

Investiga entorn dels orígens genètics de l'obesitat

Extreu el teu propi DNA



Taller d'experimentació
PROTOCOL



Xplore
Health

www.xplorehealth.eu

Introducció

L'augment de la incidència de l'obesitat s'està donant en general a tot el món. Preocupats per l'amenaça que comporta per a la salut, científics i metges tracten d'entendre què fa que la població es torni obesa per així poder dissenyar estratègies de tractament i prevenció.

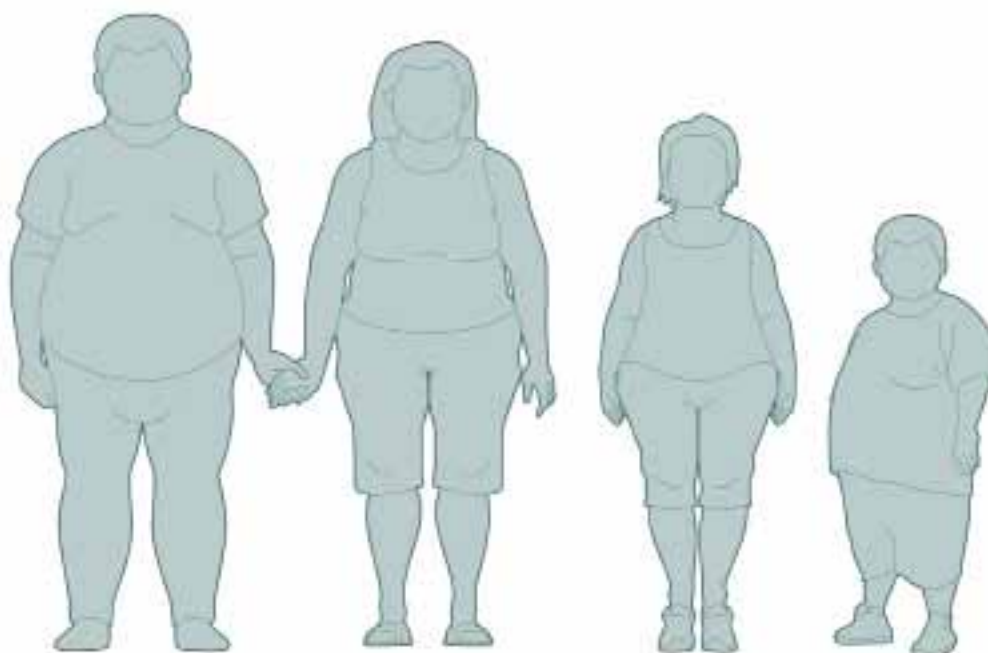
L'obesitat, en alguns casos, acaba derivant en una Diabetis Mellitus tipus II (DMII). La diabetis és una malaltia caracteritzada per alts nivells de glucosa en sang.

Una persona amb sobrepès té més greix al voltant de les cèl·lules i això dificulta al cos l'ús de la insulina de manera correcta. La insulina és una hormona que fa que les cèl·lules del fetge, dels músculs i del teixit adipós agafin la glucosa de la sang, que aquesta sigui emmagatzemada en forma de glicogen al fetge i als músculs, i que s'aturi l'ús del greix com a font d'energia.

Els antecedents familiars juguen un paper molt important en la predisposició a l'obesitat i a la diabetis de tipus II. Tenir familiars amb obesitat i que pateixen aquest tipus de diabetis augmenta de forma considerable el risc de desenvolupar la malaltia.

Dades clau sobre l'obesitat i el sobrepès:

- L'obesitat a tot el món s'ha més que duplicat des de 1980.
- El 2008, 1.500 milions d'adults de 20 anys en endavant tenien sobrepès.
- El 65% de la població mundial viu a països on el sobrepès i l'obesitat són una de les principals causes de mortalitat.
- Gairebé 43 milions d'infants menors de 5 anys tenien sobrepès el 2010. (Dades de l'ONU, març de 2011)



La recerca dels orígens genètics de l'obesitat

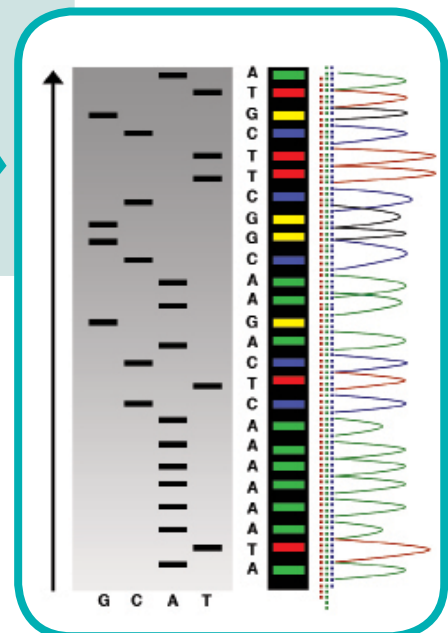
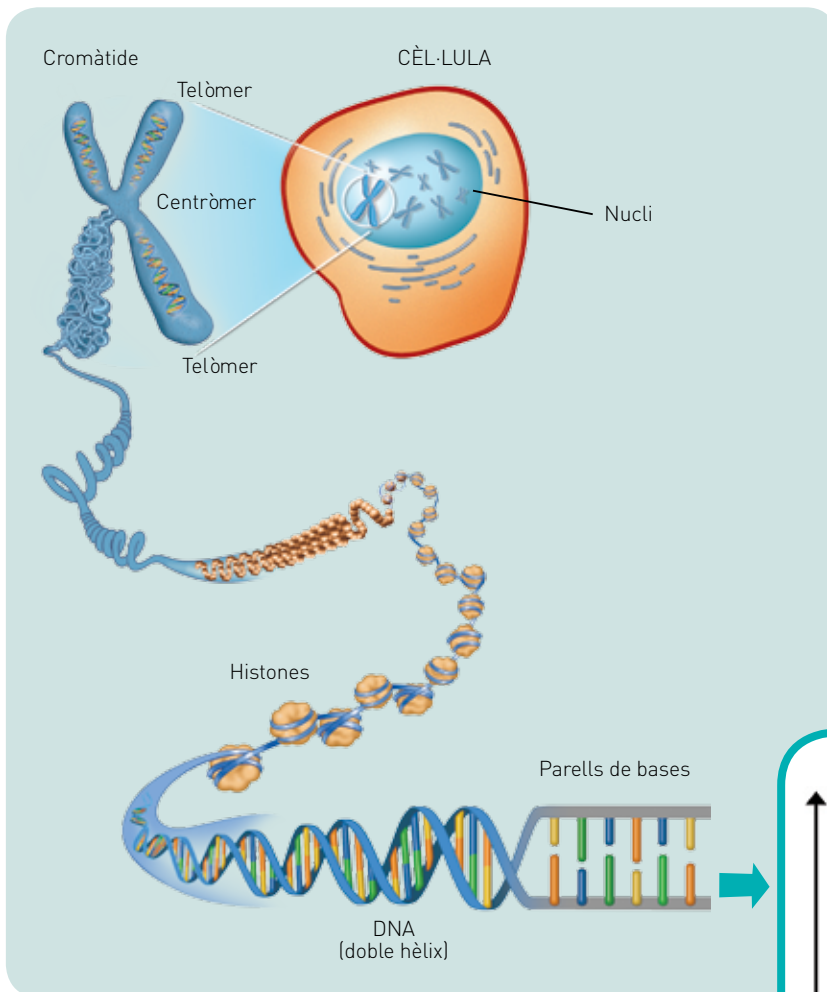
Per estudiar el factor de risc potencial associat als factors hereditaris de la diabetis mellitus de tipus 2, els científics basen la seva recerca en el DNA. Per fer-ho estudien mostres de DNA d'individus obesos i diabètics i les comparen amb mostres d'individus normals per cercar diferències.

La recerca la duen a terme primer amb rates, a les quals extreuen el DNA de cèl·lules de

múscul així com també de teixit adipós. El DNA de les rates el seqüencien, per poder obtenir l'ordre lineal dels nucleòtids.

Aquesta línia de recerca ja ha permès identificar un gen que es va anomenar DOR (Diabetes and Obesity Regulated), que es comporta diferent en rates diabètiques i obeses que en rates normals (es troba menys expressat).

Per seqüenciar aquests gens, els científics han de primer extraure el DNA.



Què és el DNA?

El DNA o àcid desoxiribonucleic és una molècula orgànica encarregada d'emmagatzemar la informació genètica necessària pel desenvolupament i funcionament dels organismes vius, a excepció d'alguns virus.

On es troba?

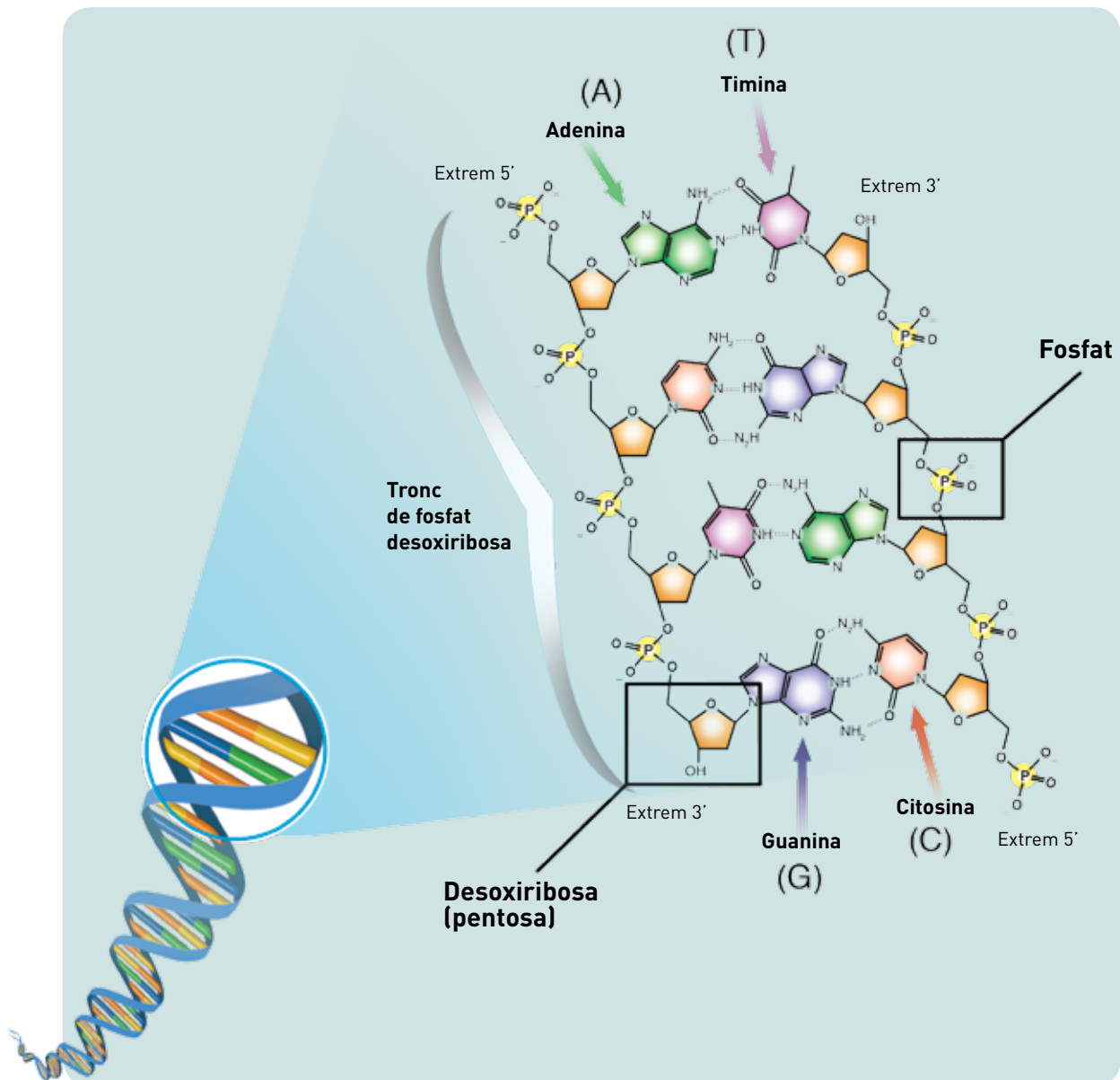
Es troba a tots els organismes vius. Als bacteris, el DNA es troba al citoplasma, mentre que a organismes més complexos, com plantes, animals i altres organismes multicel·lulars, la major part està situat al nucli. El DNA està compactat en cromosomes, on es troben codificades les instruccions essencials que faran que un organisme es desenvolupi i pugui viure.

Aquestes instruccions són els gens, que són la unitat d'emmagatzematge de la informació i els encarregats de transmetre aquesta informació a la descendència.

Com està format?

El DNA és una molècula composta per repeticions de tres tipus de molècules: una base nitrogenada, un grup fosfat i una pentosa. Cada unitat formada per aquests tres tipus de molècules rep el nom de monòmer, i, donat que el DNA presenta moltes repeticions de monòmers, diem que es tracta d'un polímer.

Cadascun d'aquests monòmers és el que anomenem nucleòtids, que contenen diferents bases (conegudes com A, C, G, T) ordenades en seqüència i formant així una espècie de codi de barres.



Objectius

El nostre objectiu és aconseguir extraure el DNA de les nostres pròpies cèl·lules de manera fàcil i ràpida

Us heu preguntat mai com ho fa la policia per extraure el DNA de les mostres que troba a l'escena del crim? Com aconseguixen els científics obtenir aquest DNA separat de les cèl·lules i aïllar-lo d'entre lípids, proteïnes, glúcids i sals?

Metodologia

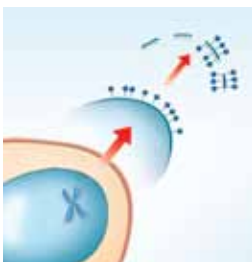
1 Obtindrem la mostra



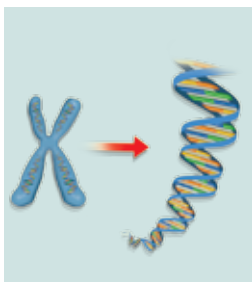
El primer pas serà obtenir les cèl·lules de les quals farem l'extracció del DNA. Aquestes cèl·lules s'obtenen de manera molt fàcil rasant les parets de la boca i la llengua.

2 Alliberarem el contingut de les cèl·lules

Tot seguit, comencem a tractar la nostra mostra en el següent ordre:



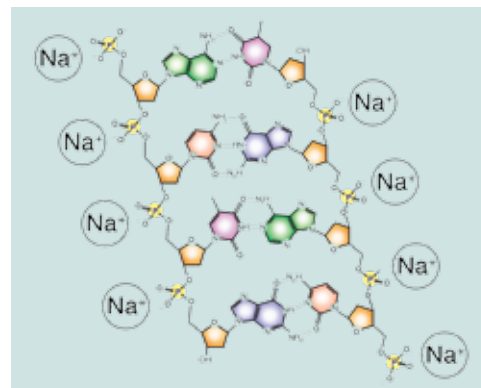
1. Lisi: és el procés mitjançant el qual es trenquen les membranes cel·lulars i nuclears. Les membranes es trenquen amb detergents, que alliberaran el DNA a la solució.



2. Descompactem el DNA: Utilitzarem la proteinasa K, que és un enzim que degrada proteïnes que estaven unides al DNA i que el mantenen compactat. Per tant, quan actua, el DNA es descompacta i

ahora també degrada altres molècules orgàniques que es troben a la nostra mostra,, com ara uns enzims que tenen com a funció trencar el DNA, les anomenades DNases.

3. Neutralitzem la càrrega del DNA: Per fer-ho utilitzarem una sal que té molts usos: l'acetat de sodi (NaAc). Els ions Na^+ s'uneixen als grups fosfat del DNA, amb una forta càrrega negativa.



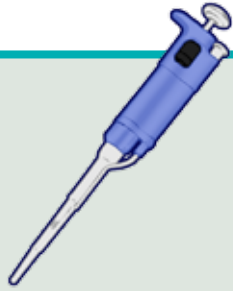
3 Precipitarem el DNA

L'últim pas de tot és la precipitació del DNA, mitjançant el qual aconseguim passar de l'invisible al visible. Per fer-ho, utilitzarem etanol. El DNA és soluble en aigua, però a l'afegir l'etanol, es desenrotlla i precipita. Després d'afegir l'etanol, veurem com comencen a aparèixer uns filaments blancs en suspensió. Aquest serà el nostre DNA.



Equipament i material necessari

Instruments i estris de laboratori



Micropipeta 20 a 200 μ l

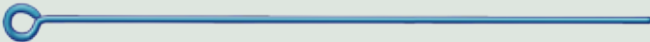


Micropipeta 1 a 5ml

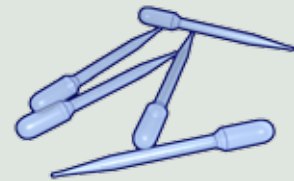


Temporitzador

Material fungible



Paleta per rascar la boca



Pipetes pasteur de plàstic



Tub falcon de 15ml



Puntes per a micropipeta



Puntes per a micropipeta més gran



Retolador permanent



Guants, bata i ulleres

Reactius i dissolvents



Solució de lisi, formada per sals i detergents



Solució de proteïnasa K



Solució d'acetat de sodi (NaAc)



Etanol fred (guardar al congelador a -20°C)

Procediment

A

Extraiem les cèl·lules epitelials

El primer pas sempre és aconseguir una bona mostra. Ho farem a partir de mostres que extraurem de la boca, on s'hi troben moltes cèl·lules mortes que es desprenen i que contenen una gran quantitat de DNA.

1

Preparem un tub falcon amb 1ml de solució de lisi. Deixem el tub obert per facilitar els següents passos.

1 ml solució de lisi



2

Rasquem fort la boca amb una rasqueta durant 2 minuts, arrossegant la punta rodona per les parets de la boca i, sobretot, pel damunt de la llengua. D'aquesta manera aconseguirem suficient quantitat de cèl·lules.

Posem la rasqueta dins del tub falcon amb la solució de lisi i barregem breument.

Traiem la rasqueta de dins del tub i la llancem directament (és important no tornar-la a posar a la boca).



3

Saliveu força per acabar d'arrossegant les cèl·lules que s'han després de l'epitel·li.

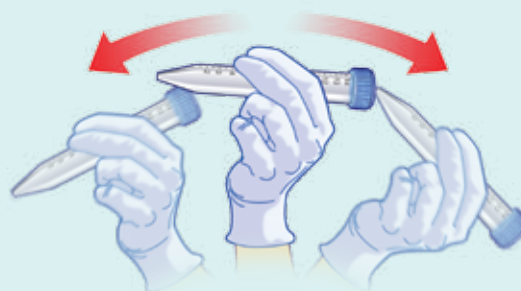
Agafeu aquesta saliva amb una pipeta Pasteur i fiquen tot el contingut al mateix tub on teniu la mostra anterior.

Com més saliva hi hagi més DNA obtindrem!



4

Tanqueu bé el tub i barregu-lo per inversió.

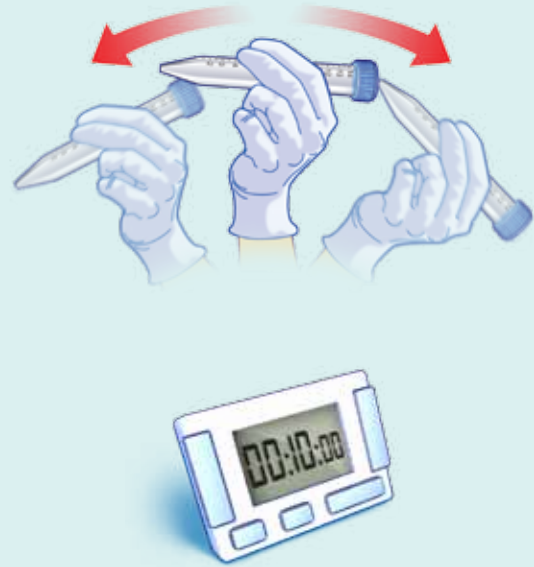


B**Alliberem el contingut de les cèl·lules****1**

Afegim 20 μ l de Proteïnasa K per a trencar les proteïnes, recolzant la pipeta a la paret del tub i deixant que regalimi.

**2**

Tanquem bé el tub i barregem per inversió. Deixem incubar durant 10minuts.

**C****Precipitem el DNA****1**

Calculem la quantitat de volum (V) recollit de forma aproximada, mirant la gradació del tub.

Apuntem aquí el volum que tenim:

V= _____ ml

2

Afegim una desena part del volum (V/10) de solució NaAc a la mostra.

Per exemple, si tenim 1ml del volum inicial afegirem 100µl d'acetat de sodi:
 $1\text{ml}=1000\mu\text{l}$ $1000\mu\text{l}/10=100\mu\text{l}$ que haurem d'afegir.

Fes aquí els teus càlculs:

Tanquem el tub i agitem bé per inversió.



3

Afegim tres cops el volum inicial (Vx3) d'etanol fred.

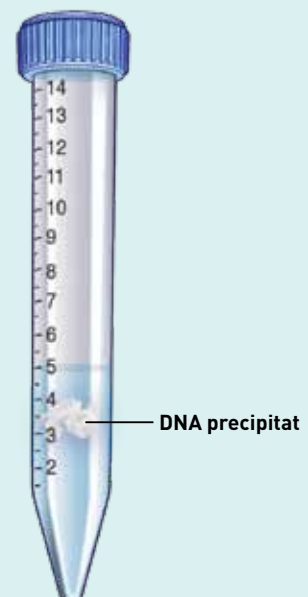
Per exemple, a una mostra que inicialment tenia 1ml, li haurem d'afegir 3ml d'etanol:
 $1\text{ml} \times 3 = 3\text{ml}$ d'etanol

Fes aquí els teus càlculs:



4

Barregem molt lentament per inversió. El nostre DNA apareixerà en forma de precipitat blanquinós.



Resultats i conclusions

?

1. Al final de la pràctica, què has vist? Què ha provocat finalment aquest resultat? Per què?

?

2 - Què hagués passat si l'últim pas de precipitació l'haguéssim fet amb aigua freda en comptes d'etanol?

?

3 - Si no haguéssim fet un primer pas de lisi, quin creus que seria el resultat?

?

4 - Per què creus que és important afegir la Proteïnasa K? Fes un dibuix del què creus que ha passat quan l'has afegit.

Annex I

PRECAUCIONS DE SEGURETAT

Informa't

Localitza els elements de seguretat del laboratori o l'espai habilitat per experimentar (extintors, dutxes o bany, sortides, etc). Llegeix atentament les instruccions abans de fer un experiment. No oblidis llegir les etiquetes de seguretat de reactius i aparells.

Utilitza vestimenta adequada

Guants, bata i ulleres de protecció.

Normes generals

Està prohibit fumar, menjar o beure al laboratori o l'espai habilitat per experimentar. Treballa amb ordre, netedat i sense presses. Si es vessa un producte, recull-ho immediatament. Deixa sempre el material net i endreçat. No utilitzis mai un equip o aparell sense conèixer perfectament el seu funcionament. Renta't les mans abans de deixar el laboratori.

Manipulació del vidre

Protegeix les teves mans quan manipulis material de vidre i estigues atent a la seva temperatura, ja que el vidre calent no es distingeix del fred. No utilitzis vidre esquerdat.

Productes químics

No utilitzis cap flascó de reactius al que li falti l'etiqueta o que no estigui degudament identificat. No oloris, inhalis, provis o toquis els productes químics. No pipetegis mai amb la boca. Posa't guants i renta't les mans sovint si utilitzes productes tòxics o corrosius. En cas de contacte amb els ulls, neteja-te'ls immediatament amb aigua abundant. No apropis envasos de reactius a una flama. No escalfis líquids inflamables. Transporta les ampolles agafades del fons, mai de la boca.









Eliminació de residus

Diposita en contenidors especials i degudament senyalitzats tant els residus sòlids com líquids que així ho requereixin. Si tens algun dubte consulta l'educador. En cap cas s'abocaran residus sòlids a la pica.

Recorda

En cas d'accident, avisa immediatament a l'educador.

PRECAUCIONS ESPECÍFIQUES PER A AQUEST TALLER

- SDS:  tòxic per ingestió, inhalació i contacte amb la pell.
- Tris-Base:  tòxic per ingestió, inhalació i contacte amb la pell. Irritant.
- HCl:   tòxic per ingestió, inhalació i contacte amb la pell. Irritant i corrosiu.
- Acetat de sodi:  tòxic per ingestió, inhalació i contacte amb la pell.
- Proteïna K:   tòxic per ingestió, inhalació i contacte amb la pell.
- Etanol:  inflamable.

Annex II

Procediments per a la preparació de les solucions

Recepta Solució de lisi (recomanem que aquesta solució la prepari prèviament l'educador donada la toxicitat d'alguns compostos a una elevada concentració. Prepareu la solució fent ús de mascareta. Un cop dissolt, ja no serà necessari fer-ne ús).

Per 50ml:

- NaCl= 0,292gr
- SDS= 5ml SDS 10%
- Tris HCl= 2,5ml pH 8

Recepta NaAc

Per 40ml:

- 9,84gr NaAc. Afegir HCl fins arribar a un pH de 5,2.

Recepta Proteïnasa K

- 100µg/ml (mantenir-la congelada)

Annex III

Referències per a la compra dels reactius i alguns dels materials necessaris

NOM	REFERÈNCIA	CASA COMERCIAL
NaCl	71381	Fluka-Sigma
SDS	71725	Fluka-Sigma
Tris-Base	93350	Fluka-Sigma
HCl	320331	Sigma-Aldrich
NaAc	S2889-250G	Sigma-Aldrich
Proteïnasa K	P6556-100mg	Sigma
Etanol	141086.1214	Panreac
Nansa de sembra estèril		Sanilabo

Xplore Health

DISCOVER THE LATEST ON HEALTH RESEARCH

Continua investigant a Xplore Health!



➔ www.xplorehealth.eu

Investigadors que han contribuït amb continguts: Lorena Valverde, Investigadora de la Universitat de Barcelona

➔ DESENVOLUPAT PER



➔ FINANÇAT PER



Aquesta obra està sota una llicència Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported de Creative Commons. Per a veure una còpia d'aquesta llicència, visita <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>