



Marcação de sonda 35S por Nick Translation

usando o Kit Nick Translation System (Invitrogen/Thermo Fisher Cat. No. 18160-010)

- a) Coloque em gelo para descongelar os reagentes necessários (H₂O ultrapura, DIG-dUTP, dNTP mix sem dTTP, dTTP, DNA numa concentração mínima de 110 ng/μL, enzima mix).
- b) Para uma reação num volume total de 50μl, adicione em um microtubo novo e autoclavado, mantido em gelo:
 - DNA desejado (equivalente a 2 μg)
 - H₂O ultrapura para completar 39 μL
 - 5μL de dNTP mix sem dTTP 0,2 mM
 - 0,66 μl de dTTP (1mM)
 - 0,34 μL de DIG-dUTP 1 mM
 - 5 μL da enzima mix (Invitrogen)

Atenção

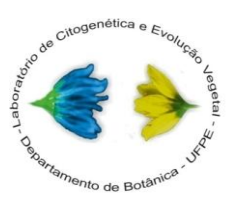
- ✓ A enzima não pode ser retirada do *freezer* a menos que um bloco para transporte a -20°C esteja disponível. Em todo caso, a enzima deve ficar fora do *freezer* pelo tempo mais curto possível.
- c) Agite a solução batendo com o dedo no fundo do tubo e centrifugue brevemente (cerca de 5 s).
 - d) Incube a 15°C por 1 h num termociclador ou similar.

Atenção

- ✓ Antes de concluir a reação de marcação é preciso ter certeza que foram gerados fragmentos entre 200 e 500 pb. Para checar o tamanho dos fragmentos, 0,4 μL da reação de *nick translation* deve ser misturada a um tampão de corrida e água e separada em gel de agarose 1% por 20 min a 80 V juntamente com uma escada de 100 pb. Apenas quando todos os fragmentos estiverem abaixo de 1 kb, e a maioria dos fragmentos abaixo de 500 pb, a reação pode ser interrompida. Enquanto isso, o resto da reação deve permanecer no gelo.



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



- e) Interrompa a reação com 5 μL EDTA 0,5 M.
- f) Adicione 5 μL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 150 μL de etanol absoluto a -20°C , misture por inversão e precipite o DNA por, no mínimo, 2 h a -20°C .
- g) Centrifugue a 14.000 rpm, de preferência por 30 min a 4°C .
- h) Retire o sobrenadante com um pipetador e adicione 50 μL de etanol 70% a -20°C .
- i) Centrifugue a 14.000 rpm por 5 min.
- j) Retire o sobrenadante com um pipetador, deixe o *pellet* secar na bancada e, em seguida, adicione 20 μL de 1x TE pH 8,0. Pipete várias vezes para ressuspender o *pellet*.

Atenção

- ✓ Nem sempre se vê o *pellet* após centrifugação.
- ✓ A concentração da sonda pode ser estimada em 100 ng/ μL , se 2 μg de DNA foi inicialmente marcado, desconsiderando a perda durante a precipitação para purificação da mesma.

Mesmo que a sonda só venha a ser utilizada por uma pessoa, é muito útil ter uma pasta com uma ficha para cada sonda onde a mesma seja numerada para melhor identificação. Além disso, devem ser anotados seus dados gerais e a quantidade retirada a cada uso.