

ANNEX 1

Pràctica: Extracció de l'ADN

Per a complementar el treball, he realitzat una pràctica d'extracció d'ADN. D'aquesta manera, es pot veure el metodologia utilitzada a l'hora de treballar al laboratori, una part important de les ciències que no s'ha pogut tractar durant la realització del meu treball.

La pràctica consisteix a extreure l'ADN d'un fetge de conill. Per arribar a seqüenciar aquest ADN, el procés és molt més complex. Amb la infraestructura de la que dispo al laboratori de l'institut, m'hagués estat impossible realitzar-la, però la pràctica realitzada és bastant propera a la temàtica del treball. A més, estava al meu abast.

Degut a la manca de determinats reactius, n'hem utilitzat d'alternatius. Per tant, no hem pogut seguir estrictament les pautes de la pràctica original.

MATERIAL

- 10 g de fetge de conill
- Dissolució de 90 ml d'aigua destil·lada, 10g de NaCl i 10 ml de detergent
- Alcohol etílic de 96°
- Batedora
- Balança
- Vidre de rellotge
- Ganivet
- Embut
- Pipeta
- Vareta de vidre
- Vasos de precipitats (de 250 cc)
- Pipeta aforada (10 ml i 50 ml)
- Bureta
- Gassa espessa per a filtrar
- Orceína B (La pràctica original utilitzava hematoxilina o Orceína acètica a l'1%)
- Portaobjectes
- Cobreobjectes
- Solució d'indicador vermell fenol: afegir una punteta d'indicador en 100 ml d'aigua destil·lada fins que quedi un lleuger color ambre (n'hem prescindit, ja que no el teníem a l'abast)
- Suc de pinya

TÈCNICA DE TREBALL

- 1) Col·loquem el vidre de rellotge sobre la balança, i la calibrem. Amb un ganivet tallem una part petita del fetge, i l'anem pesant fins a obtenir 10 g aproximadament.
- 2) Aboquem sobre un vas de precipitats de 250 ml (suficient com per a treballar amb la batedora) 50 cc d'aigua corrent, mesurats amb els indicadors del got aproximadament, i els 10 g de fetge. A continuació ho triturarem amb la batedora, aconseguint que es trenquin les membranes citoplasmàtiques de les cèl·lules hepàtiques i els nuclis quedin lliures.

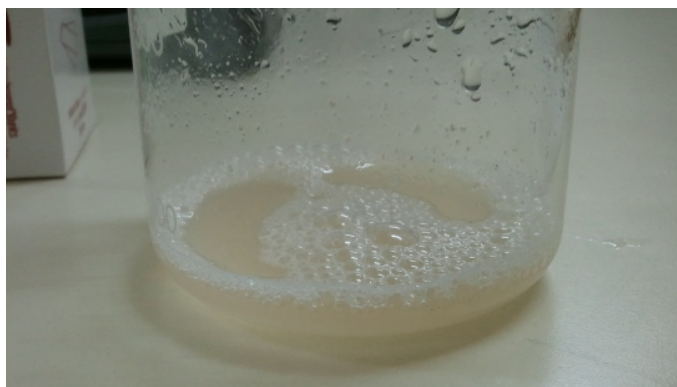


Fig. 1. Resultat de la dissolució d'aigua i el fetge triturat (imatge pròpia)

- 3) Esperarem uns minuts a que sedimentin les partícules més grans i després filtrem el triturat, per tal de poder separar les restes de teixit que no s'han trencat. Per a fer-ho, col·loquem la gassa sobre un embut, i passem el contingut del vas de precipitats utilitzat, a un de nou.
- 4) Realitzem una dissolució de detergent i sal: amb una bureta mesurem 90 ml d'aigua destil·lada, i els dipositem a un vas de precipitats de 250 cc. Després, mesurem 10 g de NaCl, i els aboquem a la dissolució junt a 10 ml de detergent (mesurats amb una pipeta aforada de 10 ml).
- 5) Afegim 10 ml de la dissolució de detergent i sal amb una pipeta aforada de 10 ml: es provoca el trencament de la membrana dels nuclis, de manera que queden lliures les fibres de cromatina.
- 6) Amb un comptagotes, afegim 3 o 4 gotes de suc de pinya, la funció del qual és eliminar les proteïnes que es troben formant part de la cromatina i separar-les de l'ADN, i ho barregem bé.

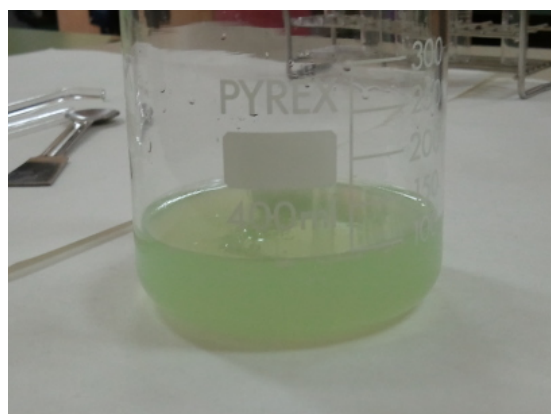


Fig. 1. Resultat de la dissolució d'aigua, fetge, detergent, sal i suc de pinya. (imatge pròpia)

- 7) Amb l'ajut d'una pipeta de 50 cc aboquem aquesta quantitat d'alcohol 96° a la nostra dissolució. Ho fem de forma que l'alcohol llisqui per les parets del got i s'arribin a formar dues capes: entre les dues capes es precipita l'ADN.
- 8) Aboquem part del contingut a un tub d'assaig. Afegim 5 gotes de solució de l'indicador vermell fenol: si hi ha ADN l'indicador canvia al color rosa-vermell. En el nostre cas, aquest pas no l'hem realitzat: no disposàvem de l'indicador, i hem suposat que ja hi havia el contingut d'ADN.
- 9) Introduïm la vareta de vidre i la fem rodar. Així observem que damunt la vareta es van dipositant unes fibres blanques, que són el resultat de l'agrupament de moltes fibres d'ADN.

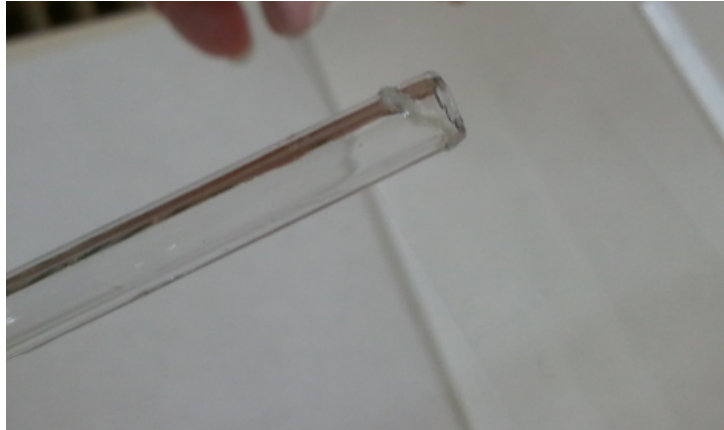


Fig. 3. Agrupament de fibres d'ADN sobre la vareta de vidre. (imatge pròpia)

- 10) Dipositam aquestes fibres sobre un portaobjectes. Fixem la mostra amb foc (en el nostre cas no en teníem, ja que el bec bunsen de l'institut no funcionava), i afegim unes gotes d'orceïna B. Normalment s'utilitza junt a l'orceïna A, però no l'hem necessitat: la seva funció es ablanir les membranes per a poder tenyir posteriorment el material genètic amb l'orceïna B, i nosaltres ja disposàvem de les fibres d'ADN exposades. Esperem 2 o 3 minuts, i sense arrossegat les fibres, rentem la preparació amb aigua destil·lada, assequem les bores, i col·loquem el cobreobjectes.

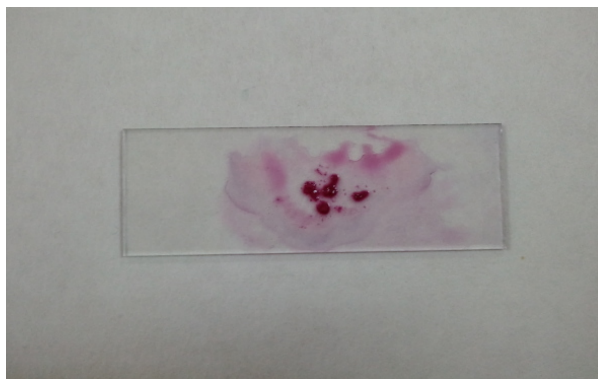


Fig. 2. Imatge de les fibres, ja tenyides, sobre el portaobjectes abans de col·locar-hi el cobreobjectes. (imatge pròpia)

- 11) Observem al microscopi.

RESULTATS

Hem intentat identificar les possibles fibres d'ADN de la mostra al microscopi, i deduïm que per la forma, mida i possible semblança, són uns filaments allargats que queden tenyits més foscos. No tenim manera de comprovar al 100% que ho siguin, ja que podem trobar diversos artefactes.

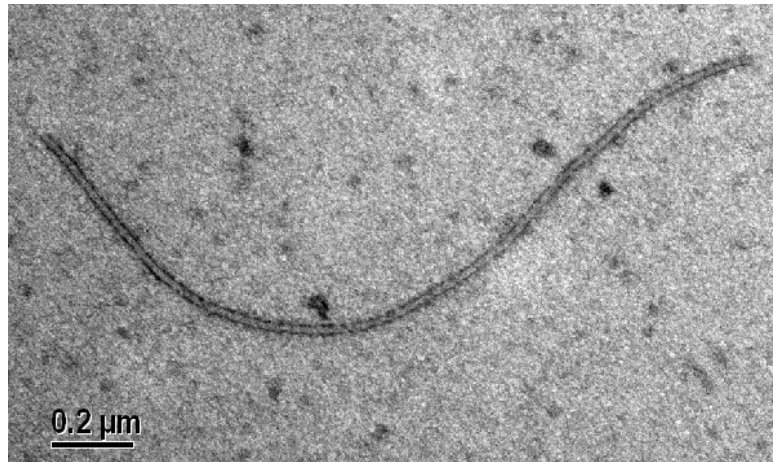


Fig. 5 Imatge de la fibra d'ADN al microscopi (imatge:
http://www.biosistemika.com/uploads/13_RSPaV_6J_70dpi.jpg)