

I. OBJETIVOS

O principal objetivo deste experimento é o treinamento no uso de técnicas básicas de laboratório, como pesagem, filtração e extração. Pretende-se atingir esse objetivo através de um protocolo para extração de DNA de tomate. **Não se esqueça de trazer 1 tomate no dia do experimento.**

II. PROCEDIMENTO

A. Preparação

Neste experimento você necessitará de um banho-maria, de etanol gelado, de um banho de gelo e também realizará uma filtração com pressão reduzida. Por esse motivo, antes de começar o experimento:

- Em uma cuba de vidro (ou béquer de 500 mL) coloque gelo picado; em um béquer de 100 mL coloque cerca de 50 mL de etanol e coloque-o no banho para que seja resfriado.
- Monte o banho Maria usando um tripé, bico de Bunsen e tela de amianto. Coloque cerca de 300 mL de água em um béquer de 600 mL e acenda o bico. Prenda um termômetro em uma garra, prenda-a a uma mufa e deixe-o mergulhado na água em aquecimento; o bulbo do termômetro não deve tocar as paredes nem ficar próximo ao fundo do recipiente de vidro. Este banho será usado na incubação da mistura que contém o DNA e a temperatura deverá ficar entre 50 e 60°C.
- Para a filtração com pressão reduzida, use um kitassato de 125 mL, um funil de büchner e recorte um pedaço de papel de filtro de tamanho compatível com o funil selecionado. Lembre-se que todos os orifícios do funil devem ser cobertos pelo papel, o qual não deve ficar apoiado nas paredes laterais do funil. Na redução da pressão você utilizará a bomba de vácuo disponível em sua bancada com o respectivo frasco de segurança.

B. Extração do DNA

- Em um béquer de 250 mL dissolva 0,44 g de NaCl e 2,2 g de citrato de sódio em 50 mL de água. Após a completa dissolução do sal, adicione 10 mL de detergente de cozinha e agite suavemente para homogeneizar a mistura (não faça bolhas).
- Descasque um tomate, retire as sementes e pique-o, colocando os pedaços dentro de um almofariz grande. Use o pistilo para amassar o máximo possível os pedaços de tomate.
- Use um vidro de relógio e pese 30 g de tomates amassados, transferindo-os posteriormente para um béquer de 250 mL.
- Adicione suavemente ao béquer contendo os tomates a solução preparada no item (a), até que o volume da mistura seja aproximadamente o dobro do ocupado pelo tomate amassado. Esta mistura será incubada no banho-maria, em temperatura que deve ficar ente 50 e 60°C.
- Verifique a temperatura do banho-maria que deixou preparado e ajuste-a colocando água fria ou aumentando o aquecimento. Coloque o béquer com a mistura quando a temperatura estiver correta. O período de incubação é de 10 a 15 minutos, durante o qual o béquer deve ser gentilmente agitado de tempos em tempos.
- Terminado o período de incubação, o béquer deverá ser colocado em banho de gelo, onde deverá permanecer por 5 minutos. Ocasionalmente deve ser suavemente agitado. Essa mistura deverá, a seguir, ser filtrada em pressão reduzida.
- Usando garra e mufa, prenda o kitassato a um suporte universal e conecte a mangueira do frasco de segurança (certifique-se de que a válvula do frasco de segurança esteja aberta). Ajuste

o funil de büchner ao kitassato (use uma rolha que não esteja ressecada), coloque o papel de filtro e ligue a bomba de vácuo; feche a seguir a válvula do frasco de segurança e, com o auxílio de um bastão de vidro, transfira o conteúdo do béquer para o funil. O volume usado do funil nunca deve exceder a 50% de sua capacidade durante a filtração.

h) Com a filtração concluída, abra a válvula do frasco de segurança e em seguida desligue a bomba (nessa ordem!). Retire o funil e desconecte a mangueira que prende o kitassato contendo o filtrado ao frasco de segurança. Faça a homogeneização do filtrado através de movimentos circulares do kitassato.

i) Com o auxílio de uma proveta, separe 5 mL do filtrado, coloque em um tubo de ensaio grande e coloque o tubo em uma estante (*rack*). Meça o volume de filtrado remanescente, anote e coloque em um béquer de 100 mL.

j) Usando um conta-gotas ou bastão de vidro, transfira 10 mL de etanol gelado à solução do tubo de ensaio. Quanto mais gelado estiver o etanol, melhor. Faça o mesmo com o filtrado que colocou no béquer de 100 mL, adicionando ao volume contido no béquer, o dobro do volume de etanol gelado.

k) Deixe tanto o tubo de ensaio quanto o béquer em repouso por alguns minutos e observe, no tubo de ensaio, o que acontece na área onde a camada de água e a de etanol se encontram (interface). Anote.

l) O DNA do tomate formar-se-á na fase alcoólica, separando-se como um sólido gelatinoso e esbranquiçado que pode ser facilmente removido da solução.

Bibliografia

1. Abordagem química na extração do DNA, R. Lima, L.F. Fraceto, Química Nova na Escola, 25, 43-45 (2007).
2. Material disponível na página da disciplina no Stoa.
3. http://www.ucbiotech.org/edu/edu_aids/ TomatoDNA.html.