

Materiais

- Agarose
- DNA ladder 100 bp ou 1 kb
- Cuba de eletróforese horizontal

Soluções

0,5 M EDTA pH 8.0

Misturar 186,12 g de EDTA com 600 ml de água Milli Q
Ajustar pH para 8.0 com NaOH
Avolumar para 1 litro com água MilliQ

5 X TBE

450 mM Tris	270 g de Tris
4,45 M Ácido bórico	137,5 g de ácido bórico
10 mM EDTA	100 ml 0,5M EDTA pH 8.0

Avolumar para 5 litros com água MilliQ
Armazenar no galão de 5L a temperature ambiente
Diluir 10X com água MilliQ p/ preparar TBE 0.5X

Gel de agarose

Porcentagem	Peso (gramas)	Vol. TBE 0,5 X
1 %	1	100 ml
1,5 %	1,5	100 ml
2 %	2	100 ml

Procedimentos

1- Calcular o número e a porcentagem dos géis que serão feitos, checando fichas de verificação PCR/Gel;

*Cubas FISHER grande: 100 ml de gel (máx. 4 pentes)
Cuba pequena: 70 ml de gel (máximo 2 pentes)*

- 2- Montar cubas e colocar pentes;
- 3- Pesar agarose na balança *CELTAC* e despejar pó em becker de 250 ml;
- 4- Adicionar TBE 0,5 X (**novos**) e misturar agitando;
- 5- Aquecer no microondas. Usar luva térmica para retirar;

OBS: Para 100 ml de gel 1 %, aquecer por 2' Agite.

Procedimentos (cont.)

6- Verificar se solução de agarose está **TOTALMENTE** líquido. Caso observar grumos de agarose não dissolvida, repetir o aquecimento;
Dica: olhar contra a luz pra verificar diluição completa.

7- Pipetar **Unisafe** (1 µL/ 100 mL);

8- Esperar esfriar até que seja possível segurar Becker na mão (~60°C);

9- Adicionar gel a cuba e esperar gel polimerizar;

OBS: Atenção para verificar se todos os pentes estão submersos na agarose e Retirar bolhas

10- Posicionar cuba na posição final, adicionar tampão de corrida (**TBE 0,5X NOVO ou USADO**) e retirar pentes cuidadosamente;

11- Aplicar 20 µl amostras e 4.0 µl DNA ladder nos 1º poços;

12- Conectar fios da cuba e da fonte;

OBS: DNA corre do preto (-) para o **vermelho (+)**

13- Ligar a fonte e ajustar condições de corrida para 80 V, 170 mA, 150 W e correr por X min (dependendo do PCR que esteja sendo feito);

14- Verificar que bolhas estão sendo formadas junto aos fios da cuba e que DNA está correndo na direção correta;

15- Desligar fonte quando o "front" (amarelo ou azul) do gel chegar ao lado oposto (antes do gel seguinte);

16- Coloque o gel em um recipiente protegido de luz, pegue as chaves da sala de "freezers -80°C", e um CD apto pra ser gravado.

17- Ao chegar na sala, ligue o estabilizador na tomada, ligue o computador. Em seguida clique 2x no ícone ImageLaB.

18- No software: Protocols → New protocol → Gel imaging → Application → Select → Nucleic Acid Gel → Gel Red. Em seguida, em image area: Select gel type → 96 wells. Desmarque "Highlight saturated pixels". Por último, clique em Run protocol.

19- Vá no canto superior direito, clique em Menu → export for publication → salve na página de seu interesse.

20- Salve os arquivos no seu cd.

Procedimentos(cont.)

20- Feche o programa sem salvar nada, desligue o computador, tire o estabilizador da tomada e anote o seu nome no livro de registro.

21- Por não ser brometo, o gel pode ser jogado no lixos de saco branco do laboratório;

Reagentes	Fonte
Agarose	Fermentas R0491
Unisafe 20.000X	
DNA ladder	
	100 bp Fermentas
	1 Kb Fermentas
Cuba Eletroforese	Fisher FB-SB1316 (Gde) Fisher FB-SB710 (Peq)
Tris	Invitrogen 15504-070
Ácido Bórico	Promega H5003
EDTA	Sigma E5134
Sybr Safe	Invitrogen S33102