

PRACTICA # 1

OBTENCION Y PURIFICACION DEL DNA CROMOSOMAL

INTRODUCCIÓN.

LOS ACIDOS NUCLEICOS.

Es muy probable que, en la actualidad, todo mundo haya escuchado hablar de los ácidos nucleicos, en particular del ADN, simplemente por los descubrimientos recientes y por las grandes innovaciones tecnológicas en la investigación del ADN, los cuales no dejan de aparecer casi a diario en los grandes periódicos.

Las iniciales ADN significan ácido desoxirribonucleico. Se encuentra en todas las células. Al ADN muchas veces se le llama la molécula central de la vida, ya que contienen las unidades de la herencia, que se llaman genes son un código químico que especifica el tipo de proteína que un organismo puede producir y estas proteínas incluyen a las enzimas que regulan la mayor parte de la actividad celular.

ESTRUCTURA DE LOS ACIDOS NUCLEICOS.

Cada molécula de ADN está formada por dos polímeros extremadamente largos sostenidos entre sí por enlaces de hidrógeno y enrollados en lo que se conoce como doble hélice. Cada uno de los dos polímeros está formado por numerosas subunidades llamadas nucleótidos, enlazadas covalentemente formando las cadenas. Cada nucleótido está compuesto por tres partes: un compuesto de fósforo llamado fosfato, un azúcar de 5 carbonos simples y una base nitrogenada. Existen cuatro bases nitrogenadas en el ADN, por lo tanto hay cuatro diferentes nucleótidos. Su ordenamiento lineal específico dentro del polímero constituye el código químico (código genético). En otras palabras, los genes son básicamente un ordenamiento de nucleótidos. En nuestro ADN que simplemente determina como serán nuestras proteínas.

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DEL DNA

El primer paso en la purificación del DNA consiste en homogeneizar las células y distar los núcleos de los cuales se extrae el DNA. El medio de extracción de ordinario contiene un detergente, como el SDS, que sirve para lisar los núcleos y liberar el DNA, hecho que aumenta notablemente la viscosidad de la solución. El detergente inhibe también cualquier actividad nucleasa en la preparación.

El objetivo de los pasos de purificación es separar el DNA de materiales contaminantes, como RNA y proteínas.

La desproteinización se logra en general agitando la mezcla con un volumen de fenol. El fenol (o alternativamente cloroformo) es un desnaturalizador activo de proteínas que suprime la solubilidad de las proteínas en la preparación y las precipita.

Puesto que el fenol y la solución salina amortiguadora no se mezclan, solo se requiere centrifugar la suspensión para separar las bases, permaneciendo el DNA (y el RNA) en la solución dentro de la fase acuosa de arriba y la proteína presente como un precipitado concentrado en la interfase. La fase acuosa se retira del tubo y se somete a ciclos repetidos de agitación con fenol y centrifugación hasta agotar toda la proteína de la solución. Añadiendo etanol frío. El etanol frío forma una capa arriba de la solución acuosa del DNA, el cual, se enrolla sobre una varilla de vidrio conforme sale de la solución. En la interfase el RNA sale de la solución salina. En contraste, el RNA sale de la solución como precipitados que se asienta en el fondo del vaso. Luego

de este primer paso de purificación, se disuelve el DNA y se trata con ribonucleasa mediante tratamiento con una proteasa. Enseguida se quita la proteasa por desproteínización con fenol y se vuelve a precipitar el DNA.

2

SEPARACIÓN DEL DNA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL.

La electroforesis en gel se utiliza más ampliamente en la separación de ácidos nucleicos de diferente peso molecular.

Las moléculas RNA o DNA pequeñas, de unos pocos cientos de nucleótidos o menos, por lo general se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamina. Las moléculas de mayor tamaño tienen problemas para desplazarse a través de la cerrada trama de la poliacrilamina y en general se fraccionan en gel de agarosa que tiene mayor porosidad.

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas. El gel con agarosa en baja concentración (0.34) se emplea para separar fragmentos de DNA de mayor tamaño.

OBJETIVO.

- Extraer y purificar DNA cromosomal de leucocitos.

MATERIAL Y REACTIVOS.

Centrífuga

Microcentrífuga

Agitador vortex

Micropipetas de volumen variable (20, 200 y 1000 μ l)

Tubos Eppendorf

Puntas para micropipeta

Gradilla para tubos Eppendorf

Citobrush

Guantes de látex

Papel higiénico

NaCl 1 M y de ésta solución preparar otra al 5mM que es la que se requiere

SDS 10%

NaCl saturado

Etanol al 70%

Sacarosa 1 M

Tritón x-100 (directo)

Tris base 1 M pH 7.6 (es importante que el pH sea exacto)

TTS: para prepararlo se hace para 50 mL o 100ml, y no se recomienda preparar más, al menos que se tenga que hacer unas 30 extracciones a la vez. Para 50 mL: 500 ðL tris base 1 M pH 7.6, 15 ml de sacarosa 1 M, 500 ðL de tritón x-100 y 34 mL de DDW estéril (agua destilada y desionizada); para preparar 100 mL son exactamente las mismas condiciones pero al doble.

H₂O desionizada estéril.

PROCEDIMIENTO.

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE DNA DE LEUCOCITOS (TÉCNICA DE MILLER)

1. Extraer 3 ml de sangre periférica y colocarlos en tubo de 13 x 100 con EDTA al 10%. Posteriormente se transfiere la sangre a tubos de Falcon de 10 ml y se adicionan 3 ml de TTS (tris-tritón-sacarosa)
2. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 min.
3. Se decanta el sobrenadante a un vaso con color (desechar). Este es un punto muy importante puesto que en el fondo queda un botón espeso que no se debe perder al decantar.
4. Agregar al botón 1ml de TTS y transferirlo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, homogeneizar fuerte (con la mano o con un vortex con disco agitador para tubos Eppendorf) hasta disolver el botón y centrifugar a 12 000 r. p. m. Durante dos minutos a 4°C.
5. decantar el sobrenadante y agregar 1 ml más de TTS y otra vez disolver el botón y centrifugar otros dos minutos a 4°C . (este paso se tiene que repetir hasta que se obtenga un botón blanco y también el sobrenadante).
6. Una vez que se haya decantado el sobrenadante blanco y da un botón blanquecino se agregan 570 ðl de NaCl 5mM y homogeneizar dos minutos (aquí no se decanta) + 30 ðl de SDS al 10% y homogeneizar diez minutos + 200 ðl de NaCl saturado y homogeneizar 15 minutos.
7. una vez que se haya realizado esta mezcla se centrifuga a 12, 000 r.p.m durante 25 minutos a 4°C. Mientras transcurre este tiempo se puede ir preparando tubos estériles de 13x100 con 2 ml (se puede utilizar tubos Falcon estériles) de etanol absoluto frío, para que una vez que terminen los 25 minutos se vierta el sobrenadante en el etanol absoluto, una vez que esto se haya hecho mezclar suavemente el tubo que contiene el etanol absoluto y el sobrenadante de lo que se centrifugo y se va a observar la hebra blanquecina de DNA (si aquí no se observa ninguna hebra entonces se perdieron los leucocitos en el primer paso).
8. Después se almacena el tubo que contiene el etanol + el DNA a -20 °C por toda la noche.
9. Al día siguiente con una pipeta de 1000 ðl se elimina el etanol en el que estuvo el DNA toda la noche y se agregan otros dos ml de etanol al 70%
10. Después se centrifuga a 9000 r.p.m durante 10 minutos a 4 °C.
11. Eliminar el sobrenadante y el tubo Eppendorf con el botón blanco que queda se coloca en un desecador a vacío durante 15 minutos a temperatura ambiente.

12. Finalmente ya que esté perfectamente deshidratado al DNA se agregan de 300 a 400 μ l de agua bidestilada desionizada estéril. 1

OBSERVACIONES

Al tener la sangre en el tubo de ensaye, después de someterlo a una centrifugación para separar los leucocitos, rompiéndolos y quedando suspendidos en la parte de abajo del tubo contenido de estos (DNA y otros residuos celulares ajenos, etcétera), prosiguiéndose a seguir limpiando el DNA sometiéndose a varios ciclos de centrifugación para obtener una suspensión blanquecina (botón blanco) en el tubo con la solución. Una vez obtenido este DNA, se prosiguió finalmente a deshidratarse según lo indica el procedimiento indicado, obteniéndose después el botón blanco suspendido en agua destilada, el cual quedó en el refrigerador para su posterior uso.

DISCUSIÓN.

Durante el procedimiento fuimos observando que poco a poco se iba obteniendo la purificación del DNA, y finalmente se logró obtener un producto que presentaba un aspecto blanquecino transparente y muy condensado. Así podemos decir que observamos claramente el aspecto del DNA.

CONCLUSIÓN.

Con la técnica de Miller se logró hacer la extracción y purificación correcta del DNA de células sanguíneas como fueron los leucocitos. Por medio de esta técnica se pudo lograr nuestro objetivo.

REFERENCIAS.

- A simple salting out procedure for extracting DNA from human cell. S. A. Miller, D. D. Dykes and H. F. Polesky. 1988. *Nucleic Acids Research: 16 (3): 1215.
- Biología Molecular y Herencia. Robert A. Wallace, Jack L. King, Gerald P. Sanders., 1a edición. Editorial Trillas. México 1991: página 97, 98.