

ATIVIDADE - CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO

Exercício 1. Calcule a concentração dos reagentes listados abaixo em mol L⁻¹

Tabela 1. Propriedades de ácidos inorgânicos e hidróxido de amônio.

Reagentes	Densidade (kg/L)	Porcentagem m/m
Ácido sulfúrico	1,84	95 – 98
Ácido clorídrico	1,19	36,5 – 38,0
Ácido nítrico	1,42	69,0 – 71,0
Ácido fosfórico	1,69	85,0
Ácido acético	1,05	99,7
Hidróxido de amônio	0,90	28 – 30

Exercício 2.

Fonte: Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.

(<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>)

1. EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE TECIDOS DE MAMÍFEROS

1.2. Digestão da amostra

As amostras de tecidos de origem animal ou vegetal que serão submetidas à extração e DNA devem sofrer fragmentação e digestão enzimática das proteínas. Para produzir a fragmentação, as amostras podem ser cortadas, submetidas a congelamento em nitrogênio líquido e rapidamente pulverizadas por processo manual (utilizando um bastão) ou mecânico (utilizando equipamentos para esse fim).

Quantidades da amostra (entre 200 mg e 1 g) são adicionadas a uma solução-tampão de digestão 1 (na proporção de 1,2 mL de tampão para cada 100 mg de tecido) e colocadas em banho-maria em temperatura próxima a 50°C, para que ocorra a digestão. O tempo de incubação pode variar entre oito e dezesseis horas, ou até que a amostra se apresente totalmente digerida, ou seja, apresente aspecto viscoso.

1.3. Extração do DNA com fenol

O método mais utilizado para purificação do DNA é a extração com fenol tamponado, que provoca a desnaturação das proteínas de maneira eficiente. O clorofórmio também é usado como agente desnaturante das proteínas contidas na amostra. A mistura de fenol e de clorofórmio é muito eficiente para desproteínizar e sua ação se fundamenta na propriedade hidrófoba das proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos. O álcool isoamílico previne a formação de espuma quando a mistura é agitada, o que torna mais fácil a separação da fase orgânica e da fase aquosa. A proteína que foi desnaturada pelo tratamento com fenol e clorofórmio forma uma camada na interface das duas fases, separando-se do DNA que se mantém na fase aquosa.

Para extrair o DNA de uma amostra digerida pela solução tampão de digestão 1, usar igual volume de solução de fenol + clorofórmio + álcool isoamílico (proporção 25:24:1). A extração com o fenol é dependente do pH. O fenol empregado nas extrações de DNA deve ter o pH próximo de 8,0 (fenol tamponado), já que faixas mais baixas de pH deslocam o DNA para a interface na hora da centrifugação. *Metodologia para tamponamento do fenol está descrita no Apêndice.* Após a adição da solução de extração, centrifugar a amostra por dez minutos a 1.700 g e transferir o sobrenadante para um novo tubo. ***Cuidado: A manipulação de soluções que contêm fenol exige cuidado, pelo fato de serem extremamente cáusticas, voláteis e irritantes para as mucosas.***

1.4. Purificação do DNA por meio de precipitação com etanol

A precipitação do DNA é feita por meio da utilização de etanol absoluto associado a uma solução com alta concentração de um sal catiônico. O etanol induz a transição estrutural nas moléculas de ácido, fazendo-as se agregarem, com conseqüente precipitação. A precipitação com etanol absoluto, além de concentrar o DNA, ajuda a remover resíduos de fenol e de clorofórmio presentes na amostra. O etanol a 70% é utilizado para remover resíduos de sais. Embora tanto o cloreto de sódio como o acetato de sódio e o acetato de amônio sejam eficazes na precipitação do DNA, é mais difícil remover o cloreto de sódio, em razão da sua menor solubilidade em etanol.

Procedimento: Adicionar meio volume de solução de acetato de amônio 7,5 M e dois volumes de etanol absoluto. Centrifugar a 1.700 g por cerca de dois minutos (o tempo deve ser ajustado de acordo com a amostra). Eliminar a solução alcoólica e preservar o pellet de DNA. Ressuspender o pellet em etanol a 70% (para eliminar impurezas presentes na amostra), centrifugar novamente a 1.700 g por dois minutos. Descartar o sobrenadante e deixar secar o pellet de DNA. Ressuspender o DNA em tampão TE . Para facilitar a completa dissolução do DNA nesse tampão, as amostras podem ser incubadas em agitador a 65°C por algumas horas.

Apêndice

Preparo do fenol tamponado:

- a) Colocar 250 g de fenol (liquefeito após aquecimento 65°C) em um frasco de vidro de 1 L.
- b) Adicionar 0,25 g de 8-hidroxiquinolina (antioxidante).
- c) Adicionar 250 mL de tris–base (hidroximetilaminometano) 50 mM.
- d) Agitar em temperatura ambiente por cerca de quinze minutos (usar agitador magnético). Deixar repousar a 4° C até a separação das fases. Aspirar a fase aquosa com cuidado.
- e) Adicionar 250 mL de solução tris–HCl 50 mM com pH 8,0 e novamente repetir os procedimentos dos itens "c" e "d". Verificar o pH da fase fenólica (para isso pode ser usado o papel indicador) e repetir itens "c" e "d" até que o fenol atinja o pH 8,0.
- f) Finalmente, recuperar a fase fenólica, adicionar 125 mL de solução tris–HCl 50 mM com pH 8,0 ou tampão TE (tris–HCl 10 mM, EDTA 1mM com pH 8,0) e estocar em frascos escuros a 4°C para uso por até dois meses.
- g) Nos protocolos de extração, utilizar a fase fenólica (amarelada) da solução de estoque.

Solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M (pH 8,0):

- a) Dissolver 186,1 g de Na₂EDTA.2H₂O em 700 mL de água.
- b) Ajustar o pH para 8,0 com solução de NaOH 10 M.
- c) Adicionar água ultrapura, q.s.p. 1000 mL.
- d) Esterilizar em autoclave a 121°C por quinze minutos.

Observações: 1) O EDTA é um agente quelante que impede a ação de enzimas sobre o DNA. 2) O EDTA é insolúvel em pH inferior a 8,0; por essa razão, é importante ajustar o pH antes de completar o volume.

Solução-tampão tris-HCl (hidroximetilaminometano-ácido clorídrico) 1 M:

- a) Dissolver 121 g de tris-base em 800 mL de água ultrapura.
- b) Ajustar o pH com HCl concentrado. Cerca de 70 mL de HCl são necessários para pH 7,4; e 42 mL, para pH 8,0.
- c) Adicione água ultrapura até completar 1000 mL.
- d) Autoclavar a 121°C por quinze minutos.

Obs.: O tris tem a função de manter constante o pH das soluções. Solução-tampão TE (tris-EDTA): a) Tris-HCl 10 mM, com pH 7,4, 7,5 ou 8,0. b) EDTA 1mM.

Tampão de digestão 1:

NaCl 100 mM

Tris-HCl, com pH 8,0 10 mM

EDTA, com pH 8,0 25 mM

SDS 0,5%

Proteinase K 0,1 mg/mL

Solução-tampão TE (tris-EDTA):

a) Tris-HCl 10 mM, com pH 7,4, 7,5 ou 8,0.

b) EDTA 1mM

Massa molar:

Tris, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol, $C_4H_{11}NO_3$: 121,14 g mol⁻¹ (sólido)

Na₂EDTA.2H₂O, ácido etilenodiamino-tetraacético-disódico bihidratado, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$: 372 g mol⁻¹ (sólido)

SDS, dodecil sulfato de sódio, $NaC_{12}H_{25}SO_4$: 288,37 g mol⁻¹ (sólido)

Fenol, C_6H_6O : 94,11 g mol⁻¹ (líquido)

8-hidroxiquinolina, C_9H_7NO : 145,16 g mol⁻¹ (sólido)

Acetato de amônio, CH_3COONH_4 : 77,08 g mol⁻¹ (sólido)

Responda: Considere para todas as soluções o volume de 500 mL.

- 1) Qual a massa de cada reagente no preparo do tampão de digestão 1? desconsidere o ajuste de pH.
- 2) Calcular concentração em mol L⁻¹ dos reagentes utilizado no preparo da solução fenol tamponada.
- 3) Calcule a massa da acetato de amônio usada para preparar a solução 7,5 M. Qual a massa de NH₄⁺ desta solução?
- 4) Qual o volume de etanol utilizado para preparar a solução 70%?
- 5) Qual o volume das soluções Tris-HCl e EDTA necessário para preparar a solução tampão TE? Qual a massa de Tris e EDTA desta solução?
- 6) Qual a massa de SDS e a concentração em mol L⁻¹?
- 7) Faça um fluxograma dos procedimentos, indicando todas soluções e a sequencia de procedimentos.