

Práticas para extração do DNA das células

Laiz Furlan Balioni*

As escolas de ensino fundamental e médio buscam maneiras de ensinar que despertem os interesses dos alunos pelos estudos. Refletindo sobre essa temática, sugerem-se experimentos de fácil execução que podem ser realizados em sala de aulas para ilustrar temas tratados em ciências da natureza, com o objetivo de contribuir para despertar o interesse dos estudantes para as descobertas da ciência.

Introdução

Na primeira metade do século XX, vários resultados experimentais levaram cientistas a concluir que o DNA (ácido desoxirribonucléico), e não outra biomolécula (como carboidratos ou gorduras, por exemplo), é o material genético contido na célula que contém a informação genética codificada. A partir dessa descoberta iniciaram-se os esforços para entender como uma molécula aparentemente simples poderia conter toda a informação genética.

O DNA teve sua estrutura esclarecida por James Watson (geneticista microbiano) e Francis Crick (físico inglês) em 1953. Eles propuseram uma definição para o gene em termos químicos e, ao fazer isso, abriram o caminho para a compreensão da ação gênica e hereditariedade em termos moleculares.

O modelo de dupla hélice proposto por Watson e Crick foi construído com base em pesquisas anteriores, que relatavam a composição química do DNA e as proporções de suas bases. Imagens de difração de raios X revelaram que o DNA é uma hélice de dimensões precisas, assim veio à conclusão final: o DNA é uma dupla hélice composta de dois filamentos de nucleotídeos ligados que se enrolam ao redor do outro. [1]

Justificativa

Desde sua descoberta, o DNA tem despertado o interesse de pesquisadores de diferentes áreas, por ser a molécula responsável pela transmissão das características hereditárias de cada espécie. A molécula do DNA é formada por fosfato e açúcar e por seqüências de quatro bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G), ligadas por ligações de hidrogênio, formando a dupla hélice.

A extração do DNA proposta nessa experiência permite que de formas simples sejam introduzidos conceitos básicos de genética laboratorial, com o objetivo de ilustrar a consistência física do DNA.

Alvo de intensa pesquisa e com constante enfoque na mídia, o reconhecimento do DNA, figura no imaginário dos estudantes, e poderá fornecer incentivo para que sejam realizadas discussões debatendo questões científicas relacionadas à genética. Com esse enfoque podemos citar: o melhoramento genético e genética molecular, baseada na utilização de marcadores para desenvolvimento de mapas genéticos, kits e ferramentas de análise molecular; engenharia genética, para produção de organismos modificados para funções e caracteres de interesse econômico; ciências genômicas e Projeto Genoma, que permitem a compreensão da composição e funcionamento de genomas completos como: humano, xylella, arroz e de camundongos; tecnologias reprodutivas avançadas e tópicos como clonagem, que permitem potencializar e especializar sistemas de produção animal para diversos fins.

Todos os produtos vegetais e animais como hortaliças, frutas, cereais e carne, contêm DNA em diferentes quantidades. Com esses experimentos, pretende-se trazer o DNA para a realidade palpável dos alunos, a fim de que eles o reconheçam e possam visualizá-lo.

Para pleno entendimento dos experimentos que serão apresentados, os alunos precisam conhecer conceitos básicos sobre o assunto e, fundamentalmente, compreender que o DNA encontra-se fisicamente no núcleo celular. As membranas celulares são formadas por uma dupla camada lipídica, e a lise celular é a quebra da membrana celular que libera o conteúdo citoplasmático. Portanto, ao separarmos o DNA nesses experimentos, não obteremos uma mistura pura. A mistura obtida conterá organelas e proteínas também, mas o DNA ficará evidenciado e poderá ser observado a olho nu.

Procedimentos para a extração de DNA de diferentes fontes

- **Extração do DNA do morango**

Morangos são muito bons para a extração de DNA, porque são muito macios e fáceis de homogeneizar. Além disso, os morangos possuem muito DNA: eles possuem 8 (oito) cópias de cada conjunto de cromossomos (são octoplóides). Morangos maduros produzem pectinases e celulasas, que são enzimas que degradam a pectina e a celulose (respectivamente), presentes nas paredes celulares das células vegetais. [2]

A coloração do morango evidencia bem a formação das fases ao final do experimento e facilita sua visualização, mas outras frutas e até mesmo carnes podem ser utilizadas para extrair o DNA.

Material Necessário:

- 1 saco plástico.
- 3 ou 4 morangos frescos ou congelados. Se forem utilizados morangos congelados, é necessário deixá-los descongelar completamente antes de realizar o experimento.
- Detergente.
- Sal.
- Água morna.
- Aparato filtrante: 1 filtro de papel com funil ou 1 filtro de pano, papel ou gaze cortada em quadrados e dobrada em 2 camadas.
- Álcool etílico gelado (pode ser álcool 70° g.l.- 96° g.l.).
- Bastão de vidro ou palito de madeira.
- Béquer ou vidro transparente.

Procedimentos

- Colocar os morangos devidamente lavados e sem sépalas dentro do saco.
- Amassá-los bem, por no mínimo 3 minutos. Isto provoca a quebra física das células.
- Acrescentar aos morangos amassados, detergente, uma pitada de sal e a água morna para diluir.

O detergente afeta as membranas que são constituídas por lipídeos, provocando a quebra da membrana celular. Com a ruptura das membranas, os conteúdos celulares, incluindo as proteínas e o DNA, soltam-se e dispersam-se na solução. E o sal, que em água forma íons, tem função de atrair os fosfatos da molécula do DNA. O sal tem uma interação com a água muito maior que esta com o DNA.

- Filtrar a solução.
- Adicionar o álcool etílico, na medida do dobro do volume final da sua solução. O DNA com álcool apresenta ligações de hidrogênio (mais intensas do que água e o DNA). Como resultado, o DNA aparece à superfície da solução. Desta forma, existem duas substâncias que competem com o DNA pela água. Assim, o DNA surge à superfície da solução aquosa, com aspecto viscoso e pode ser enrolado e retirado da solução com o bastão de vidro.

- **Extração do DNA do bife de fígado bovino**

A extração do DNA pode ser feita a partir de um pedaço de bife de fígado.

É aconselhável que esta atividade seja realizada previamente pelo professor de modo que alguns parâmetros (tais como tamanho do bife de fígado e a quantidade de sal adicionada) sejam otimizados. Deste modo, o professor deve fazer esta atividade pelo menos uma vez com diferentes quantidades destes "materiais" antes de realizá-la com seus alunos.

Material Necessário:

- Um bife de fígado de aproximadamente 300 gr .
- Liquidificador doméstico.
- Sal.
- Detergente.
- Água morna.
- Béquer ou vidro transparente.
- Bastão de vidro ou palito de madeira.
- Álcool (isopropanol).
- Aparato filtrante: 1 filtro de papel com funil ou 1 filtro de pano, papel ou gaze cortada em quadrados e dobrada em 2 camadas.

Procedimentos

- Cortar o bife em pequenos pedaços.
- Colocá-lo no liquidificador.
- Adicionar água morna com sal (aproximadamente 5 pitadas).
- Bater no liquidificador por aproximadamente 10 segundos.
- Passar a mistura para o béquer através do filtro de papel, enchendo mais ou menos até a metade.
- Misturar, lentamente para não fazer bolhas, acrescentando 2 a 3 colheres de chá de detergente.
- Adicionar o álcool lentamente, na medida de aproximadamente o dobro do volume da solução. Não misturar o álcool com a solução, deixar o álcool permanecer como uma camada isolada no topo da solução.
- O DNA surgirá na superfície da solução, e poderá ser retirado com o bastão de vidro. [3]

- **Extração do DNA da cebola**

Material Necessário:

- 1 cebola picada.
- 1 copo ou béquer.
- Detergente.
- Água quente (70° – 75° C).
- Papel de filtro.
- Álcool (conservado no congelador).
- Palito japonês ou bastão de vidro.

Procedimentos

- No copo ou béquer, colocar a cebola picada, acrescentar detergente e a água quente e esperar 15 minutos. Em seguida colocar sob gelo. Filtrar a mistura e acrescentar álcool. Observar o aparecimento de 2 fases. A solução aquosa contendo o DNA ficará na fase que está embaixo.
- Com o auxílio do bastão de vidro ou palito fazer movimentos giratórios, observa-se a adesão dos filamentos (moléculas de DNA) no palito.

- **Extração do DNA do tomate**

Material Necessário:

- 1 tomate picado.
- 1 copo ou béquer.
- Detergente.
- Papel de filtro
- Álcool (frio).
- Palito japonês ou bastão de vidro.

Procedimentos

- Macerar um quarto de um tomate.
- Misturar 2 colheres de tampão de extração (descrito abaixo), com 1 / 2 colher de chá de detergente (ou sabonete líquido) em um copo ou béquer.
- Adicionar o tomate, misturar bem e deixar agir 1 minuto.
- A mistura deve ser coada por um filtro de papel.
- Cuidadosamente adicionar 4 colheres de álcool frio(95% de etanol).
- Entre o sumo e o álcool aparecerá uma fase esbranquiçada, formada por uma substância de aspecto fibroso. Este é o DNA.
- Mexer cuidadosamente as duas soluções no vidro, com a ajuda de um palito de madeira ou bastão de vidro. O DNA pode ser enrolado no bastão.

- Tampão de Extração:
Em 1 litro de água destilada, homogeneizar:
8,8 g de cloreto de sódio
44 g de sódio Citrato [5]

Caracterização do DNA

Métodos de Caracterização:

Dentre os métodos para caracterização do DNA citam-se: Eletroforese e eletrofocalização; Cromatografia; Ultra-centrifugação; Seqüenciamento: proteínas e DNA; Espectrometria: infravermelho, visível, ultra-violeta, massas, absorção atômica, dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear; Difração de Raios-X.

Depois de separado o DNA da célula desejada, pode-se utilizar os diversos métodos acima citados para se obter uma melhor caracterização deste.

- Eletroforese:

A técnica é fundamentada na separação de material orgânico (proteínas, enzimas, DNA, RNA) que apresentam cargas elétricas definidas em pHs específicos.

- Cromatografia

A cromatografia é uma técnica da química analítica utilizada para a separação de misturas e substâncias. De maneira geral, a técnica baseia-se no princípio da adsorção seletiva.

- Difração de Raios X

Estas informações são geradas pelo fenômeno físico da difração e também da interferência. Os raios X interagirão com os elétrons da rede cristalina e serão difratados.

Sugestão de roteiro para discussão das experiências com os alunos.

1. Qual a função do sal?

R: O sal proporciona um ambiente favorável para o processo de extração, pois contribui com íons positivos (Na^+) que neutralizam a carga negativa do DNA.

2. O que faz a maceração?

R: Ajuda na quebra física das membranas celulares.

3. O que acontece quando se adiciona o detergente?

R: As enzimas presentes no detergente desestruturam as moléculas de lipídios presentes nas membranas celulares.

4. Qual o papel do álcool?

R: O DNA é insolúvel em álcool e deste modo se separa da solução. O DNA tem também menor densidade que os outros constituintes celulares, por isso surge na superfície da solução.

5. Por que você não pode ver a dupla hélice?

R: A estrutura de dupla hélice só pode ser visualizada de modo indireto e através de aparelhos sofisticados. O que pode ser observado são milhares de fitas de DNA juntas.

6. Como se sabe que os filamentos são moléculas de DNA?

R: Porque a partir de estudos das propriedades químicas dos filamentos sabe-se que estes têm as mesmas propriedades das moléculas de DNA. Por exemplo, o RNA não se enrolaria no palito.[4]

Conclusão

Esses experimentos são fáceis de serem realizados e ilustram diversos conceitos da Química, da Biologia e da Física.

A partir de procedimentos simples e utilizando-se materiais de fácil aquisição, conseguiu-se extrair o DNA das células de vários produtos.

Utilizou-se, para isso, uma solução de sal (NaCl), detergente e água.

O sal contribui com íons positivos que neutralizam a carga negativa do DNA.

O detergente afeta as membranas porque elas são constituídas por lípideos. Com a ruptura das membranas, os conteúdos celulares, incluindo as proteínas e o DNA, soltam-se e dispersam-se na solução.

Em seguida, adicionou-se álcool isopropílico à solução filtrada. O DNA não se dissolve no álcool. Como resultado, o DNA aparece à superfície da solução.

A caracterização do DNA pode ser realizada por alguns dos métodos citados, como eletroforese, cromatografia ou até mesmo difração de raios X.

Referências Bibliográficas

[1] Introdução à Genética, Griffiths A., Wessler S., Lewontin R.C., Gelbart W. M., 8ª Edição, Editora Guanabara Koogan, 2006.

[2] <http://www.assis.unesp.br>, acesso em 30 de novembro de 2006.

[3] <http://www.odnavaiaescola.com>, acesso em 2 de dezembro de 2006.

[4] <http://ucbiotech.org/edu>, acesso em 15 de dezembro de 2006.

* Laiz Furlan Balioni é aluna da graduação em BC&T pela UFABC.