

Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal

Marcação de sonda por *Nick Translation*

- a) Coloque em gelo para descongelar os reagentes necessários (H₂O ultrapura, Cy3-dUTP 1 mM, dNTP mix sem dTTP 0,2 mM cada, DNA numa concentração mínima de 110 ng/μL e tampão de nick translation).
- b) Para uma reação num volume total de 12,5 μL, adicione em um microtubo novo e autoclavado, mantido em gelo:

- até 9 μL de DNA desejado (equivalente a 1 μg)
- H₂O ultrapura para completar 9 μL
- 1,25 μL do tampão de nick translation 10x
- 1 μL de dNTP mix sem dTTP 0,2 mM (0,2 mM de cada: dATP, dCTP, dGTP)
- 0,2 μL de Cy3-dUTP 1 mM
- 0,75 μL da enzima DNA pol I 10 U/μL
- 0,3 μL da enzima DNase I 0,02 U/μL (Diluir 0,2 μL da enzima estoque a 1U/μL em 8,8 μL de H₂O ultrapura com 1 μL do tampão da enzima DNA pol I)

Tampão 10x Nick Translation (0,5 M Tris HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂) – 10 mL

- 5mL 1M Tris HCl (pH 7,5)
- 500 μL 1M MgCl₂
- 4,5 mL ddH₂O
- Guardar em alíquotas de 1 mL a - 20°C.

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).



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



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. A velocidade de marcação pode variar muito de amostra para amostra, por isso, se necessário, a reação deve ser feita em tempo mais longo (2 h) ou continuada por mais várias horas. Para checar o tamanho dos fragmentos, 0,4 μ L 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.

e) Interrompa a reação com 1 μ L EDTA 0,5 M.

f) Guarde a sonda a -20°C até o uso.

Atenção

- ✓ Como a sonda foi marcada diretamente, ela deve ser protegida da luz envolvendo o microtubo em papel de alumínio.
- ✓ A concentração da sonda pode ser estimada em ~80 ng/ μ L.