

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.005 - Página 1/6	
Título do Documento	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	Emissão: 06/09/2023	Próxima revisão: 06/09/2025
		Versão: 1	

1. OBJETIVO

Padronizar as etapas para a realização da eletroforese em gel de agarose do Laboratório de Genética Molecular e Humana na Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica – UACAP do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes.

2. RESPONSÁVEL

Biomédicos, Biólogos, Técnicos de Laboratório e Pesquisadores responsáveis.

3. MATERIAIS NECESSÁRIOS

- EPI'S (luvas de procedimento, máscara cirúrgica, avental, óculos de proteção, gorro, sapato fechado);
- Álcool a 70%;
- Proveta graduada;
- Frasco de vidro estéril;
- Espátula;
- Barra magnética;
- Cubas de acrílico;
- Berço e pentes de acrílico;
- Balança semianalítica;
- Agitador magnético;
- Termobloco;
- Fonte eletroforética;
- Mapa de poços;
- Micropipetas;
- Ponteiras livres de DNase/RNase;
- Transiluminador UV;
- Equipamento de captura de imagem;
- Impressora.

Reagentes

- TBE 1X;
- Agarose de gradiente molecular;
- Marcador de peso molecular;
- Azul de bromofenol;
- Brometo de etídio.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.005 - Página 2/6	
Título do Documento	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

4. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

4.1. Preparação de gel de agarose:

4.1.1. Ligar a balança semianalítica e tarar a mesma, utilizando recipiente próprio para pesagem de agarose;

4.1.2. Calcular a quantidade de agarose e de solução TBE1X (ver POP.UACAP.007) necessárias para o preparo do gel na concentração e volume desejados.

Utilizar a fórmula: $C1 V1 = C2 V2$, onde C1 é a concentração do reagente estoque, V1 é a quantidade do reagente estoque (X), C2 é a concentração da solução de preparo e V2 é o volume final da solução de preparo.

Gel de Agarose a 1%	
Agarose	TBE 1X (q.s.p.)
5g	500mL
2g	200 mL
1g	100 mL

4.1.3. Pesar e medir o volume dos reagentes e transferi-los para um frasco de vidro estéril;

4.1.4. Levar a solução ao micro-ondas e aquecer de forma gradual até a completa dissolução da agarose - solução translúcida e sem cristais;

4.1.5. Em seguida, colocar a barra magnética no frasco e levá-lo ao agitador magnético até o resfriamento da solução (temperatura confortável ao toque);

4.1.6. Montar o suporte para o gel, posicionando o berço e o pente;

4.1.7. Despejar o gel até atingir espessura desejada;

4.1.8. Aguardar a polimerização da agarose, posicionar o gel na cuba e retirar o pente com cuidado. (Observar a polaridade, para que os poços fiquem no polo negativo);

4.1.9. Encher a cuba com TBE 1X até que o gel fique totalmente imerso.

4.2. Plotagem das amostras no gel de agarose

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.005 - Página 3/6	
Título do Documento	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

4.2.1. Em uma superfície própria – mapa de poços ou membrana de parafilm - pipetar 1 μ L de azul de bromofenol (ver POP.UACAP.007) e 3 μ L de amostra, homogeneizar;

4.2.2. Pipetar a amostra preparada no poço do gel correspondente a ordem estabelecida previamente;

4.2.3. Pipetar 2 μ L do marcador de peso molecular e adicioná-lo ao primeiro poço do gel.

4.3. Corrida eletroforética

Obs.: Atentar para as polaridades dos eletrodos. O DNA tem carga negativa e será atraído para o polo positivo. Portanto os poços do gel devem ser posicionados próximos ao polo negativo da cuba.

4.3.1. Acoplar os eletrodos na cuba e na fonte respeitando a polaridade;

4.3.2. Ligar a fonte e programar a voltagem desejada para a eletroforese;

4.3.3. Acompanhar a migração das amostras no gel. Parar a corrida quando as bandas azuis tiverem a 3 cm do término do gel.

4.4. Revelação de gel e fotodocumentação

4.4.1. Imergir o gel na solução de brometo de etídio 0,5 μ g/mL (ver POP.UACAP.007);

4.4.2. Aguardar 15 minutos para que o brometo de etídio intercale nas fitas de DNA;

4.4.3. Remover o gel da imersão utilizando espátula própria para essa finalidade;

4.4.4. Coloca-lo na superfície do transluminador e expô-lo a luz UV;

4.4.5. Visualizar o gel e verificar se houve amplificação;

4.4.6. Acoplar o equipamento de captura de imagem ao transluminador e obter a imagem;

4.4.7. Transferir a imagem para o computador e identifica-la de forma adequada;

4.4.8. Imprimir a foto para arquivar no caderno.

5. RECOMENDAÇÕES

5.1. Fazer o uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e Coletiva (EPC);

5.2. Desinfetar a banca de trabalho com álcool 70%, antes e depois do procedimento;

5.3. Se atentar ao tempo de corrida do gel pois há variação de migração de acordo com

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.005 - Página 4/6	
Título do Documento	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	Emissão: 06/09/2023	Próxima revisão: 06/09/2025
		Versão: 1	

o peso molecular dos amplicons;

5.4. Ao final de cada corrida, desligar a fonte e higienizar a cuba e os berços e pentes utilizados;

5.5. A fim de evitar contaminação de outros ambientes com brometo de etídio usar somente os itens destinados para sua manipulação que ficam na sala de revelação;

5.6. Descartar gel de agarose no recipiente próprio para descarte (depósito plástico), sempre utilizando espátula e EPIs;

5.7. Higienizar a superfície do transiluminador com papel toalha úmido (água destilada);

6. AÇÕES EM CASO DE NÃO CONFORMIDADE (EVENTO ADVERSO)

6.1. Em caso de incidente com derramamento de produtos químicos, interrompa o trabalho imediatamente, verifique se não houve algum tipo contato entre o produto químico e seu corpo, consultar a Ficha de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ (no qual consta as orientações em caso de acidente), fazer a limpeza do local com material absorvente e, por fim, corrigir a causa do problema;

6.2. Em caso de acidente com respingos de produto químicos na região dos olhos ou qualquer outra parte do corpo lavar a região com água no lava-olhos ou chuveiro de emergência por, pelo menos, 15 minutos, consultar a Ficha de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) e seguir o fluxo de acidente de trabalho da instituição.

7. FLUXOGRAMA

NA - Não Aplicável.

8. REFERÊNCIAS

LEAL, V. L. e Outros (org.). **Protocolos e técnicas laboratoriais de rotina: aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia**. Santa Cruz do Sul, RS: UNISC – Universidade de Santa Cruz do Sul, 2019. 224 p.

NETO, G. F. S. **Avaliação do uso de imagens digitais para determinações quantitativas em eletroforese em gel**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília – UNB. Brasília – DF. P. 85. 2019.

UNIVATES. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. Raul Antonio Sperotto (Org.) - Lajeado : Editora da Univates, 2014. 329p.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.005 - Página 5/6	
Título do Documento	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

9. APÊNDICE

Apêndice A – Fundamentação teórica da técnica de eletroforese em gel de agarose

10. ANEXOS

NA - Não Aplicável.

Apêndice A – Fundamentação teórica da técnica de eletroforese em gel de agarose

A eletroforese é uma técnica laboratorial usada para separar moléculas carregadas sob a influência de corrente elétrica. Os fragmentos de DNA podem ser identificados e separados por essa técnica, uma vez que suas moléculas têm cargas elétricas negativas e migram para o polo positivo (ânodo).

A técnica se baseia na produção de um gel de agarose, que se constitui a matriz de migração onde as amostras serão aplicadas, por isso, a concentração da agarose é de suma importância para o tamanho dos poros do gel e, conseqüentemente, para determinar os fragmentos de DNA a serem separados.

Esta técnica é realizada em cubas, preenchidas com solução tampão para manter o pH da reação estável, o tampão mais utilizado é formado por Tris, Ácido Bórico e EDTA (TBE 1X). Após a corrida eletroforética, para a visualização dos fragmentos de DNA são necessários agentes colorimétricos, isto é, agentes intercalantes (ex.: brometo de etídio) que são moléculas que se inserem entre os pares de base de DNA e emitem fluorescência, permitindo assim, que os fragmentos de DNA fiquem visíveis sob iluminação ultravioleta (UV) apresentando uma coloração alaranjada.

Fonte: LGMH/UACAP/HUPAA/UFAL/EBSERH-2022.



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.005 - Página 6/6	
Título do Documento	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

11. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	RESPONSÁVEL PELA ELABORAÇÃO	DESCRIÇÃO DA ATUALIZAÇÃO
1	06/09/2023	Thaysa Johanne Borges Oliveira Débora de Paula Michelatto Reginaldo José Petrolí	Institui o Procedimento Operacional Padrão Eletroforese em Gel de Agarose.

<p>Elaboração:</p> <p>Thaysa Johanne Borges Oliveira Biomédica do Laboratório de Genética Molecular e Humana/Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica</p> <p>Débora de Paula Michelatto Pesquisadora - Coordenadora do Laboratório de Genética Molecular e Humana/Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica</p> <p>Reginaldo José Petrolí Professor – Pesquisador Faculdade de Medicina/UFAL - campus A.C Simões</p>	
<p>Análise:</p> <p>Ednaldo Almeida Gomes Chefe da Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica</p>	
<p>Validação:</p> <p>Serviço de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde/ Unidade de Vigilância em Saúde</p> <p>Setor de Gestão da Qualidade</p>	
<p>Aprovação:</p> <p>Valtuir Barbosa Felix Chefe da Divisão de Apoio Diagnóstico e Terapêutico</p>	

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que indicada a fonte