

ARTIGO EXPERIMENTAL:

Análise da eficiência do gel de agar-agar na eletroforese de DNA

Analysis of the efficiency of agar-agar gel in DNA electrophoresis

Rafael Petecof^a; Erik Cendel Saenz Tejada^a; Camila Vega^a; César Costa^a e Charlotte Cesty Borda de Saenz^a.Petecof, R^a; Saenz EC^a; ^a; Vega, C^a; Costa, C^a; Borda CC^a.

a: Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas-FMU; Av. Santo Amaro, 1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, SP, Brasil. CEP: 04505-002.

RESUMO

Géis de agarose são amplamente utilizados para realização de eletroforese de ácidos nucleicos, tanto para fins didáticos, quanto para fins de investigação científica, análise diagnóstica e pesquisa clínica. O presente trabalho analisou a eficiência do gel de agar-agar para experimentos de corrida eletroforética com amostras de DNA genômico, DNA plasmidial, DNA de PCR e marcador molecular, comparado ao gel de agarose à 1% . Para análise comparativa foi utilizado o procedimento padrão de eletroforese de ácidos nucleicos, utilizando amostras com diferentes fontes de DNAs, nos dois tipos de gel. Evidenciou-se similaridade e correspondência na distancia percorrida do DNA, integridade do DNA e resolução das banda sem alterações na qualidade da imagem.. A utilização de gel constituído por Agar-agar mostra-se eficaz em comparação ao gel de agarose comumente utilizado e com menor custo.

Palavras chave: agar-agar, agarose, eletroforese, DNA, algas, *Gracilari* .

SUMMARY

Agarose gels are widely used to perform electrophoresis of nucleic acids, both for teaching purposes, and for scientific research, diagnostic analysis and clinical research. This study examined the efficiency of agar gel for electrophoretic experiments with genomic DNA samples, plasmid DNA, PCR and DNA molecular marker, compared to agarose gel at 1%. For comparative analysis was performed using standard procedure electrophoresis of nucleic acids using samples with different sources of DNA, the two types of gel. It was evident similarity and correspondence in the DNA distance migrated, DNA integrity and resolution of band with no change in image quality. The use of gels consisting of agar-agar is efficient in comparison to agarose gel commonly used and lowest cost.

Keywords: agar-agar, agarose, electrophoresis, DNA, algas, *Gracilari*.

INTRODUÇÃO

A eletroforese em gel de agarose é a técnica de Biologia Molecular mais utilizada para avaliar a integridade e pureza de DNA ¹. Separando fragmentos de 100pb até 25kb. A migração do DNA através do gel é determinada pelo: tamanho do DNA, concentração de agarose, conformação do DNA, voltagem utilizada, presença de Brometo de etídeo, buffer de eletroforese e tipo de matriz ².

O tipo de matriz mais rotineiro no laboratório de Biologia Molecular é o gel de agarose, que por sua constituição química e o tamanho dos poros pode mudar a velocidade de migração dos ácidos nucleicos. Porém existem outras matrizes que podem ser utilizados com este mesmo fim, com é o caso do gel de Agar-agar³.

O Agar-agar, carboidrato estrutural da parede celular das algas agarofíticas como *Gracilari* e *Gelidium* ⁴, é um polímero de subunidades de galactose, composto de suas frações principais: a agaropectina que é um polissacarídeo sulfatado, modificado com grupos ácidos de sulfato entre 3%-10%, ácido D-glicurónico e baixas concentrações de ácido pirúvico e a agarose que é um polissacarídeo neutro³.

A empresa Agargel Indústria e Comércio Ltda. que vários gêneros de algas da classe Rodophyta produzem a agar-agar, um hidrocolóide gelificante, cuja concentração nas algas sofre flutuação devido às variações das condições ambientais, tais como temperatura, tensão de oxigênio, intensidade luminosa e concentração de dióxido de carbono no mar⁵. E a proporção da agaropectina e da agarose varia de acordo com a espécie da alga sendo que a agarose compreende normalmente ao menos dois terços do agar-agar natural ⁶.

Agarose é a fração gelificante do Agar-agar, este polissacarídeo é formado por unidades repetitivas de agarbiose com um disacarídeo β -1,3 D-galactose e α -3,6 anidro-L-galactopirranose. Este polissacarídeo é o material mais frequente para a confecção de géis para corrida eletroforética realizada com moléculas de DNA, com a vantagem que o DNA pode ser retirado da agarose para posteriores experimentos ⁷.

Géis de agarose para eletroforese são ferramentas úteis para separar e estimar a extensão de fragmentos de moléculas de DNA. O número de ácidos nucléicos, bem como a

carga, o grau de enovelamento e a flexibilidade conformacional das moléculas de DNA influem diretamente na distância que cada fragmento de DNA percorre em um mesmo gel ⁸.

Os géis de agarose também são úteis em outras análises genéticas, como na observação da migração de DNA plasmidial em suas diferentes conformações topológicas: circular, enovelado ou linear. Sendo, portanto, útil para fins didáticos, especialmente, em aulas práticas ⁹.

O custo do agar-agar é muito menor que o custo da agarose, além de que géis de agar-agar tem sido demonstrado possuir potencial para substituição da agarose em muitos experimentos para fins educacionais ¹⁰. Porém, a composição do agar-agar pode variar de acordo com o fabricante, interferindo no desempenho do gel na corrida eletroforética ¹¹.

Foi demonstrado em um experimento, que o agar-agar serve como substituto à agarose para corrida eletroforética, com corantes que ilustravam as bandas no gel de agar-agar ¹². Entretanto, não se tem na literatura atual conhecimento do real funcionamento do constituinte de Agar-agar para eletroforese de ácidos nucleicos.

Portanto, objetivamos avaliar a utilização da gelatina Agar-agar para confecção de géis de eletroforese e analisar diferentes ácidos nucleicos em comparação com gel confeccionados com agarose comercial.

METODOLOGIA

Preparação dos géis de eletroforese.

Foi realizado o gel de agarose a 1% p/v com Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X e foi adicionado brometo de etideo como agente intercalante quando a agarose encontrou-se a 40°C. Foram utilizadas como condições da eletroforese temperatura 23°C, voltagem 90V e tempo 1h. Para avaliar a distancia percorrida foi utilizada uma régua (mm).

Como material biológico foi utilizado DNA genómico, DNA plasmidial, DNA produto de PCR e como marcador molecular Ladder Plus 1Kb.

Para fins comparativos foram utilizadas 3 marcas de gelatina vegetal Agar-agar e preparados géis tomando em consideração as mesmas condições que o gel da agarose.

Avaliação dos géis de eletroforese.

A avaliação da eletroforese foi realizada em transiluminador com luz UV e o resultado foi fotodocumentado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese permite avaliar a qualidade do DNA e RNA e sua integridade, independentemente da matriz utilizada. Por este motivo para avaliar a eficiência do gel de Agar-agar foram utilizados como critérios de avaliação a distancia percorrida pelo DNA, integridade da molécula, e a resolução das bandas.

Na análise comparativa entre várias marcas de gelatina vegetal agar-agar e agarose, ambas na concentração 1%, mostrou que alta eficiência e nenhuma diferença que interfira na avaliação do DNA.

Na distancia percorrida entre o DNA do gel de agarose e os outros tratamentos mostrou diferença na velocidade de migração entre 1,5mm/h dos DNAs no gel de agarose, 1,0 mm/h no gel de Agar-agar B, 1,3 mm/h no gel de Agar-agar C e 1,17 mm/h no Agar-agar D (Tabela 1). Isso devido que corre com mais facilidade no gel de agarose, o que condiz com o fato de as moléculas de agarobiose da agarose serem mais homogêneas que as do agar-agar⁶. Quando comparadas as marcas de Agar-agar observou-se muita similaridade entre a marca B e D, nas distancias percorridas e nas velocidades de migração e entre a agarose e a marca C, o que leva a entender a que a pureza do Agar-agar vai depender entre as marcas. Ao avaliar o DNA plasmidial e o produto de PCR, pode se observar uma relação proporcional entre os géis Agar-agar comerciais (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da distancia percorrida e velocidade de migração de DNA genómico, DNA plasmidial, e produto de PCR. Gel de agarose 1% (A), Gel de Agar-agar comercial 1% (B, C, D).

	Distancia percorrida (mm)				Velocidade de migração (mm/h)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
DNA genómico	90	70	80	70	1,50	1,17	1,30	1,17
DNA plasmidial	150	120	130	120	2,50	2,00	2,50	2,00
Produto PCR	230	200	220	200	3,83	3,33	3,66	3,33

Esta homogeneidade molecular do agar-agar ⁶, pode explicar a utilização da agarose como um gel de eletroforese do qual pode-se extrair e reutilizar o DNA da amostra corrida⁷.

Mesmo com maior facilidade de corrida das amostras nos géis de agarose, os géis de agar-agar tiveram a mesma eficiência como ferramenta de discriminação dos tipos de amostras de DNA. Esta eficiência já era esperada para a agarose⁸.

Com relação a integridade, o DNA genómico, DNA plasmidial e DNA produto de PCR apresentaram boa integridade em todos os matrizes utilizadas sem nenhum tipo de degradação (Figura 1).

Outro quesito de avaliação foi a resolução das bandas. Pode se entender como resolução do DNA a boa definição e claridade entre as amostras (Figura 1). Nos 4 tratamentos pudesse observar uma boa definição, porém quando avaliadas entre as diferentes marcas da gelatina Agar-agar observou-se algumas diferencias com relação a resolução, sobretudo nas bandas do DNA plasmidial que pela sua conformação apresenta algumas bandas menos concentradas durante a migração. Entretanto a matriz C foi quem obteve maior similaridade com o gel de agarose.

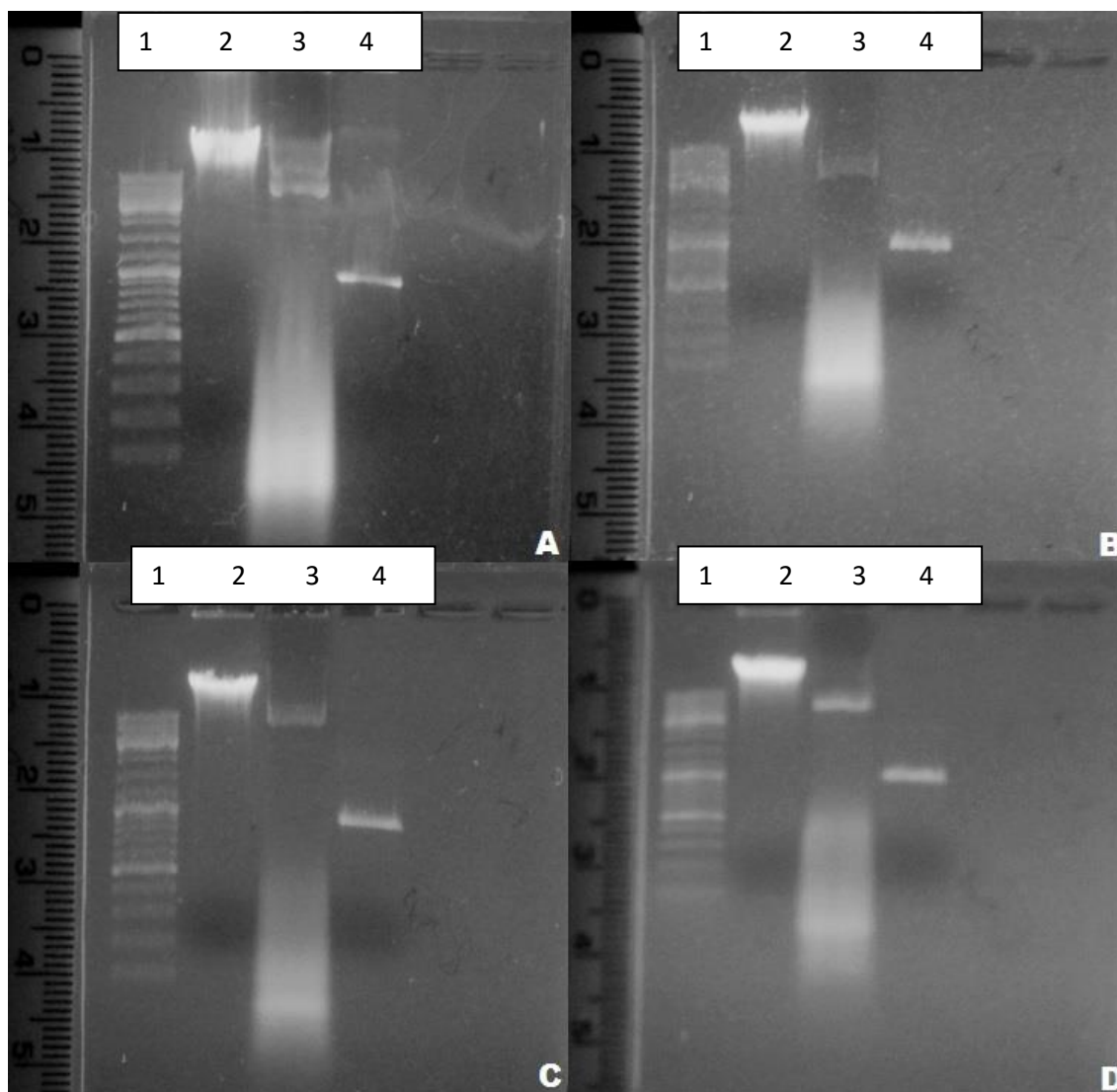


Figura1. Perfil eletroforético de DNA com diferentes matrizes e diferentes DNAs. 1. Marcador molecular Ladder 1Kb, 2.DNA genômico, 3. DNA plasmidial, 4. DNA produto de PCR. Gel de agarose 1% (A), Gel de Agar-agar comercial 1% (B, C. D).

No presente trabalho, todas as amostras de DNA aplicadas em gel de agar-agar apresentaram-se tão didáticas quanto as amostras aplicadas em gel de agarose¹².

Ainda que os experimentos do presente artigo, e de outros citados, apresentem resultados satisfatórios para o uso de agar-agar em eletroforese, devemos ressaltar a importância em se testar o agar-agar de diferentes fabricantes, pois podem haver diferenças na eficácia do gel de acordo com o fabricante ¹¹.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a efetividade do Agar-agar como matriz de gel de eletroforese para corrida de amostras de ácidos nucleicos, sendo recomendada análise prévia do fornecedor para melhor eficácia de resultados. Os resultados obtidos com o agar-agar neste estudo mostraram que, além de didático, em experimentos laboratoriais de pesquisa em que a agarose não seja essencial para se recuperar as amostras de DNA aplicadas, a substituição deste pelo Agar-agar é efetiva, e pode trazer grandes economias por conta de seu baixo custo comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kirkpatrick, F.H. Overview of agarose gel properties. *Electrophoresis of large DNA molecules: theory and applications* 9-22 (1991).
2. Lee PY1, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012 Apr 20;(62).
3. Reiniger LRS, Anthonisen D, Choer E, Sepel LMN. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. *Ciência Rural.* 2004. 34(5). 1603-1605
4. Murano, E. Chemical Structure And Quality Of Agars From Gracilaria. *Journal Of Applied Phycology*, 1995. 7. 245-254.
5. Agargel Indústria E Comércio Ltda., 2014. Agar-Agar. Disponível Em: <[Http://Www.Gelialgas.Com.Br/Agar.Html](http://www.gelialgas.com.br/agar.html)> Acessado Em: 25/02/2014. E Disponível Em: <[Http://Www.Gelialgas.Com.Br/Agar-Tec.Html](http://www.gelialgas.com.br/agar-tec.html)> Acessado Em: 15/03/2014.
6. Lahaye, M.; Rochas, C. Chemical Structure And Physico-Chemical Properties Of Agar. *Hydrobiologia*, 1991. 221, 137-148.
7. Invitrogen. *Electrophoresis Chapter 11. Invitrogen 2002 Catalog.* Invitrogen, 2002. P. 475 – 487.
8. Georgel, P.T.; Hansen, J. C. Quantitative Characterization Of Specific Genomic Promoters Using Agarose Gel Electrophoresis. *Biopolymers*, 2003. 68,557–562.
9. Mattos, J. C. P.; Dantas, F. J. S.; Araújo, A. C.; Moraes, M. O. Agarose Gel Electrophoresis System In The Classroom: Detection Of Dna Strand Breaks Through The Alteration Of Plasmid Topology. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, 2004. 32 (4). 254–257.
10. Britos, L.; Goyenola, G.; Oron, S. U. Simple Protocol For Secondary School Hands-On Activity: Electrophoresis Of Pre-Stained Nucleic Acids On Agar-Agar Borate Gels. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, 2004. 32 (5), 341–347.
11. Ens, S.; Olson, A. B.; Dudley, C.; Ross, N. D.; Siddiqi, A. A.; Umoh, K. M.; Schneegut, A. Inexpensive And Safe Dna Gel Electrophoresis Using Household Materials. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, 2012. 40 (3), 198–203.
12. Tan, T. T. M.; Tan, Z. Y.; Tan, W. L.; Peter, P. F. DNA Science without The DNA!. *Biochemistry And Molecular Biology Education.* 2007. 35 (5). 342–349.