

# EXTRACCIÓN DE ADN (1)

---

## UN EXPERIMENTO AMBIGUO EN EL LABORATORIO DE ENSEÑANZA

Muchos estudios de Biología Molecular comienzan con la extracción de ácidos nucleicos. La lisis celular libera las moléculas en una fase acuosa que es separada de los restos celulares por centrifugación. Las proteínas son removidas de la fase acuosa con solventes orgánicos (fenol, cloroformo). El ADN, que permanece en la fase acuosa, precipita junto al etanol y posteriormente es purificado y resuspendido en un buffer adecuado.

La existencia de kits comerciales ha modificado la rutina de muchos laboratorios. En los kits, los solventes orgánicos son sustituidos por filtros que retienen el ADN, en condiciones de alta concentración salina. La elución del ADN retenido en el filtro ocurre en baja concentración salina.

Por alguna razón que se nos escapa, la extracción de ADN es una actividad que entusiasma a algunos y decepciona a otros. Probablemente, las diferencias de opinión tengan más que ver con la personalidad de los alumnos y sus fantasías que con la actividad en sí. Los pasos posibles en un laboratorio de enseñanza son los siguientes:

1. Triturar el tejido para separar las células.
2. Lisis de las membranas celulares con detergente, en una solución salina para liberar los ácidos nucleicos y las proteínas.
3. Digestión de las proteínas por acción enzimática de proteasas (Opcional).
4. Precipitación con etanol frío. El ADN es soluble en alcohol, pero se torna insoluble en presencia de sal (NaCl) porque el sodio neutraliza la carga negativa de los grupos fosfatos. El etanol formará una capa en la superficie por ser menos denso que la solución acuosa.
5. Observación de agregados moleculares, de consistencia mucoidea, en la interfase entre la solución acuosa y el alcohol.

Los agregados moleculares obtenidos son una mezcla de proporción variable de ácidos nucleicos, proteínas y pectina, un carbohidrato presente en la lamela intercelular y en la vacuola de las células vegetales.



## BIBLIOGRAFIA

MADDEN D. Discovering DNA. Science in School 1: Spring 2006. <http://www.scienceinschool.org>.

THE SCIENCE BEHIND OUR FOOD <http://discover.uga.edu/sbof/index.htm>

MANN, V. S. Educação Tecnológica no Ensino fundamental: Da Teoria à Prática. Desenvolvida no Instituto de Tecnologia ORT. Dissertação (Mestrado em Educação) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, Rio de Janeiro, 2010.

# EXTRACCIÓN DE ADN (1) / UN EXPERIMENTO AMBÍGUO

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

### OBJETIVO

Extraer ADN mediante un procedimiento simple. Las membranas celulares y nucleares de las células del tomate son disgregadas con detergente, en solución salina, liberando los ácidos nucleicos que precipitan con el agregado de etanol frío.



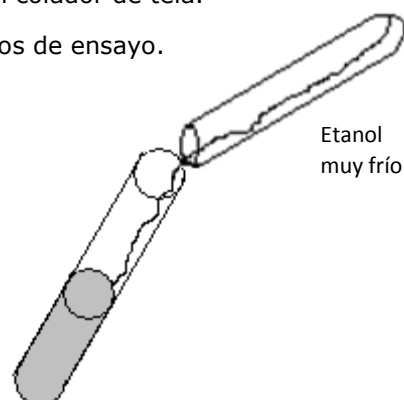
### MATERIALES

Un tomate maduro, cuchillo y tabla, 2 bolsas plásticas, 1 vaso de precipitados, 1 colador de tela, 2 ml de detergente, 2 o 3 granos de sal gruesa, tubos de ensayo y gradilla (sustituibles por frascos pequeños o vasos), 1 pipeta de 10 ml, tubos con 5 ml de etanol 95% bien frío, varilla de madera o aguja de *crochet*.

*El etanol debe ser colocado en el congelador al menos un día antes de la realización de la práctica.*

### PROCEDIMIENTO

1. Cortar el tomate en trozos pequeños.
2. Colocar los trozos del tomate en una bolsa de plástico y amasar bien. Si el tomate no estuviera suficientemente maduro o sacara poco jugo, agregar hasta un volumen equivalente de agua.
3. Agregar la sal gruesa y el detergente a la masa de tomate. Mezclar bien.
4. Luego de 5 a 10 minutos, filtrar la masa de tomate con un colador de tela.
5. Distribuir 10 ml del líquido filtrado en cada uno de los tubos de ensayo.
6. Inclinar levemente el primer tubo y muy despacio dejar escurrir 10 ml de etanol 95% sobre el líquido. El etanol formará una segunda capa por encima de la solución.
7. Esperar 10 minutos sin mezclar las capas y observar el ADN que precipita en la interfase de las dos capas y llega hasta la superficie.
8. Retirar el ADN con una varilla de madera o con una aguja de *crochet*.



# EXTRACCIÓN DE ADN (1) / UN EXPERIMENTO AMBÍGUO

## PASO A PASO EN LA EXTRACCIÓN DE ADN DE TOMATE



Preparación de la masa de tomate (tomate + sal + detergente)



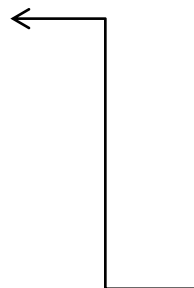
Filtrado



DNA + proteínas + pectina



Etanol muy frío



## EXTRACCIÓN DE ADN (1) / UN EXPERIMENTO AMBÍGUO

### NUESTRO COMENTARIO

Desde el punto de vista técnico se trata de una actividad cuyo único requisito es colocar etanol en el congelador, en un frasco cerrado, al menos un día antes de la realización de la práctica. El tomate puede ser reemplazado por frutillas, un poliploide con alto contenido de ADN.

En el módulo de Tecnología de los Alimentos del Curso de Introducción a la Tecnología del Instituto de Tecnología ORT, la actividad práctica de producción de mermeladas introduce un test simple para determinar la proporción de pectina de una fruta. Como el test involucra la precipitación de la pectina con etanol, pensamos que la mayor parte de los agregados moleculares podrían ser de pectina y no de ADN.

La Figura 1 muestra tres experimentos de extracción de ADN de tomate. El primer frasco corresponde al protocolo detallado en esta Guía. En el segundo se agregó una pizca de "ablandador" de carne que contiene papaína, y en el tercero una pizca de pectinasa. La imagen muestra que la pectinasa elimina la mayor parte de la sustancia gelatinosa de la superficie, confirmando que se trataría de pectina. Los filamentos de ADN estarían en la "nube" observada en la capa de etanol próxima a la interfase.

Como la pectinasa no es una enzima fácil de conseguir, incluimos en nuestro protocolo un test que detectase la presencia de pectina en el material escogido como fuente de ADN. El protocolo modificado se encuentra en la Guía 70 (Extracción de ADN: fuentes alternativas)

Figura 1. Extracción de ADN de tomate.

1: Protocolo básico      2: Protocolo básico + proteasa      3: Protocolo básico + pectinasa



### ¿CÓMO MONTAR UN PROYECTO?

Ver las Guías 69 (*Extracción de ADN: Procedimiento básico*) y 70 (*Extracción de ADN: fuentes alternativas*).

## EXTRACCIÓN DE ADN (1) / UN EXPERIMENTO AMBÍGUO