



Universidade do Minho

## **Mestrado em Supervisão Pedagógica em Ensino da(s) Ciências da Natureza/Biologia e Geologia**

Ano lectivo de 2004/2005

### **Disciplina de Biociências**

**(módulos de Biologia Celular, Conceitos de Genética e Conceitos  
de Biologia Molecular e Genómica)**

Docente: Rui Oliveira

## **Trabalho prático nº1: Extracção de DNA de vários materiais biológicos**

### **Protocolo**

#### **Material (por grupo)**

- I proveta de 100ml
- I almofariz
- I espátula
- I balança
- I bisturi ou faca
- I pinça
- Folha de alumínio
- Copo de 250-500ml
- Banho de água a 60°C
- Banho de gelo
- I funil
- I suporte para funil
- Papel de filtro
- I copo de 200ml
- 2 varetas de vidro
- 2 provetas de 10ml
- I tubo de ensaio
- I suporte para tubos de ensaio
- 100ml de solução de extracção de DNA (sal 2% p/v, detergente 10% v/v)
- 10ml de álcool (gelado)

#### **Procedimento**

1. Remover a parte exterior do material biológico com o bisturi, cortar em pedaços pequenos e pesar cerca de 30g.
2. Colocar o material num almofariz e homogeneizar.
3. Adicionar 100ml de *solução de extracção de DNA* e transferir todo o material para um copo de 250-500ml.
4. Colocar o copo num banho maria a 60°C durante 10-15min com agitação ocasional para distribuir o calor.
5. Transferir o copo para um banho de gelo e manter durante 5min com agitação ocasional.
6. Filtrar a mistura de extracção por um filtro de pregas e recolher o filtrado num copo de 200ml.
7. Transferir 5ml do filtrado para um tubo de ensaio e adicionar álcool gelado lentamente de modo a não se misturar com o extracto.
8. Colocar o tubo de ensaio num suporte e observar e anotar o que acontece na zona de contacto entre o extracto e o álcool.
9. Manter o tubo na mesma posição durante 2min e recolher o DNA com uma vareta de vidro.

Fazer a análise crítica do protocolo e dos resultados. Elaborar duas questões para discussão.

Tópicos de discussão:

- Qual é o objectivo do uso de detergente?
- Como é que se adaptaria este procedimento para extracção de DNA de sangue? Qual a utilidade desta extracção?

- O núcleo de cada célula humana tem cerca de 2m de DNA. Tente arranjar uma explicação sobre o arranjo do DNA nos núcleos celulares.
- Haverá contaminantes no DNA obtido?

## **Trabalho prático nº2: Análise de DNA por electroforese em gel de agarose**

### **Protocolo**

#### **Material**

Erlenmeyer de 250ml

Espátula

Balança

Microondas

Tina de electroforese

Fonte de electroforese

Micropipetas P20 e P100

Pontas para micropipeta amarelas

Microtubos

Transiluminador de UV

Tampão TAE (solução 50x: tris base 242g; ácido acético glacial 57,1ml; EDTA 0,5M, pH 8,0, 100ml; água desionizada q.b.p. 1000ml)

Água ultra-pura

Tampão de amostra (solução 6x: azul de bromofenol 0,25% p/v; xileno de cianol FF 0,25% p/v; glicerol 30% p/v)

Brometo de etídeo 0,5µg/ml

#### **Procedimento**

##### **Preparação do gel de agarose**

1. Preparar uma solução de agarose em tampão TAE com concentração final de 0,8% (p/v). Aquecer a mistura em microondas, com agitação frequente, até toda a agarose se ter dissolvido.
2. Colocar o tabuleiro da tina de electroforese no respectivo suporte de preparação do gel ou, na sua falta, selar com fita adesiva de autoclave.
3. Colocar o pente em posição conveniente no tabuleiro para um correcto posicionamento dos poços: distância à extremidade e à base do gel.
4. Verter a agarose no tabuleiro até uma altura de ~5mm. Eliminar bolhas de ar que se tenham formado, aspirando com uma micropipeta e deixar solidificar à temperatura ambiente.
5. Quando o gel se tiver formado, retirar lentamente o pente para não danificar os poços, colocar o tabuleiro na tina de electroforese, de modo a que os poços estejam do lado do eléctrodo negativo, e adicionar tampão TAE até ~1mm acima do gel.

##### **Preparação das amostras**

6. Para cada amostra, misturar num microtubo: 100-500ng de DNA, 4µl de tampão de amostra (5x conc.) e água ultra-pura q.b.p. 20µl.
7. Aplicar as amostras nos respectivos poços, enchendo lentamente cada poço com uma micropipeta. Não deixar extravasar a amostra do poço para não contaminar os poços vizinhos.
8. Colocar a tampa da tina. Verificar que as amostras estão colocadas do lado do polo negativo (cátodo, eléctrodo de cor preta) e que a migração será no sentido do polo positivo (ánodo, eléctrodo de cor vermelha).

9. Ligar os cabos à fonte de electricidade. Ligar a fonte e regular para uma voltagem de 1-5V/cm (distância medida entre os eléctrodos). Verificar se há desprendimento de bolhas dos eléctrodos devido à electrólise e se, passados alguns minutos, o azul de bromofenol já começou a migrar no sentido correcto.
10. Após migração julgada conveniente (por avaliação da posição do azul de bromofenol a sensivelmente 3/4 do comprimento do gel), desligar a corrente eléctrica na fonte, desligar os cabos e retirar a tampa da tina. Retirar o gel cuidadosamente para não partir e corá-lo em banho numa solução de brometo de etídeo 0,5µg/ml, durante 30-45min à temperatura ambiente. **O brometo de etídeo é um agente mutagénico potente, usar sempre luvas e colocar em recipiente próprio todo o material que tenha entrado em contacto com este corante**
11. Examinar o gel à radiação ultra-violeta e fotografar para arquivar. **As radiações U.V. são extremamente perigosas, particularmente para os olhos, provocando lesões na retina. Evitar qualquer exposição dos olhos a estas radiações. Usar sempre óculos protectores ou máscaras de material opaco aos U.V.**

Fazer a análise crítica do protocolo e dos resultados. Elaborar duas questões para discussão