependendo do objetivo do experimento o uso de altas concentrações do brometo de etídeo é uma estratégia que permite separar a forma circular superenovelada das formas circular relaxada e linear.

d- Voltagem e tipo de tampão de eletroforese aplicada

A corrente elétrica, a composição e a força iônica do tampão influenciam na migração do DNA. Em uma faixa de baixa voltagem, a taxa de migração de fragmentos de DNA linear é proporcional à voltagem aplicada. Entretanto, o aumento de voltagem faz com que a linearidade seja perdida. Desta forma, os grandes fragmentos de DNA migram mais rápido do que os pequenos havendo formação de “rastros” que refletem a má resolução dos fragmentos.

Em baixa força iônica, a migração é lenta e em alta força iônica há uma super condutividade elétrica que gera calor e pode derreter o gel dentro da cuba além de desnaturar o DNA.

Os tampões mais utilizados em eletroforese de DNA são o TAE (Tris-acetato-EDTA) e o TBE (Tris-borato-EDTA), ambos compostos pelo elemento tamponante, o Tris ou (hidroximetil) aminometano. Ressalta-se que o Acetato (ácido acético) ou Borato (ácido bórico) são utilizados para ajustar o valor de pH da solução e atuam como eletrólitos para a manutenção da corrente. Enquanto que o EDTA (ácido etienodiamino tetracético) presente em ambos os tampões serve como um agente quelante que sequestra íons de magnésio entre outros. Isto é particularmente interessante para proteger o DNA via inibição de nucleases que dependem da presença de magnésio para degradar o DNA.

A seleção dos tampões de eletroforese TAE ou TBE depende do objetivo do experimento. O TAE possui a menor capacidade tamponante, no entanto, apresenta maior poder de resolução para moléculas grandes de DNA quando comparado ao TPE (Tris fosfato EDTA) ou TBE. Por sua vez o tampão TBE é preferido para a separação de

moléculas pequenas de DNA, menores do que 1 kb, e para longas corridas devido a sua maior capacidade tamponante. No caso do DNA ser posteriormente recuperado do gel e utilizado, por exemplo, em um experimento de clonagem, prefere-se o uso de TAE, pois o Borato presente no TBE é um potente inibidor de várias enzimas.

Interpretando o resultado de uma eletroforese em gel de agarose no diagnóstico da anemia falciforme

Uma das análises que pode ser feita por eletroforese em gel de agarose é o diagnóstico da mutação que deu origem à Anemia Falciforme. Esta mutação pontual no gene da globina beta da hemoglobina (substituição de uma Adenina por uma Timina na 20ª posição da sequência de nucleotídeos) elimina o ponto de restrição da enzima *Dde I*.

É necessário lembrar que a visualização do DNA através da eletroforese é o último passo que é realizado para a análise em questão. Assim as etapas que precedem a eletroforese são:

- a- Extração do DNA genômico.
- b- Amplificação de uma região de 381 pb do gene da beta globina que contém a região da mutação.
- c- Incubação com a enzima de restrição *Dde I* que reconhece o sítio C/TNAG (N = qualquer um dos quatros nucleotídeos).

Como resultado são gerados perfis de fragmentos de DNA que permitem o reconhecimento do genótipo homozigoto normal ($\beta^A \beta^A$), do heterozigoto e do homozigoto carregando cópias do alelo mutado ($\beta^A \beta^S$ e $\beta^S \beta^S$). Em outras palavras, o fragmento de DNA contendo 1 sítio de restrição resultará em 2 novos fragmentos devido à clivagem. Já na presença da mutação a enzima não reconhecerá o sítio de restrição e não cortará o fragmento (Figura 20.2).

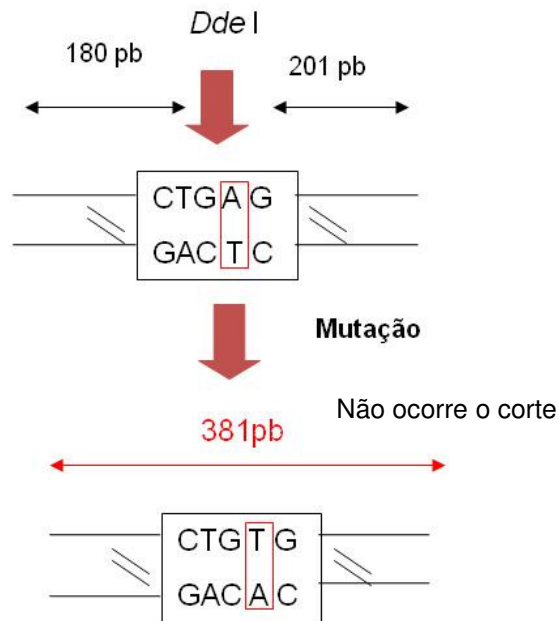


Figura 20.2: Uso da enzima de restrição *Dde* I no diagnóstico da Anemia Falciforme. Observar que a substituição da adenina pela timina elimina o sítio de clivagem da enzima.

Assim, o indivíduo homocigoto para o alelo normal apresentará duas bandas no gel de agarose, devido à clivagem do gene pela enzima *Dde* I. O indivíduo homocigoto para o alelo mutante, por outro lado, apresentará apenas uma banda correspondente ao fragmento não clivado por *Dde* I devido à presença da mutação. Finalmente, o indivíduo heterocigoto, isto é, que carrega um alelo normal e um alelo mutante, apresentará três bandas no gel: uma correspondente ao alelo mutado não clivado, e duas correspondentes ao alelo normal clivado (Figura 20.3).

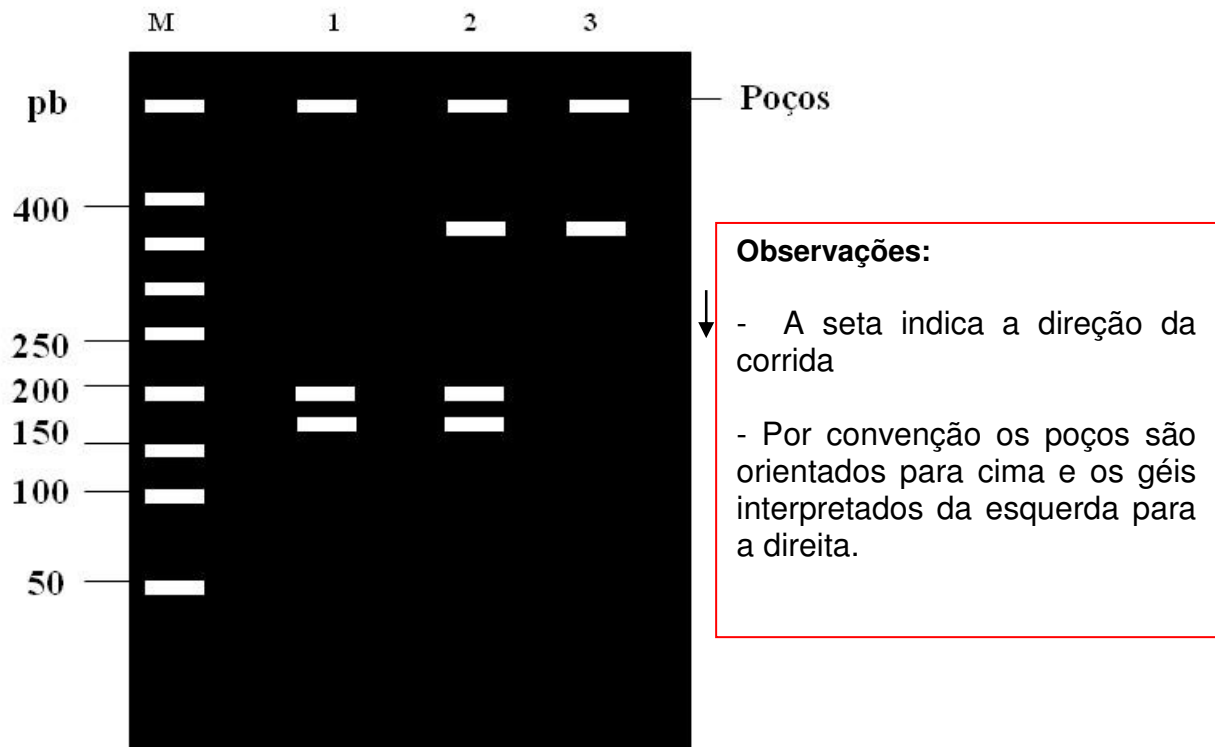


Figura 20.3: Análise de restrição do produto amplificado de 381pb do gene da β -globina. Representação esquemática de um gel de agarose mostrando em (M) marcador de massa molecular; (1) indivíduo homocigoto dominante para o alelo normal (presença de dois fragmentos um de 201pb e o outro de 180pb); (2) indivíduo heterocigoto (alelo normal = banda de 201pb e 180pb; e o alelo mutado = banda de 381pb); (3) indivíduo homocigoto recessivo (ambos os alelos carregam a mutação que elimina o sítio de restrição (banda de 381pb).

ANEXO

Composição do tampão de eletroforese para DNA (concentração da solução estoque por litro). Adaptado de Sambrook e Russel (2001).

TAE 50X

242 g de Tris Base
57,1 mL de ácido acético glacial
100 mL de 0,5 M EDTA* (pH 8,0). *Ajustar o pH da solução de EDTA com NaOH
Armazenar a temperatura ambiente

TBE 10 X

107,8g de Tris base
7,44 g de EDTA (Na₂EDTA.2H₂O)
Aproximadamente 55,0 g de ácido bórico anidro
Adicionar lentamente o ácido bórico até alcançar o valor de pH igual a 8,3
Armazenar a temperatura ambiente

TPE 10X

40 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0)
15,5 mL ácido fosfórico 85 %
108 g de Tris Base
Armazenar a temperatura ambiente

Composição do tampão da amostra para DNA (*loading buffer* 6X):
Adaptado de Sambrook e Russel (2001).

Azul de bromofenol 0,25%
Xileno cianol FF 0,25%
Glicerol 30%
Armazenar em aliquotas de 1 mL à 4°C

Referências Bibliográficas

Flores, N. et al. Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. **Biotechniques**, n. 13, p. 203-205, 1992.

Reiniger et al. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. **Ciência Rural**, v. 34, n.5, set-out, 2004.

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**: A Laboratory Manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Yung-Sharp, D; Kumar, R. Protocols for the visualisation of DNA in electrophoretic gels by a safe and inexpensive alternative to ethidium bromide. **Technique**, v. 1, n **3**, p. 183-187, 1989.