

ANÁLISE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GelRed PARA VIZUALIZAÇÃO DE DNA EM ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Ludimilla Laís Motta Nascimento¹, Guilherme Ferreira Sirtoli¹, Isabela Faria Corrêa¹, Franciele Barros de Souza Sobreira², Taís Cristina Bastos Soares².

¹ Universidade Federal do Espírito Santo/, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, mottaludimilla@gmail.com, guilhermeferreirasirtoli@gmail.com, isabelafaria.correa@gmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, francielesouzza@gmail.com, tcbsoares@gmail.com

Resumo

Os intercalantes de DNA são moléculas que se inserem entre as bases nitrogenadas do DNA, formando complexos estáveis que aumentam a fluorescência. Devido a essa propriedade, eles são amplamente utilizados em técnicas de visualização e quantificação de ácidos nucleicos, como eletroforese em gel e microscopia de fluorescência. Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes concentrações de GelRed para a visualização de DNA em eletroforese em gel de poliacrilamida, visando identificar a concentração mais adequada e custo-benéfica. Foi realizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando o intercalante GelRed em concentrações de 0,15X, 0,3X, 0,6X, 0,9X, sendo estes aplicados nas próprias amostras de DNA, e 6X, incorporado diretamente ao gel, o qual foi ineficiente e não foi possível visualizar a amplificação. Os resultados mostraram que uma concentração de 0,3X aplicado na amostra proporcionou uma visualização clara e eficaz das bandas de DNA, enquanto concentrações mais altas resultaram em fluorescência excessiva, dificultando a análise.

Palavras-chave: Fluorescente. Intercalante. PCR. Microsatélites.

Área do Conhecimento: Ciências agrárias

Introdução

Os intercalantes de DNA são moléculas que possuem a capacidade de inserir-se entre as bases nitrogenadas da dupla hélice do DNA, formando complexos estáveis com o ácido nucleico. Essa interação ocorre devido à estrutura planar e aromática dos intercalantes, que lhes permite deslizar entre as camadas de pares de bases do DNA, estabilizando a estrutura através de interações de empilhamento π - π e, em alguns casos, ligações de hidrogênio adicionais (Lerman, 1961). Essa propriedade de se ligar ao DNA torna os intercalantes ferramentas valiosas em diversas aplicações biológicas e bioquímicas. Eles são amplamente utilizados em técnicas de visualização e quantificação de ácidos nucleicos, como a eletroforese em gel e a microscopia de fluorescência. Ao se intercalar no DNA, esses compostos geralmente exibem um aumento significativo na fluorescência, permitindo a detecção de pequenas quantidades de DNA ou RNA em amostras (Mohan; Guha, 2021).

A visualização de ácidos nucleicos por eletroforese em gel é uma técnica muito usada em estudos genéticos, sendo necessária para análises e interpretações de resultados experimentais. Normalmente, na eletroforese, é usado brometo de etídio, um corante que intercala entre as bases do DNA e emite fluorescência na presença de luz ultravioleta (Possik, 2016). Apesar de ser muito eficiente para a visualização do DNA, esse método tem sido um risco de contaminação, por apresentar efeitos mutagênicos e carcinogênicos (El-Shishtawy, 2007). Por isso, houve a necessidade de estudar corantes alternativos que pudessem substituir o uso do brometo de etídio na visualização de ácidos nucleicos.

Um corante que vem sendo bastante utilizado é o GelRed, alternativa mais segura e menos tóxica para a visualização de DNA, devido à sua estrutura química que impede que o corante atravesse

membrana celulares (Biotium, 2013). Comparado ao brometo de etídio, o GelRed oferece uma maior sensibilidade, o que permite a detecção de maiores detalhes do DNA com clareza (Hao et al., 2018)

O GelRed funciona intercalando-se entre as bases do DNA. A molécula é plana e pode se inserir entre as bases empilhadas do DNA de fita dupla. Esta intercalação aumenta significativamente a fluorescência do GelRed, permitindo a visualização das bandas de DNA sob luz UV ou azul (Anjomshoa et al., 2016). Além disso, o corante se mostra estável em água e temperatura ambiente, sendo possível ser armazenado por longo prazo (Echeverry, 2013).

A concentração do corante usado pode influenciar a intensidade da fluorescência e a resolução das bandas, principalmente em géis de poliacrilamida, onde a separação de fragmentos menores é mais precisa. Nesse contexto, objetivou-se testar diferentes concentrações de uso de GelRed para determinar a concentração mais viável e para uma visualização segura, eficaz e custo-benéfica do DNA, visto que o GelRed é um reagente de elevado custo.

Metodologia

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre. Utilizou-se 10 genótipos de *Digitaria insularis* (capim-amargoso).

A extração do DNA foi realizada de acordo com o método descrito por King et al. (2014). A concentração do DNA nas amostras foi verificada por espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) e a integridade foi confirmada em eletroforese em gel de agarose 0,8% aplicando-se 3 µL da amostra de DNA e 3 µL do reagente intercalante Gelred. Foram realizadas 5 baterias de reações de PCR, com diferentes *primers* microssatélites, utilizando-se 40 ng de DNA, 0,4 µM de cada primer (F + R), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1X de tampão (10 mM Tris HCl - pH 8,5, 50 mM KCl), 2,75 mM de MgCl₂ e 0,8 mM de dNTPs, com o volume final da reação de 15 µL. As reações foram submetidas à desnaturação inicial por 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C, com uma extensão final de 8 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel vertical de poliacrilamida 10%, com tampão 1X TBE (Tris HCl/ácido bórico/EDTA), corados com GelRed biotium com concentrações de 0,15X; 0,3X; 0,6X e 0,9X, aplicados nas amostras, e 6X, aplicado diretamente no gel.

O GelRed usado nas análises tem concentração inicial 10.000X e foi diluído com água até a concentração de estoque 6X, o qual foi embalado e armazenado em local sem presença de luz, uma vez que se trata de um corante fotossensível.

Foram preparadas alíquotas de 50µL de cada uma das diferentes concentrações do GelRed, feito da seguinte forma:

1. 0,15X: 1,25µL de GelRed estoque 6X e 48,5µL de corante tipo IV
2. 0,3X: 2,5µL de GelRed estoque 6X e 47,5µL de corante tipo IV
3. 0,6X: 5,0µL de GelRed estoque 6X e 45,0µL de corante tipo IV
4. 0,9X: 7,5µL de GelRed estoque 6X e 48,75µL de corante tipo IV

Cada teste foi feito em uma das baterias de reações, aplicando 4µL da alíquota em cada poço da reação, ou seja, em cada amostra de DNA. No último teste foi aplicado 10µL de GelRed estoque 6X diretamente nos regentes usados no preparo do gel de poliacrilamida 10%. Após corrida em gel, os produtos foram fotografados com sistema de fotodocumentação (ChemiDocXRS + System– Bio-Rad™).

Resultados

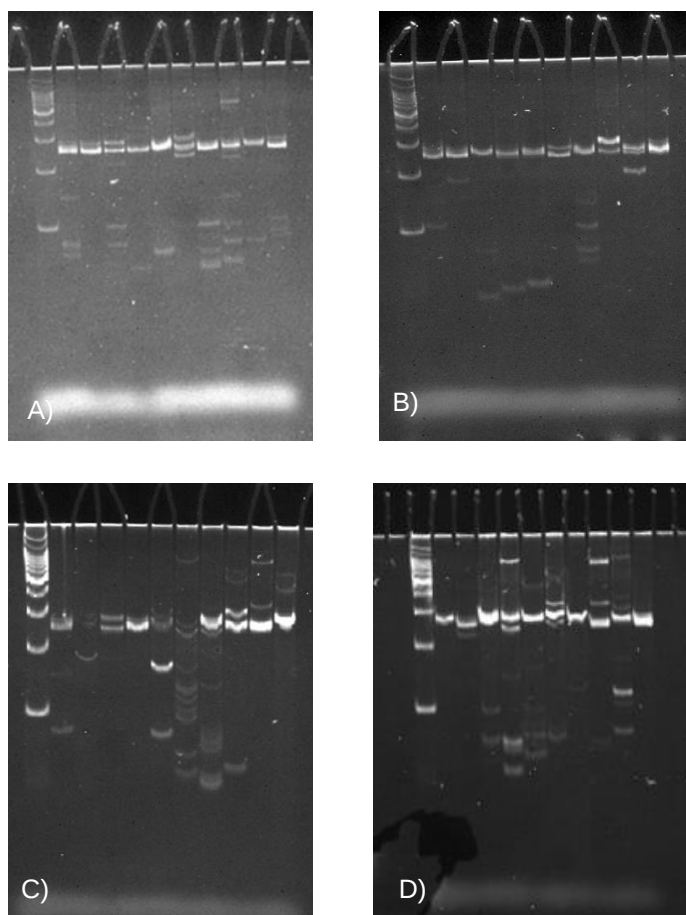
A visualização dos produtos de PCR em eletroforese de gel de poliacrilamida mostrou variações na intensidade de fluorescência e na resolução das bandas de DNA (Figuras 1A a 1D).

Nas concentração mais baixas (Figuras 1A e 1B), foram observadas bandas com uma intensidade de fluorescência mais baixa, porém não houve dificuldades para visualizar.

Quando aumentado a concentração para 0,6X (Figura 1C) e 0,9X (Figura 1D), as bandas apareceram muito fortes com uma intensidade de fluorescência muito alta, o que pode afetar negativamente na qualidade da visualização.

Ao adicionar o GelRed diretamente ao preparo do gel de poliacrilamida na concentração de 6X, notou-se que as bandas não apareceram.

Figura 1. Eletroforeses em gel de poliacrilamida coradas com GelRed a 0,15X (A); 0,3X (B); 0,6X (C); 0,9X (D), aplicado nas amostras



Fonte: os autores

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a concentração de GelRed utilizada de 0,3X é a mais adequada para a visualização eficaz das bandas de DNA, proporcionando um equilíbrio entre sensibilidade e clareza. Em concentrações mais baixas, como 0,15X, a fluorescência foi suficiente para visualizar as bandas, embora com menor intensidade. Isso sugere que, embora fragmentos maiores de DNA possam ser detectados, a visualização de fragmentos menores pode ser comprometida.

A saturação observada nas concentrações de 0,6X e 0,9X indica que, apesar de mostrar bandas bem mais claras e nítidas, uma intensidade excessiva de fluorescência pode dificultar a análise e a interpretação dos resultados. A fluorescência elevada pode levar a uma superexposição das bandas, tornando difícil distinguir entre fragmentos de tamanhos semelhantes. A escolha da concentração do corante é, portanto, um fator que deve ser considerado para evitar a perda de informações relevantes.

Além disso, a ausência de bandas ao usar GelRed na concentração de 6X, aplicado diretamente no gel, sugere que a forma de incorporação do corante pode interferir na sua capacidade de intercalare eficientemente entre as bases do DNA. Portanto, se faz necessário analisar outras concentrações de uso com esse método, o que não foi feito no presente trabalho. A incorporação do corante nas amostras, em vez de adicioná-lo diretamente no gel, pode ser uma estratégia mais eficaz para garantir uma melhor visualização das bandas visando um melhor custo-benefício.

Conclusão

Este estudo conclui que a concentração de 0,3X de GelRed, adicionado nas amostras de DNA para a visualização em gel de poliacrilamida proporciona uma fluorescência adequada sem saturação, permitindo uma análise precisa da amplificação pelas bandas de DNA.

A continuidade da pesquisa nesta área pode levar ao desenvolvimento de protocolos mais eficazes e seguros para a visualização de ácidos nucleicos, visto que a pesquisa utilizando concentrações de GelRed em géis de poliacrilamida ainda é vaga. Futuros estudos são necessários para explorar interações e outras metodologias e concentrações de aplicação do GelRed para aprimorar ainda mais a visualização de ácidos nucleicos, contribuindo para avanços em estudos genéticos e moleculares.

Referências

ANJOMSHOA, Marzieh; TORKZADEH-MAHANI, Masoud. Competitive DNA-binding studies between metal complexes and GelRed as a new and safe fluorescent DNA dye. **Journal of fluorescence**, v. 26, p. 1505-1510, 2016.

BIOTIUM. **Safety report of GelRed and GelGreen. Nucleic acid detection technologies.** Disponível em: <http://www.biotium.com>. Acesso em: julho. 2024.

ECHEVERRY, Paula Tatiana Uribe et al. Uso alternativo del colorante gelred en la tinción de ácidos nucleicos. **Archivos de Medicina (Col)**, v. 13, n. 2, p. 160-166, 2013.

EL-SHISHTAWY, Reda M. et al. New amino and acetamido monomethine cyanine dyes for the detection of DNA in agarose gels. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 16, p. 5537-5542, 2007.

HAO, Ya-Ya et al. Real-time label-free analysis of the thermostability of DNA structures using GelRed. **Nuclear Science and Techniques**, v. 29, n. 10, p. 138, 2018.

KING, Z. et al. Non-toxic and efficient DNA extractions for soybean leaf and seed chips for highthroughput and large-scale genotyping. **Biotechn. Letters**, v. 36, n. 9, p. 1875-1879, 2014.

LERMAN, L. S. "Structural considerations in the interaction of DNA and acridines." **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n.1, p. 18-30, 1961.

MACHADO, Aroldo Ferreira Lopes. Biologia e controle químico de *Digitaria insularis* (L.). 2005.

MOHAN, R.; GUHA, R. "DNA intercalators and their therapeutic applications." *Frontiers in Bioscience*, v. 26, n. 5, p. 728-742, 2021.

POSSIK, Patrícia Abrão. A análise de DNA por eletroforese. 2016.

Agradecimentos

À Fapes (Fundação de Amparo a Pesquisa) pelo suporte financeiro para desenvolvimento das análises À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por possibilitar a realização dessa pesquisa.