

EXTRAÇÃO DE DNA (1)

A EXTRAÇÃO DE DNA

Muitas pesquisas de Biologia Molecular começam com a extração de ácidos nucleicos. A lise celular libera as moléculas em uma fase aquosa que é separada dos restos celulares por centrifugação. As proteínas são removidas da fase aquosa por solventes orgânicos (fenol, clorofórmio). O DNA, que permanece na fase aquosa, é precipitado com etanol e, posteriormente, purificado e suspenso em um buffer adequado.

A existência de *kits* comerciais tem mudado a rotina de muitos laboratórios. Nos kits, os solventes orgânicos são substituídos por filtros que retêm o DNA, em condições de concentração salina elevada. A eluição do DNA retido no filtro ocorre em baixa concentração salina.

A PRÁTICA NO LABORATÓRIO DE ENSINO

Por alguma razão que nos escapa, a extração de DNA é uma atividade que entusiasma a alguns e decepciona a outros. Provavelmente, as diferenças de opinião tenham mais a ver com a personalidade dos alunos e suas fantasias que com a atividade em si.

As etapas possíveis no laboratório de ensino são as seguintes:

1. Trituramento do tecido, para separar as células.
2. Lise das membranas celulares com detergente, em uma solução salina, para liberar os ácidos nucleicos e as proteínas.
3. Digestão das proteínas por ação enzimática de proteases (Opcional).
4. Precipitação com etanol gelado. O DNA é solúvel em álcool, mas torna-se insolúvel na presença de sal (NaCl), porque o sódio neutraliza a carga negativa dos grupos fosfatos. O etanol formará uma camada na superfície por ser menos denso que a solução aquosa.
5. Observação de agregados moleculares, de consistência mucoide, na interface entre a solução aquosa e o álcool.

Os agregados moleculares obtidos são uma mistura em proporção variável de ácidos nucleicos, proteínas e pectina, um carboidrato presente na lamela intercelular e no vacúolo das células vegetais.



BIBLIOGRAFIA

MADDEN D. Discovering DNA. Science in School 1: Spring 2006.
<http://www.scienceinschool.org>.

THE SCIENCE BEHIND OUR FOOD
<http://discover.uga.edu/sbof/index.htm>

MANN, V. S. Educação Tecnológica no Ensino fundamental: Da Teoria à Prática Desenvolvida no Instituto de Tecnologia ORT. Dissertação (Mestrado em Educação) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, Rio de Janeiro, 2010.

EXTRAÇÃO DE DNA (1) / UM EXPERIMENTO AMBÍGUO

ATIVIDADE PRÁTICA

OBJETIVO

Extrair DNA mediante um procedimento simples. As membranas celulares e nucleares das células de tomate são desagregadas com detergente, em solução salina, liberando os ácidos nucleicos que precipitam com a adição de etanol gelado.



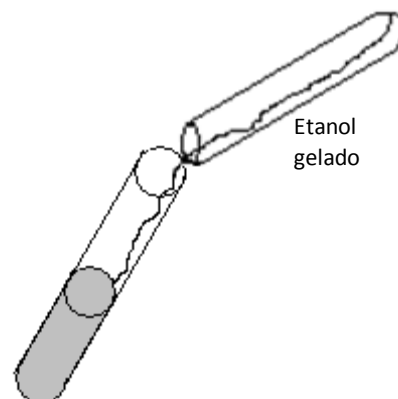
MATERIAIS

Um tomate maduro, faca e tábua, 2 sacos plásticos, 1 béquer, 1 coador de pano, 2ml de detergente, dois ou 3 grãos de sal grosso, tubos de ensaio e grade (substituíveis por frascos pequenos ou por copos), 1 pipeta de 10 ml, tubos com 5 ml de etanol 95% gelado, vareta de madeira ou agulha de *crochet*.

O etanol deve ser colocado no congelador pelo menos um dia antes da realização da prática.

PROCEDIMENTO

1. Cortar o tomate em pedaços pequenos.
2. Colocar os pedaços de tomate em uma sacola plástica e amassar bem. Se o tomate não estiver suficientemente maduro ou largar pouco suco, acrescentar até um volume equivalente de água.
3. Acrescentar o sal grosso e o detergente à massa de tomate. Misturar bem.
4. Depois de 5 a 10 minutos, filtrar a massa de tomate no coador de pano.
5. Distribuir 10 ml do líquido filtrado em cada tubo de ensaio.
6. Inclinar levemente o primeiro tubo e, muito devagar, deixar escorrer 10 ml de etanol 95^o sobre o líquido. O etanol formará uma segunda camada por cima da solução.
7. Aguardar 10 minutos sem misturar as camadas e observar o DNA que precipita na interface das duas e sobe até a superfície.
8. Retirar o DNA com uma vareta de madeira ou uma agulha de *crochet*.



EXTRAÇÃO DE DNA (1) / UM EXPERIMENTO AMBÍGUO

O PASSO A PASSO DA EXTRAÇÃO DO DNA DE TOMATE



Preparação da massa de tomate (tomate + sal + detergente)



Filtrado



DNA + proteínas + pectina

Etanol gelado

EXTRAÇÃO DE DNA (1) / UM EXPERIMENTO AMBÍGUO

NOSSO COMENTÁRIO

Do ponto de vista técnico trata-se de uma atividade cujo único requisito é colocar o etanol no congelador, em frasco fechado, pelo menos um dia antes da realização da prática. O tomate pode ser substituído pelo morango, um poliploide com alto conteúdo de DNA.

No módulo de Tecnologia dos Alimentos do curso de Introdução à Tecnologia do Instituto de Tecnologia ORT, a atividade prática de produção de geleias introduz um teste simples para determinar o teor de pectina de uma fruta. Como o teste envolve a precipitação da pectina com etanol, pensamos que a maior parte dos agregados moleculares poderia ser de pectina, e não de DNA.

A figura 1 mostra três experimentos de extração de DNA de tomate. O primeiro frasco corresponde ao protocolo detalhado neste guia. No segundo, acrescentou-se uma pitada de amaciante de carne contendo papaína e, no terceiro, uma pitada de pectinase. A imagem mostra que a pectinase eliminou a maior parte da substância gelatinosa da superfície, confirmando que se trataria de pectina. Os filamentos de DNA estariam na "nuvem" observada na camada de etanol próxima da interface.

Como a pectinase não é uma enzima fácil de obter, incluímos em nossos protocolos um teste que detectasse a presença de pectina no material escolhido como fonte de DNA. O protocolo modificado se encontra no Guia 75 (*Extração de DNA de diversas fontes*).

Figura 1: Extração de DNA de tomate.

1: Protocolo básico ; 2: Protocolo básico + protease; 3: Protocolo básico + pectinase.



COMO MONTAR UM PROJETO

Ver os guias 68 (*Extração de DNA: Procedimento básico*) e 69 (*Extração de DNA de diversas fontes*).