

## Eletroforese de DNA: Dos Laboratórios de Biologia Molecular para as Salas de Aula

**Fernanda Romanholi Pinhati**

Este trabalho visa apresentar um protocolo para montagem e execução de um sistema eletroforético em sala de aula. O sistema é elaborado a partir de materiais e reagentes alternativos, baratos e de fácil aquisição em substituição aos principais componentes utilizados em laboratórios de biologia molecular. Dentre os materiais sugeridos, estão pote de plástico, manteigueira, pente, fios de cobre e aço, fonte de impressora, bicarbonato de sódio, corante comestível e amido de milho. Por meio dessa prática, o professor pode propor aos alunos atividades em que eles podem participar tanto da confecção do sistema, quanto da aplicação prática de uma eletroforese de DNA de banana previamente extraído. No decorrer dessa atividade, professor e alunos têm a chance de discutir conceitos importantes de química, física e biologia.

► DNA, eletroforese, gel de amido de milho ◀

Recebido em 22/10/2013, aceito em 27/11/2014

316

Os métodos de manipulação dos ácidos nucleicos baseiam-se em suas propriedades intrínsecas, ou seja, o fato de serem naturalmente carregados negativamente devido à presença dos grupos fosfatos (Campbell; Farrell, 2007).

A carga e o tamanho são as duas propriedades moleculares dos ácidos nucleicos frequentemente utilizadas na detecção e separação. Uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular é a eletroforese em gel, que emprega essas duas propriedades. A eletroforese baseia-se na movimentação das partículas carregadas em um campo elétrico em função da razão entre sua carga e sua massa. Assim, quando uma amostra for aplicada em um suporte (gel), uma corrente elétrica passará por esse meio e induzirá a separação. Os ácidos nucleicos possuem carga negativa em pH neutro e, quando colocados em um campo elétrico entre eletrodos, migrarão em direção ao eletrodo positivo. Os fragmentos de ácido nucleicos menores deslocam-se mais que os maiores em uma separação eletroforética (Campbell; Farrell, 2007).

Em sua maioria, as separações são realizadas com um gel de agarose submerso por tampão em uma câmara. A agarose, comumente utilizada para confeccionar o gel, é extraída de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas que consiste em uma mistura heterogênea de dois polissacarídeos: agarose e agarpectina (Lee et al., 2012). No entanto, devido ao seu custo elevado, inviabiliza

muitas vezes a realização dessa prática em sala de aula. Alguns trabalhos optaram por utilizar o amido de milho em substituição à agarose. O amido de milho é um material barato, de fácil localização e aquisição, o que tornaria viável o experimento (Martinez et al., 2008). Entretanto, os trabalhos ainda se mantêm presos a reagentes específicos de biologia molecular, que mesmo sendo de baixo custo em relação à agarose, não atendem às dificuldades a que muitas escolas são submetidas, de modo que a sugestão de reagentes baratos é fundamental.

O objetivo deste trabalho é desenvolver um sistema de eletroforese utilizando materiais de fácil aquisição, que possa ser praticado em salas de aula da 3ª série do ensino médio e promover a interdisciplinaridade do tema, visto que o experimento aborda conceitos de biologia, química e física. Os alunos podem participar desde a montagem do sistema até o seu funcionamento, sempre sob supervisão do professor, visando garantir a integridade física dos alunos.

### Materiais e métodos

#### Montagem da cuba eletroforética

Materiais necessários: pote de plástico (24,0 x 16,0 x 3,5cm), manteigueira (17,0 x 9,0 x 2,0cm), 2 fios de cobre (6,0cm), 2 fios de aço (14 cm), 1 pente, cola epóxi, fonte e 2 presilhas tipo jacaré (Figura 1).



Figura 1: Materiais necessários para a montagem de um sistema de eletroforese: pote de plástico, fios de cobre e aço, manteigueira, pente, fonte e presilhas tipo jacaré.

Os fios de cobre e aço devem ser cortados com auxílio de um alicate. Pressionando-se o fio de cobre contra o canto superior e inferior de um dos lados do pote, deve-se fixá-lo na base de plástico, não deixando que o fio perfure totalmente o pote. Aplica-se a cola epóxi na base do fio de cobre e prende-se o fio de aço em torno do fio de cobre na extremidade mais próxima à base (Figura 2). Os eletrodos também podem ser formados apenas por fios de cobre ou de aço dobrados em L, sendo necessário no mínimo 20 cm destes para cada eletrodo. O pente pode ser de um modelo convencional, de hastes arredondadas. Deve-se cortar o cabo do pente e, em seguida, marcar quais das hastes devem ser removidas para permitir o encaixe nas bordas da manteigueira. Outra opção de pente é utilizar a lateral da tampa da manteigueira. Tal como foi realizado com o pente convencional, deve-se moldar a lateral da tampa da manteigueira, tomando-se esta como referência, e recortar os dentes (Figura 3).



Figura 2: Ilustração mostrando como os fios de cobre e de aço podem ser presos ao pote de plástico.



Figura 3: Imagens do pente convencional e da lateral da manteigueira recortados para formar os pentes que permitirão a formação dos poços no gel de amido.

### Preparação de gel e solução tampão

Material necessário: borato de sódio ( $\text{NaBO}_3$ ) ou bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), amido de milho, água, 2 copos descartáveis, copo medidor, frasco de vidro ou plástico (500 mL), béquer de 250 mL ou panela comum, suporte, grade e bico de Bunsen ou fogão a gás, colher ou bastão de vidro.

Preparo da solução tampão: pesar 0,34g de borato de sódio ou 3,48g de bicarbonato de sódio em copo descartável. Com auxílio de copo medidor, medir 500 mL de água e solubilizar o sal. Transferir a solução para frasco de vidro ou garrafa descartável.

Preparo do gel: pesar 28g de amido de milho em copo descartável e acrescentar 150 mL do tampão borato ou tampão bicarbonato de sódio em um béquer de 250 mL. Com auxílio de um suporte e uma grade para bico de Bunsen ou utilizando a panela e o fogão a gás, prepara-se o gel, mexendo a mistura vagarosamente com o auxílio do bastão de vidro até que adquira uma consistência firme. O gel deve ser vertido sobre o pano do tipo multiuso que cobre a manteigueira. Finalmente, deve-se encaixar o pente sobre o gel para criar os poços (Figura 4). O gel deve ser levado à geladeira por 2 h para que adquira uma consistência firme.



Figura 4: Disposição do gel: este deve ser aplicado sobre o pano do tipo multiuso que forra a manteigueira e, em seguida, deve-se aplicar o pente.

### Preparação da amostra e aplicação no gel

Extração do DNA de banana: o DNA de banana foi extraído conforme descrito por Rodrigues et al. (2008).

Material necessário: corante comestível, seringa descartável (1 mL), copo descartável (50 mL), palito de madeira.

No copo descartável, deve-se acrescentar 2 gotas de tampão, 1 gota do corante e uma pequena quantidade do DNA de banana, seguido de homogeneização com auxílio do palito de madeira. Diferentes amostras podem ser preparadas, caso sejam utilizados corantes de diferentes cores. Após a solidificação do gel, o pente deve ser retirado cuidadosamente. O gel deve ser retirado diligentemente da manteigueira e transferido junto com o pano do tipo multiuso para o pote de plástico. O pano deve ficar em contato com os fios de aço. Em seguida, 3 ou 4 gotas da amostra previamente preparada (DNA + tampão + corante) devem ser aplicadas no gel com o auxílio da seringa.

### Corrida eletroforética

Após a aplicação da amostra no gel, cuidadosamente 100 mL da solução tampão deve ser vertida no pote de plástico. É importante que o tampão cubra completamente os fios de aço, mas não deve ultrapassar a altura do gel, para que não remova o material de dentro dos poços. As presilhas tipo jacaré devem ser presas ao fio de cobre, de modo que o fio correspondente ao polo negativo deva ser conectado ao fio de cobre mais próximo do material genético e o fio correspondente ao polo positivo, na extremidade mais distante do material genético (Figura 5).

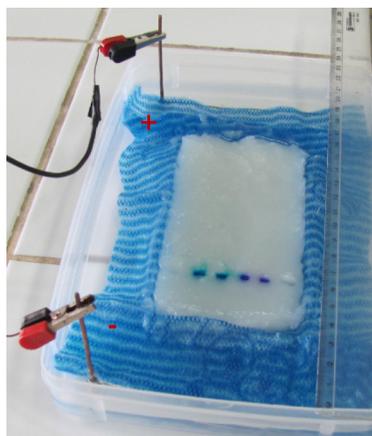


Figura 5: O uso das presilhas jacaré: conforme instrução no verso da fonte, o fio correspondente ao polo negativo deverá ser conectado ao fio de cobre mais próximo do material genético e o fio correspondente ao polo positivo, na extremidade mais distante do material genético.

### Resultados e discussão

O sistema de eletroforese proposto é composto de materiais de fácil aquisição, baratos e muito utilizado nas cozinhas convencionais. Os materiais fazem alusão aos equipamentos originais utilizados nos laboratórios de biologia molecular. A cuba eletroforética foi substituída pelo pote de plástico, cujos eletrodos, que conduzem a corrente, foram fixados. A manteigueira faz o papel do suporte que enforma o gel. O pente tem a função de formar os poços no gel, onde devem ser aplicadas as amostras.

Em relação aos reagentes, a agarose, substância que se torna gelatinosa com o aquecimento e firme após o resfriamento, comumente utilizada nos laboratórios de biologia molecular, foi substituída pelo amido de milho. O amido é de fácil aquisição e simulou o papel proposto pela agarose, que seria formar uma rede para prender as moléculas em razão de sua carga/massa. Outra vantagem do amido é a possibilidade de reutilização do gel. Após a corrida eletroforética, descartou-se apenas a região do gel em que houve deposição dos corantes, todo o restante foi novamente aquecido, acrescido de mais tampão e amido e vertido na manteigueira para reutilização. Em testes, o gel foi reutilizado por quatro vezes sem prejudicar os resultados.

O tampão comumente utilizado é o borato de sódio que,

segundo alguns trabalhos, é encontrado em farmácia de manipulação (Martinez et al., 2008). Entretanto, em nossa região, o reagente não se encontrava à venda. Um reagente alternativo proposto é o bicarbonato de sódio que, tal como o borato de sódio, poderá atuar como tampão. Quando em solução, o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_{3(s)}$ ) dissocia-se em íons, permitindo que coexista em solução as espécies  $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ , que caracterizam um sistema tampão. Devido à presença desses dois componentes, os tampões têm a propriedade de resistir às mudanças no pH (Marconato et al., 2004). O potencial elétrico, que será aplicado pela fonte, promoverá a eletrólise da água e de outros íons presentes em solução, consequentemente são gerados íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  e  $\text{OH}^-$ . Assim, para evitar alterações bruscas no valor de pH, adiciona-se a solução tampão.

O azul de bromofenol ( $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ ), corante normalmente utilizado em laboratórios de biologia molecular no preparo da amostra de DNA, pode ser substituído por corante comestível, barato e de fácil aquisição. Por meio desse corante, será possível monitorar a corrida eletroforética em função de sua distância percorrida no gel. A fonte utilizada foi obtida de uma impressora em desuso, conferindo uma voltagem de 20-30V.

Os testes mostraram que, ao se preparar o gel mais espesso, um maior volume de solução tampão poderia ser utilizado, resultando em uma melhor distribuição da corrente elétrica por todo o gel. Entretanto, não se deve deixar que o tampão ultrapasse as bordas do gel, porque o líquido na parte superior do gel provocaria a saída do material aplicado dentro do poço, prejudicando a corrida (Figura 6A). Tomando esse cuidado, não há necessidade de acrescentar à amostra um reagente que aumente sua viscosidade como o glicerol. Em sistemas de eletroforese em que o gel fica submerso, o preparo da amostra deve conter esse reagente. Com essas devidas observações, em aproximadamente 50 minutos, é possível a visualização nítida e clara do corante percorrendo o gel em direção ao polo positivo (Figura 6B). Nos poços 1 e 2, foram aplicadas, em duplicata, a amostra preparada com corante comestível e, nos poços 3 e 4, preparada com azul de bromofenol. Em função da maior massa molecular do segundo corante, observa-se uma ligeira diferença na distância percorrida entre os corantes no gel quando submetidos à mesma diferença de potencial (ddp).

O DNA, tendo carga negativa em pH neutro, migra em direção ao polo positivo e, em razão de sua massa/carga, ocupará uma posição específica no gel. No entanto, não é possível visualizar a exata localização do fragmento de DNA aplicado no gel por meio desse sistema. Para a visualização desses fragmentos, é necessário, por exemplo, a imersão do gel, ao fim da corrida eletroforética, em uma solução diluída de um corante fluorescente. Um exemplo é o brometo de etídio ( $\text{EtBr}$ ) ( $\text{C}_{21}\text{H}_2\text{OBrN}_3$ ), que se intercala à dupla hélice do DNA. No entanto, essa visualização somente ocorrerá após o gel ser exposto à luz ultravioleta, permitindo a observação de bandas laranja fluorescentes e destacando as regiões de alta concentração de DNA (Carniello et al., 2008).

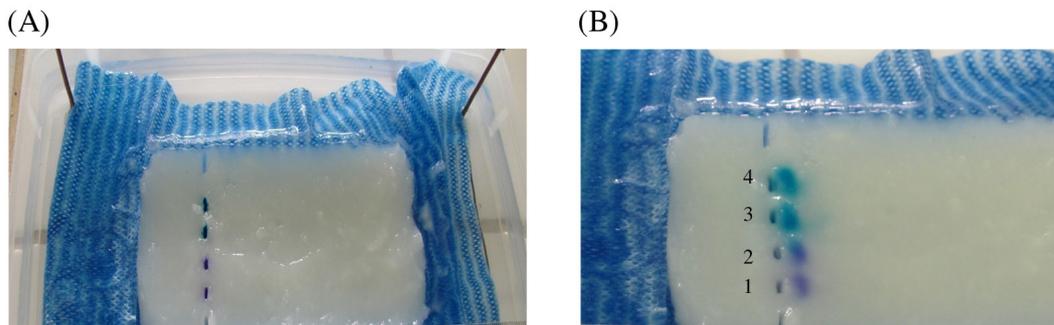


Figura 6: (A) Visualização do material aplicado no poço. (B) Visualização das bandas no gel após 50 minutos de corrida eletroforética. Linhas: 1 e 2 – DNA de banana com corante comestível (roxo); 3 e 4 – DNA de banana com corante de biologia molecular (azul de bromofenol).

Entretanto, o EtBr é um agente altamente mutagênico e a radiação ultravioleta utilizada para visualizar o DNA pode causar queimaduras severas, além não estarem disponíveis na maioria das escolas.

Entretanto, mesmo que a posição precisa do DNA não seja confirmada com essa prática, o professor pode utilizar esse experimento para abordar uma série de conteúdos importantes, contemplando a biologia, a química e a física.

Visto que vários temas podem ser abordados no experimento, o professor pode iniciar com a discussão sobre os nucleotídeos, destacando os grupamentos fosfatos, e como os nucleotídeos se polimerizam para dar origem à dupla fita de DNA, local em que o EtBr se intercala para demarcar o DNA.

Em outra etapa, os alunos podem se dividir em grupos para realizar a montagem do sistema eletroforético. A física é, nesse momento, o foco principal de discussão, buscando abordar como os eletrodos devem ser montados para que ocorra a passagem de corrente elétrica, inserindo importantes conceitos como campo elétrico, diferença de potencial, corrente contínua etc. Finalmente, a discussão química, em

que o professor pode, ao apresentar os reagentes, abordar a estrutura química dos reagentes, discutir sobre solução tampão e pH, preparo de soluções químicas etc.

### Conclusões

A elaboração de um sistema de eletroforese a partir de elementos alternativos abre uma grande oportunidade para os professores discutirem conceitos importantes nas áreas de biologia, química e física. Por meio das várias etapas, extração do DNA, confecção do sistema e execução da corrida, o professor terá uma oportunidade de atrair a atenção dos alunos e até mesmo cultivar neles a busca por novas metodologias moleculares.

**Fernanda Romanholi Pinhati** (fernandaromanholi@yahoo.com.br), farmacêutica e bioquímica pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), mestre e doutora em Ciências (Bioquímica) pela Universidade Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), é professora visitante do Departamento de Química e Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Resende – RJ, BR.

### Referências

CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. *Bioquímica*. v. 2. 5. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

CARNIELLO, R.S.; SILVA, R.F.; FIORINI, A. Descontaminação de resíduos de brometo de etídio gerados em procedimentos de biologia molecular. In: MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO CESUMAR, 4, 2008. *Anais...* Disponível em: <<http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

LEE, P.Y.; COSTUMBRADO, J.; HSU, C.Y.; KIM, Y.H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments.

*Journal of Visualized Experiments*, v. 20, p. 3923, 2012.

MARCONATO, J.C.; FRANCHETTI, S.M.M.; PEDRO, R.J. Solução tampão: uma proposta experimental usando materiais de baixo custo. *Química Nova na Escola*, v. 20, p. 59-62, 2004.

MARTINEZ, E.R.M.; PAIVA, L.R.S. Eletroforese de ácidos nucleicos: uma abordagem para o ensino de genética. *Genética na Escola*, v. 03.01, p. 43-48, 2008.

RODRIGUES, C.N.; ALMEIDA, A.C.; FURLAN, C.M.; TANIGUSHI, D.G.; SANTOS, D.Y.A.C.; CHOW, F.; MOTTA, L.B. *DNA vegetal na sala de aula*. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/materiaisdidaticos>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

**Abstract:** *DNA Electrophoresis: from molecular biology labs to classrooms.* This paper presents a protocol for construction and implementation of an electrophoretic run of biological material in the classroom. The system is built with cheap and easy to obtain alternative materials, such as plastic pot, butter dish, printer fonts, sodium bicarbonate, cake's dye and cornstarch to substitute the major components used in a molecular biology lab. Through the experiment, the teacher can propose activities to the students where they can participate in the system construction, perform an electrophoretic run using banana's DNA previously extracted. Along the class, teacher and students will discuss important concepts of chemistry, physics and biology.

**Keywords:** DNA, electrophoresis and corn starch gel