

DESENVOLVIMENTO DE UM MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE BAIXO CUSTO PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

HENSE, Jéssica Damé¹, JASKULSKI, Itiane Barcellos²; PIENIZ, Simone³; SCHNEIDER, Augusto⁴; BARROS, Carlos Castilho⁵; SILVA, Evelise Sampaio da⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – jeeh.hense@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – barrosccpel@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – evelise_sampaio@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Um grande desafio nas análises a nível molecular é a separação de uma molécula de outras presentes em uma mesma amostra. Diversas técnicas podem ser usadas para fazer esta separação, assim como algumas análises acopladas. Dentre estas técnicas destaca-se a eletroforese.

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica que permite a separação de frações de biopolímeros tais como ácidos nucleicos de acordo com seu peso molecular e sua carga elétrica, moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (JIMENEZ *et al.*, 2016). O princípio da eletroforese utilizada para separação de fragmentos de DNA, por exemplo, baseia-se na carga total negativa da molécula (dada pelos oxigênios do grupamento fosfato). Assim, fragmentos de DNA obtidos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), podem ser separados pela aplicação de uma voltagem (WATSON *et al.*, 2014).

A mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA é inversamente proporcional ao tamanho da molécula. Géis de poliacrilamida são utilizados para separar fragmentos contendo até 1.000 pares de bases, ao passo que géis mais porosos, feitos com agarose, são utilizados para resolver misturas de fragmentos com tamanhos maiores (ZAHA *et al.*, 2014).

A distância que o fragmento percorre a partir do ponto de aplicação, é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorrem no mesmo gel. Esses outros fragmentos são os marcadores de peso molecular, misturas de segmentos de DNA de tamanhos variáveis e equidistantes entre si, e que são aplicados em um poço no gel no início do processo (MOREIRA, 2012). Marcadores de peso molecular (ou do inglês, *Ladder*) são vendidos comercialmente, porém, com alto custo, como a maioria dos reagentes utilizados em técnicas de biologia molecular.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um marcador de peso molecular para identificação de frações de ácidos nucleicos a partir de amostras e de reagentes que já são utilizados no laboratório, tornando-o de baixo custo.

2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do marcador de peso molecular foi realizada a técnica de PCR, utilizando reagentes e amostras de DNA já existentes no laboratório. Para a obtenção dos fragmentos, foram utilizados primers que amplificam seqüências dos genes *PON3*, que codifica para paraoxonase 3 (SCHNEIDER *et al.* 2013), *Lep*, que codifica para a Leptina (ELLET *et al.*, 2009)

e *ACTN3*, que codifica para α -actinina-3 (ARANALDE *et al.*, 2016). Os conjuntos de primers utilizados (Tabela 1) geraram produtos de PCR dos tamanhos de 94pb, 191pb, 314pb, 413pb e 690pb.

Foram preparadas reações para um volume final de 50 μ L contendo 23 μ L de GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI USA), 2 μ L de DNA *template*; 19 μ L de água ultra pura (*milli-q*) e 3 μ L de cada primer da *Lep* para a amplificação do fragmento de 191 pb; de 3 μ L dos primers de *PON3* para a obtenção de fragmento de 94pb. Em um termociclador (*Amplitherm*), os amplicons foram gerados de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial à 95°C durante 5 min e 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 30s, anelamento à 60°C por 1 min e extensão à 72 °C durante 1 min; e extensão final à 72°C por 5 min. Para a amplificação dos fragmentos do gene *ACTN3* as reações foram preparadas de forma semelhante, diferindo apenas no volume de DNA *template* que (5 μ L) e na temperatura de anelamento dos primers (68°C).

Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, em fotodocumentador com transluminação ultravioleta após coloração com Syber Safe (*Invitrogen*®). Após todas as amplificações, todos os produtos das reações foram misturados e aliquotados para a posterior utilização.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados e tamanhos dos produtos da amplificação em pares de base (pb).

Gene	Primers	Sequência 5' – 3'	Produto
<i>PON3</i>	PON3 - F	ACTGTTGATCCTGACACGGGAGA	94
	PON3 - R	GCGTTCGCGGATGCGAAGTGC	
<i>Lep</i>	RFLP-F	TGAGTTTGTCCAAGATGGACC	191
	RFLP-R	GCCATCCAGGCTCTCTGG	
<i>ACTN3</i>	hACTN3 - tif	CAACACTGCCCCGAGGCTGACTG	318
	hACTN3 - r	GGGTGATGTAGGGATTGGTGGAG	
	hACTN3 - cir	TGATGGCACCTCGCTCTCGG	413
	hACTN3 - f	CGCCCTTCAACAACTGGCTGGA	
	hACRN3 - f	CGCCCTTCAACAACTGGCTGGA	690
	hACTN3 - r	GGGTGATGTAGGGATTGGTGGAG	

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos amplificados foram visualizados após a aplicação de 10 μ L de cada em gel de agarose 1% (Figura 1A). Estes primers foram escolhidos por produzirem produtos de tamanhos variados e próximos aos de outros fragmentos de DNA que normalmente analisamos em nosso laboratório. Além disso, os primers usados nesse trabalho mostraram grande eficiência na amplificação de seus produtos na PCR. Como cada reação gera um produto diferente, foi necessário equilibrar os volumes adicionados para formar um marcador final que apresentasse bandas com intensidades próximas quando visualizadas após a eletroforese (Figura 1).

O marcador desenvolvido neste trabalho permite a análise de fragmentos com tamanhos que variam entre 90pb e 700pb. Quando comparado ao *Ladder* comercial (Figura 1B), pode-se notar a possibilidade da utilização desse marcador

em diversos estudos que buscam a identificação de frações de ácidos nucleicos, principalmente DNA.

O custo na confecção do marcador padronizado é baixo, quando comparado ao necessário para a aquisição de outros produzidos por empresas. Em laboratórios que utilizam a PCR com frequência, essa é uma excelente alternativa, visto que há apenas a necessidade de preparar reações extras.

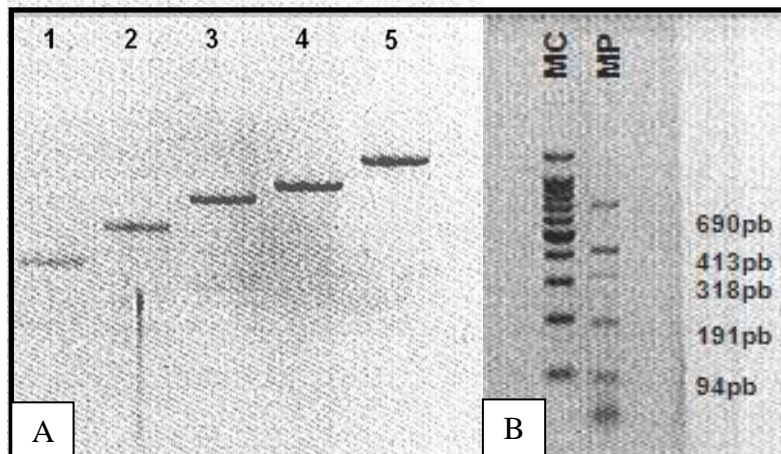


Figura 1: Fotodocumentação de gel de agarose 1% em luz UV. A) Amostras de produtos da PCR. (1 - *PON3*, 94pb; 2- *Lep*, 191pb; 3- *ACNT3*, 318pb; 4-*ACTN3* de 413pb; e 5 - *ACTN3* de 690pb). B) Comparação entre os marcadores de peso molecular comercial *100bp DNA Ladder* (PROMEGA) e o padronizado pelo laboratório (MP).

Nosso resultado leva ao desenvolvimento inovador de um marcador padrão útil e acessível a todos pesquisadores, através de um método simples que é a PCR. O impacto sobre o orçamento global de um projeto desenvolvido em laboratório de biologia molecular pode ser considerável, de acordo com a produtividade do mesmo, sendo assim esse trabalho visa disponibilizar essa possibilidade aos demais pesquisadores.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho gerou, com sucesso, um marcador de peso molecular de baixo custo capaz de identificar fragmentos de ácidos nucleicos que variam de 90 à 700 pares de bases, aproximadamente. Esse produto pode ser usado em qualquer laboratório de biologia molecular que trabalhe com sequências que apresentem tamanhos dentro dessa faixa de abrangência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANALDE L. C. R., PEDERZOLI B. S., MARTEN T., BARROS F.C., BASSO R. P., JUSSARA M. SILVEIRA J. M., SANDRA C. VALLE S. C., SIMONE PIENIZ S., RONALDO C. ARAUJO R. C., PAREDES-GAMERO E. J., SCHADOCK I., SCHNEIDER A., BARROS C.C. The *ACTN3* R577X polymorphism affects the lipid profile and the prognosis of nutritional intervention in HIV-positive patients. **Nutrition Research**, v. 36, n. 6, p. 564-574, 2016.

ELLETT, J.D., EVANS, Z. P., ZHANG, G., CHAVIN, K. D., SPYROPOULOS, D. D. A rapid PCR-based method for the identification of ob mutant mice. **Obesity**. v. 17, n. 2, p. 402-404, 2009.

JIMENEZ, M. S., LUQUE-ALLED, J. M., GOMEZ, T., CASTILLO, J. R. Evaluation of agarose gel electrophoresis for characterization of silver nanoparticles in industrial products. **Electrophoresis**, v. 37, p. 1376–1383, 2016.

MOREIRA, S. **DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA ORIGINAL SIMPLIFICADO PARA A ANÁLISE DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO GENE IL28B**. 2012. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, UNIVILLE.

SCHNEIDER, A., ABSALON-MEDINA, V. A., ESPOSITO, G., CORRÊA, M. N., BUTLER, W. R. (2013). Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 Expression in Granulosa Cells and PON1 Activity in Follicular Fluid of Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 6, p. 989-994, 2013.

WATSON, J. D., BAKER, T. A., GANN, A., LEVINE, M., LOSICK, R., BELL, S. P., HARRISON, S. C. **Molecular Biology of the Gene**. New York, 2013 p. 148, Cap. 7.

ZAHA A., BUNSELMEYER H. F., PASSAGLIA L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. Brasil, 2014, 2 v.