

Centro de Formação de Almada Ocidental  
PROFORMAR

Escola Secundária do Monte de Caparica

## **“Engarrafe o seu próprio ADN”**

**(Protocolo para a extracção de ADN das células da mucosa bucal)**

Trabalho elaborado por:

Analisa Pinto – Esc. Sec. Manuel Cargaleiro  
Carla Vaz – Esc. Sec. João de Barros  
Luís Lampreia - Esc. Sec. João de Barros  
Susana Ferreira – Esc. S/3º C.E.B. Poeta Al Berto

17 de Dezembro de 2005



## ENGARRAFE O SEU PRÓPRIO ADN

### 🔗 PORQUE SE DEVE ENSINAR A EXTRAIR O ADN?

1) A extracção do ADN proporciona aos alunos a oportunidade de conhecer o seu património genético. Os alunos ficarão entusiasmados ao observar diante dos seus olhos a substância que faz de nós seres únicos. O precipitado de ADN pode ser armazenado e preservado por muito tempo.

2) A extracção do ADN ajuda os alunos a compreenderem as propriedades deste ácido nucleico. As moléculas do ADN que constituem os nossos cromossomas são extremamente longas e finas. Solicite aos seus alunos que imaginem como é que essas longas moléculas cabem nas células microscópicas da mucosa bucal. As fibras brancas e finas que irão observar no precipitado do ADN contêm milhares de moléculas do ADN enroladas como um novelo.

3) A extracção do ADN é a primeira etapa na tecnologia do ADN.

A extracção do ADN é uma etapa de rotina em muitos dos procedimentos de biotecnologia, como por exemplo: a clonagem de genes, o mapeamento genético, a sequenciação do ADN e o “DNA fingerprinting”. Todos estes procedimentos requerem que o ADN seja extraído e isolado a partir de células ou de tecidos.

Com esta actividade experimental, os alunos ficarão a compreender que a extracção do ADN é um processo usual na investigação científica que se faz nos dias de hoje.

### 🔗 A QUE ALUNOS SE DESTINA ESTA ACTIVIDADE?

Esta actividade experimental destina-se a alunos do 11º ano de escolaridade, como introdução ao estudo do ADN ou durante o mesmo. Até os alunos que já utilizaram esta técnica em células de cebola ou kiwi ficarão entusiasmados com o facto de observarem o seu próprio ADN.

### 🔗 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

- O que é o ADN e qual a sua função?

O ácido desoxirribonucleico (ADN) é uma molécula presente nas células de todos os organismos. O ADN contém informação genética hereditária, isto é, que passa de pais para filhos. O ADN determina todas as características físicas de um indivíduo tais como a cor do cabelo, dos olhos e da pele, a altura, as características faciais, o tipo do sangue, etc. O nosso ADN é uma combinação do ADN (do ovócito) da mãe com o ADN (do espermatozóide) do pai. O ADN contém quatro unidades químicas: adenina (A), guanina (G), timina (T), e citosina (C). Estas quatro letras constituem a base do código genético. As letras do código do ADN funcionam como letras do nosso alfabeto. As 26 letras do alfabeto soletram as palavras, que se podem combinar de maneiras infinitas, criar mensagens e informação. Similarmente, as 4 letras químicas do ADN são organizadas para fazer as mensagens, que são compreendidas pelas células, chamadas genes. Estes genes contêm a informação para fazer as proteínas, que são a base para quase todas as estruturas e funções da célula.

A sequência do nosso ADN resulta da combinação ou ordem em que se encontram dispostas as 4 bases químicas, que na totalidade definem o genoma. Os cientistas determinaram que as sequências humanas do ADN são 99.9% idênticas. A variação que ocorre dentro dos 0,1% restantes é que faz de cada um de nós um ser humano único.

- Onde se localiza o ADN?

Salvo algumas excepções, o ADN é encontrado dentro de praticamente todas as células do corpo de um organismo. O organelo das células onde se encontra o ADN designa-se por núcleo.

- Qual é a estrutura da molécula do ADN?

A nível molecular, o ADN assemelha-se a uma escada em espiral. A molécula contém duas bandas de ADN ligadas por pares das letras A, G, T, e C. Esta estrutura é chamada de dupla hélice de ADN por causa da espiral ou formato helicoidal formada pelas duas cadeias de ADN. Cada cadeia de ADN é muito longa, fina e enovelada de forma a caber no núcleo das células.



Figura 1- Representação esquemática da molécula de ADN (ácido desoxirribonucleico). O ADN é uma longa cadeia que contém informação genética.

- Como podemos ver a nossa molécula de ADN?

Podemos observar o nosso ADN recolhendo células do nosso corpo, provocar a lise celular e condensar o seu ADN. Imagina as longas e finas moléculas de ADN como linhas de um novelo branco. Se as linhas fossem esticadas num quarto seriam difíceis de ver, mas se estiverem enroladas no chão já seriam visíveis. Nesta actividade experimental utiliza-se detergente e enzimas para provocar a lise das células, recolhidas do epitélio da mucosa bucal, e libertar o seu ADN. O sal e o álcool frio são adicionados para fazer precipitar o ADN da solução, numa massa que seja grande o suficiente para se ver.

- Extracção e precipitação do DNA: Como Funciona?

Os alunos iniciam esta actividade experimental mordendo delicadamente o interior das suas bochechas de forma a libertar células do interior da boca. De seguida bochecham com água para recolher as células. Ao extracto celular é adicionado um tampão de lise, que destrói as membranas celular e nuclear da célula permitindo a libertação de ADN. Também contém um tampão que permite manter a solução com um pH óptimo para garantir a estabilidade da molécula de ADN.

A protease (enzima) é adicionada para remover as proteínas (histonas) ligadas ao ADN e destruir as enzimas (nucleases) que actuam sobre o ADN. Isto possibilita a extracção de uma grande quantidade de ADN intacto. A solução é depois colocada numa estufa a 50°C, temperatura óptima para a actividade da protease.

O ADN e outros componentes celulares, tais como gorduras, açúcares, e as proteínas, dissolvem-se no tampão de lise. Este ácido nucleico tem uma carga eléctrica negativa devido aos grupos fosfato das suas cadeias e essa carga eléctrica torna-a solúvel. Quando o sal é adicionado à solução, os iões sódio (com carga positiva) do sal são atraídos pelas cargas negativas do ADN, neutralizando a carga eléctrica do ADN. Isto permite que as moléculas de ADN se juntem em vez de se repelirem. A adição do álcool frio precipita o ADN, uma vez que este é insolúvel em concentrações elevadas de sal e álcool. O precipitado de ADN começa a tornar-se visível na fronteira da camada de álcool com a solução, enquanto as outras substâncias celulares permanecem dissolvidas na solução.

## Protocolo experimental

### Materiais

**Nota importante:**

Para a realização desta actividade é necessária a aquisição de um kit (Genes in a Bottle Kit). Este encontra-se disponível no seguinte endereço:

<http://www.biorad.com/B2B/BioRad/product/>

**Bancada do professor:**

- Banho – maria a 50°C
- Etanol a 95% em gelo

**Bancada dos alunos:**

Material	Quantidade
• Tubos de 15 ml, cada um contendo 3 ml de água	4
• Microtubo de teste cor-de-rosa, etiquetado "prot", contendo 1,25 ml de solução de protease + sal	1
• Tubo de 15 ml etiquetado por "lysis" contendo 10 ml de solução tampão de lysis	1
• Pipetas descartáveis	6
• Suporte dos microtubos	1
• Caneta de acetato	1
• Copo ou taça de papel descartável para suportar os tubos de 15 ml e o subsequente desperdício.	1

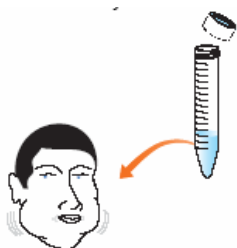
### Procedimento para a extracção e precipitação do DNA:

**Etapas 1 e 2:** Recolha e ruptura das células

Para recolher a maior quantidade possível de células da sua boca, deverá mastigar delicadamente os interiores desta durante 30 segundos e enxaguá-la com um pouco de água. É crucial recolher uma elevada quantidade de células. Para que tudo saia bem, assegure-se de que cumpre o tempo recomendado entre a recolha e a transferência das células.

1. Pegue num tubo de 15 ml contendo 3 ml da água, e etiquete-o com o seu nome.

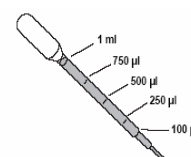
2. Mastigue delicadamente os interiores da sua boca por 30 segundos.



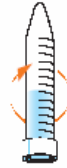
3. Verta os 3 ml de água do tubo para a sua boca e enxugue vigorosamente durante 30 segundos. Não engula a água!

4. Verta com cuidado a água de enxaguamento da boca para um tubo de 15 ml.

5. Com uma pipeta descartável, transfira 2 ml da solução tampão de lise do Kit para o tubo contendo o enxaguamento da sua boca.

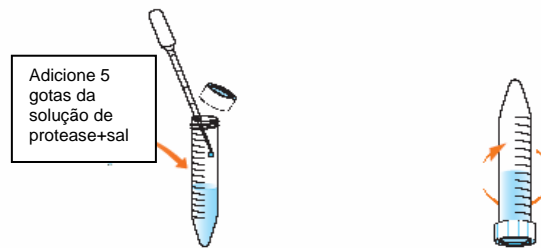


6. Tape o tubo com a tampa e inverta-o delicadamente 5 vezes para romper as paredes celulares. Não agite o tubo. Se observar quaisquer mudanças nas suas células, registre a observação.



### Etapa 3: Removendo as proteínas

1. Pegue no o tubo cor-de-rosa etiquetado como "prot" e adicione 5 gotas da solução de protease + sal ao tubo com o seu extracto de células. Tape o tubo e inverta-o delicadamente 5 vezes para misturar.



2. Coloque o seu tubo, no suporte de tubos fornecido, em banho-maria a 50°C (na estação de trabalho comum) durante 10 minutos para permitir que a protease actue.

### Etapas 4 e 5: Tornar o ADN visível

1. (Esta etapa poderá ter que ser realizada na área de trabalho comum). Enche uma pipeta descartável com etanol 95° a frio.



2. Incline o tubo contendo as suas células num ângulo a 45° e adicione o etanol, deixando-o escorrer lentamente pela parede do tubo. Encha o tubo com o álcool (cerca de 10 ml no total). Deverá conseguir-se observar a formação de duas camadas. À medida que se adiciona o álcool, preste atenção para a zona onde este e as células se juntam. Registe o que observar.



3. Coloque o tubo na vertical e mantenha-o imóvel, à temperatura ambiente, durante 5 minutos.

4. Após os 5 minutos, observe novamente o conteúdo do tubo, especialmente na zona onde o álcool e o extracto celular se encontram. Registe as observações. Compare os resultados com os outros grupos.

5. Com a tampa do tubo bem selada, misture os conteúdos do tubo invertendo-o lentamente 5 vezes. Procure observar a formação de filamentos, brancos ou translúcidos. **Isto é o seu ADN**

