

EXTRACCIÓN DE ADN



BIOLOGÍA GENERAL
(Evolución y Genética)

Curso Académico 2015-2016
Abril 2016

INTRODUCCIÓN Y CONCEPTOS

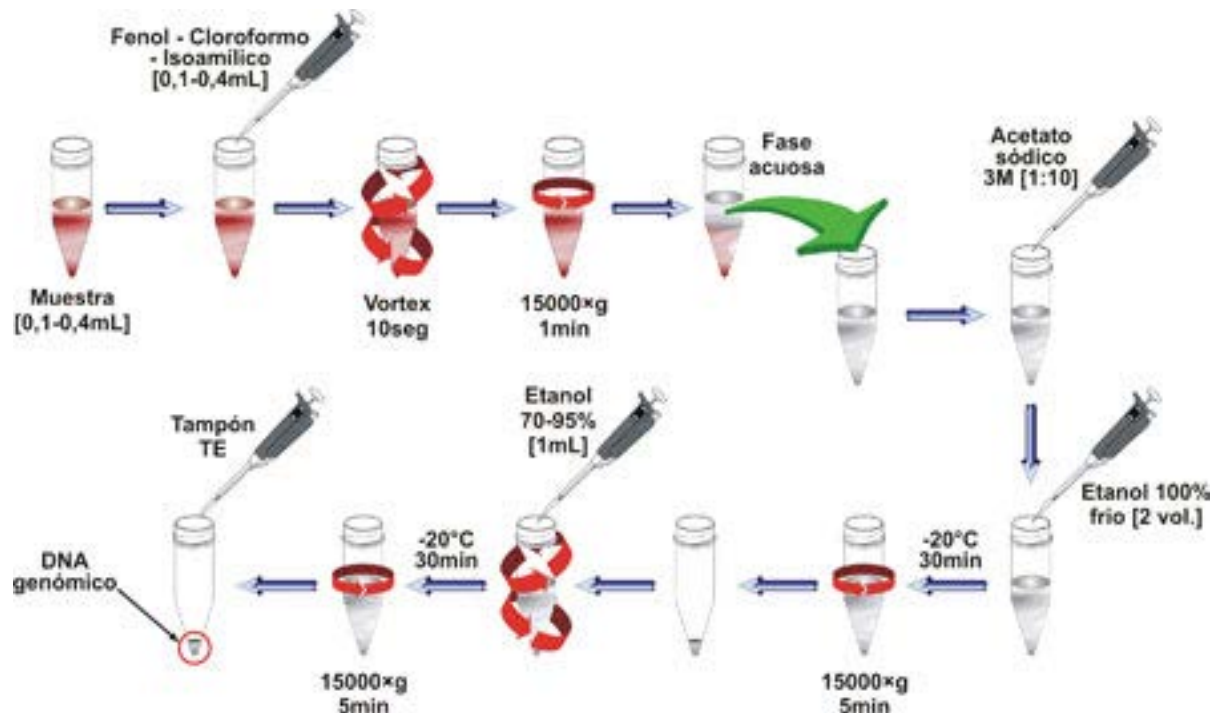
Extracción de ADN

La extracción de ADN requiere una serie de etapas básicas. En primer lugar, tiene que romperse la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula, y posteriormente romperse también la membrana nuclear para dejar libre el ADN. Además de proteger el ADN de enzimas que puedan degradarlo.

La lisis de las células se consigue mediante la adición de tampones con concentraciones elevadas de iones que ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas y que forman parte de su estructura celular. La adición de un detergente como el SDS (Dodecil Sulfato Sódico) es necesaria a menudo para eliminar las membranas. Generalmente, el ADN se encuentra asociado a proteínas, por lo que se suele añadir proteasas al tampón de extracción, a la vez que usamos el acetato (amónico o sódico) para precipitar dichas proteínas.

El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar con etanol frío o isopropanol y recuperar mediante un proceso de centrifugación. El sedimento o pellet resultante se puede re-suspender posteriormente en agua o tampón tras ser secado completamente. La confirmación de la presencia de ADN se lleva a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa y que posteriormente se tiñe con Gel Red o Midori Green y observación con luz UV. También se puede detectar directamente al espectrofotómetro mediante espectro de absorción de 200 a 350nm. El ADN purificado se cuantifica con un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260nm de longitud de onda. O midiendo directamente las concentraciones en un Nanodrop.

Esquema extracción de ADN



Cuantificación de ácidos nucleicos

El espectrofotómetro es una herramienta muy utilizada en Bioquímica y en Biología Molecular. Sus aplicaciones son muy variadas, tales como el análisis cualitativo de pureza de muestras, la cuantificación de ADN, proteínas u otros reactivos, medición de la densidad óptica, análisis de espectros de absorción, etc. Su fundamento reside en la premisa de que muchos compuestos absorben o dispersan luz de unas longitudes de onda determinadas, bien en el espectro ultravioleta (de 200 a 400nm), el visible (de 400 a 700nm) o el infrarrojo cercano (700 a 900nm).

Las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos tienen la capacidad de absorber luz ultravioleta, con un máximo a 260nm. Esta propiedad puede ser utilizada para calcular la concentración y pureza de los ácidos nucleicos gracias al empleo de un espectrofotómetro. En el caso del ADN bicatenario, una unidad de absorbancia a 260nm ($A_{260} = 1,0$) corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Una solución de ADN puro de doble cadena presenta una relación A_{260}/A_{280} de 1,8 mientras que la presencia de proteínas o fenol disminuye esta relación: las

proteínas absorben a 280nm debido a los anillos aromáticos. La presencia de ARN en una preparación de ADN hace aumentar la relación A260/A280 por encima de 1,8 debido al efecto hipercrómico (dos cadenas sencillas absorben más que una doble), de forma que la relación A260/A280 para el RNA puro es de 2,0. Cuando el RNA (y también el ADN) está contaminado de nucleótidos (por ejemplo, debido a degradación), la relación A260/A280 es superior a 2,3. Otra medida de absorbancia que nos determina la presencia de impurezas (enlaces peptídicos) es A230. Cuando la absorbancia a esta longitud de onda es mayor que 0,30 nos indica que debemos purificar las muestras.

Si se expone por mucho tiempo la muestra vegetal a rayos ultravioletas, esto provoca daños sobre la estructura del ADN, o aplicar ciertos conservantes que puedan provocar efectos sobre la cadena del ADN.

Electroforesis en geles de agarosa

La mayoría de los polímeros biológicos, tales como proteínas y ácidos nucleicos, tienen grupos ionizables que normalmente les confiere carga negativa en disolución acuosa. En el caso específico del ADN la ionización de las moléculas es una función directa del número de nucleótidos (pares de bases en una molécula de ADN bicatenario) de los fragmentos disueltos. Por lo tanto, si sometemos un conjunto de moléculas de ADN de diferentes tamaños a un campo eléctrico, se producirá una migración diferencial consecuencia de su diferente ionización y de su tamaño desigual, finalizando en una separación física de las mismas. Esta es la base físico-química de la electroforesis, y es aplicable a cualquier polímero biológico susceptible de ionizarse.

La electroforesis se realiza en diferentes tipos de matrices o geles, que actúan a modo de red o tamiz. Estos geles permiten una mayor estabilidad y precisión en el proceso de separación. Para el caso específico de la electroforesis de fragmentos de ADN se emplean los geles de agarosa, un polímero obtenido de las algas rojas (Rodofitas).

OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

1. Objetivos específicos prácticos.

Los alumnos deberán ser capaces de:

- a) Familiarizarse con las distintas etapas del proceso de extracción del ADN.
- b) Identificar y caracterizar los fragmentos de ADN amplificados y separados.

2. Objetivos específicos teóricos.

Los alumnos deberán ser capaces de:

1. Describir la molécula de ADN y sus propiedades físico-químicas.
2. Identificar la molécula de ADN como polímero biológico responsable de la información genética de un organismo.
3. Determinar la función de los diferentes elementos utilizados en la extracción de ADN.
4. Identificar la base físico-química de la técnica de electroforesis en agarosa.

PROCEDIMIENTO EN EL LABORATORIO

OBJETIVOS

1. Realizar la extracción de ADN vegetal y reflexionar sobre la simpleza de su composición con sencillas técnicas.
2. Observar la estructura fibrilar del ADN.
3. Establecer la relación entre el proceso de extracción y propiedades químico-físicas del ADN.

MATERIAL NECESARIO

1. Muestras vegetales. (fresas y pimiento verde).
2. Cucharillas.
3. Agua mineral.
4. Sal común. (NaCl).
5. Bolsas de plástico zip / batidora.
6. Detergente líquido.
7. Zumo de piña.
8. Filtros de café.

9. Vasos de precipitado.
10. Alcohol 96°.

PROCEDIMIENTO

Extracción del ADN de fresas

- 1) Trocear las fresas e introducirlas en una bolsa plástica con dos cucharadas de agua y un poco de sal. Cerrar la bolsa.
- 2) Amasar la bolsa con ambas manos hasta obtener una papilla de fresas.
- 3) Colar la papilla con el filtro de café sobre un vaso de precipitado.
- 4) Añadir 1 cucharada de detergente al filtrado y remover suavemente 30 segundos.
- 5) Dejar reposar 10 minutos la mezcla.
- 6) Añadir alcohol de 96° con mucho cuidado, dejándolo resbalar por las paredes para que forme una capa sobre el filtrado. Dejar reposar 10 minutos. Éste crea una capa por encima del agua, de tal forma que el ADN es capaz de flotar entre las dos capas.
- 7) En caso de que el ADN de la muestra vegetal no se pueda apreciar muy claramente. Tenemos que agitar el tubo un poco para poderlo apreciarlo mejor.
- 8) Deberíamos obtener algo así, como un copo de algodón mojado.



Extracción del ADN de pimiento verde

- 1) Cortar el pimiento en trocitos.
- 2) Colocar los trozos en el vaso de la batidora.
- 3) Agregar una cucharadita de sal.
- 4) Añadir medio vaso de agua y batir la mezcla, debe quedarte una masa un poco espesa.
- 5) Pasar la papilla por el filtro de café y recoger el jugo en un vaso de precipitado transparente.
- 6) Agregar dos cucharadas de lavavajillas y una de zumo de piña.
- 7) Lentamente con una cuchara mezclar todo el contenido del vaso.
- 8) Esperar 10 minutos.
- 9) Lentamente agregar alcohol al vaso. Se debe agregar aproximadamente la misma cantidad de lo que se tiene ya en el vaso. Muy Importante!!! Este paso es clave para poder tener ADN al final, se debe agregar el alcohol cuidadosamente, y se observarán dos fases o capas... hacerlo muy despacito.
- 10) Deberíamos obtener algo así, como un copo de algodón mojado.

