

EXTRACCIÓN DE ADN (2)

PROCEDIMIENTO BÁSICO

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 DNA, que permanece en la fase acuosa, precipita junto al etanol y posteriormente es purificado y suspendido 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 DNA, en condiciones de alta concentración salina. La elución del DNA retenido en el filtro ocurre en baja concentración salina.

Por alguna razón que se nos escapa, la extracción de DNA 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 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 helado. El DNA 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 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>.

GENETIC SCIENCE LEARNING CENTER. How to extract DNA from anything living. En <http://learn.genetics.utah.edu>

EXTRACCIÓN DE ADN (2) / PROCEDIMIENTO BÁSICO

ACTIVIDAD PRÁCTICA

OBJETIVO

Extraer ADN mediante un procedimiento simple.



MATERIALES

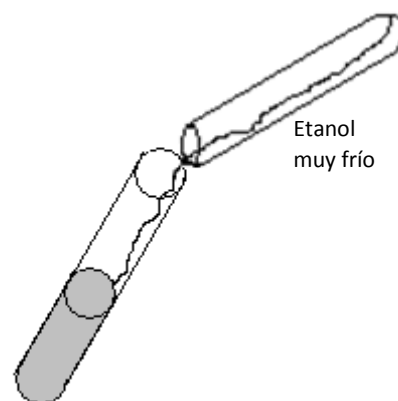
Un paquete de arvejas secas, sal gruesa, detergente, agua fría, licuadora, colador, vaso de precipitados, ablandador de carne con proteasas (papaína), etanol frío, tubos de ensayo y gradilla (sustituibles por frascos pequeños o vasos), 1 pipeta o probeta, varilla de madera o aguja de *crochet*.

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

PROCEDIMIENTO

Las membranas celulares y nucleares de las células de arveja son disgregadas con detergente en solución salina, liberando los ácidos nucleicos que precipitan con el agregado de etanol frío.

1. Mezclar en la licuadora 100 mg de arvejas secas, una pizca de sal gruesa y 200 ml de agua fría, durante 15 a 20 segundos.
2. Colar la "sopa de arvejas" obtenida anteriormente y descartar los restos de arveja. Continuar el procedimiento con la fracción líquida filtrada.
3. Agregar dos cucharadas soperas de detergente líquido. Mezclar suavemente.
4. Esperar 5 a 10 minutos. Y durante ese tiempo colocar en cada tubo, o bien en cada frasco, una pizca del ablandador de carne.
5. Distribuir la mezcla en los tubos o frascos (1/3 de la capacidad del recipiente elegido).
6. Agregar un volumen equivalente de etanol 95% bien frío. Esta etapa es crítica, y se debe inclinar levemente el tubo y muy despacio dejar escurrir el etanol sobre el líquido de manera de formar una segunda capa por encima de la mezcla.
7. Esperar 10 minutos sin mezclar las capas y observar el DNA que precipita en la interfase de las capas y llega hasta la superficie.
8. Retirar el ADN con una varilla de madera o una aguja de *crochet*.



EXTRACCIÓN DE ADN (2) / PROCEDIMIENTO BÁSICO

NUUESTRO COMENTARIO

De todos los protocolos analizados y testeados, el del Genetic Science Learning Center es nuestro preferido porque además de representar un procedimiento simple, utiliza como fuente de DNA un material barato y fácil de encontrar en cualquier época del año.

Los primeros protocolos de extracción de DNA que fueron desarrollados para ser aplicados en laboratorios de enseñanza utilizaban hígado y timo como fuente de DNA. Con la diseminación de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (mal de la vaca loca), por razones de bioseguridad se invalidó el uso de órganos animales y fueron sustituidos por otras fuentes de origen vegetal. No obstante, las células vegetales contienen pectina, un polisacárido que precipita en etanol, al igual que el DNA en solución salina.

¿Los agregados moleculares son de pectina?

Para diferenciar la pectina y el ADN en los agregados moleculares obtenidos se investigó la presencia del polisacárido en arvejas secas. Estas fueron trituradas y mezcladas con la cantidad de agua propuesta en el protocolo. Una vez coladas, se obtuvo una "sopa", de la cual fueron separados dos alícuotas.

La primera fue mezclada con una cantidad igual de etanol, agitada y dejada en reposo para decantar. El test del alcohol para la determinación del porcentaje de pectina deber ser interpretado como se indica a continuación:

- La aparición de un precipitado gelatinoso y firme es señal de bastante pectina (+++).
- Un precipitado más o menos gelatinoso, que se rompe por agitación leve corresponde a una proporción media (++)
- Un precipitado filamentosos granulados corresponde a una baja proporción de pectina (+).

En la segunda alícuota, se agregó sal o detergente para completar la extracción de DNA siguiendo el protocolo.

Los resultados pueden ser vistos en la Figura 1. La comparación entre ambas fotos indica que los filamentos observados en la imagen de la derecha serían de ADN y no de pectina. La confirmación dependería del resultado de un tratamiento de dichos filamentos con DNAsas, un test que está fuera de nuestras posibilidades.

Acción de diferentes detergentes

Muchos protocolos disponibles recomiendan el uso de SDS (dodecilsulfato sódico). Este no es un detergente usual, de modo que nuestros experimentos fueron realizados con productos de supermercado.

Se comparó la eficiencia de dos agentes detergentes: el detergente de lozas *Limp* y el detergente de ropa *Ariel* líquido. Como este último contiene enzimas (proteasas, lipasas y celulasas) omitimos el agregado de proteasas en el procedimiento correspondiente.

La Figura 2 muestra la extracción de ADN realizada satisfactoriamente con los dos productos. Con *Ariel*, el resultado fue más rápido.

EXTRACCIÓN DE ADN (2) / PROCEDIMIENTO BÁSICO

Figura 1. Extracción de pectina y de ADN de arvejas secas.

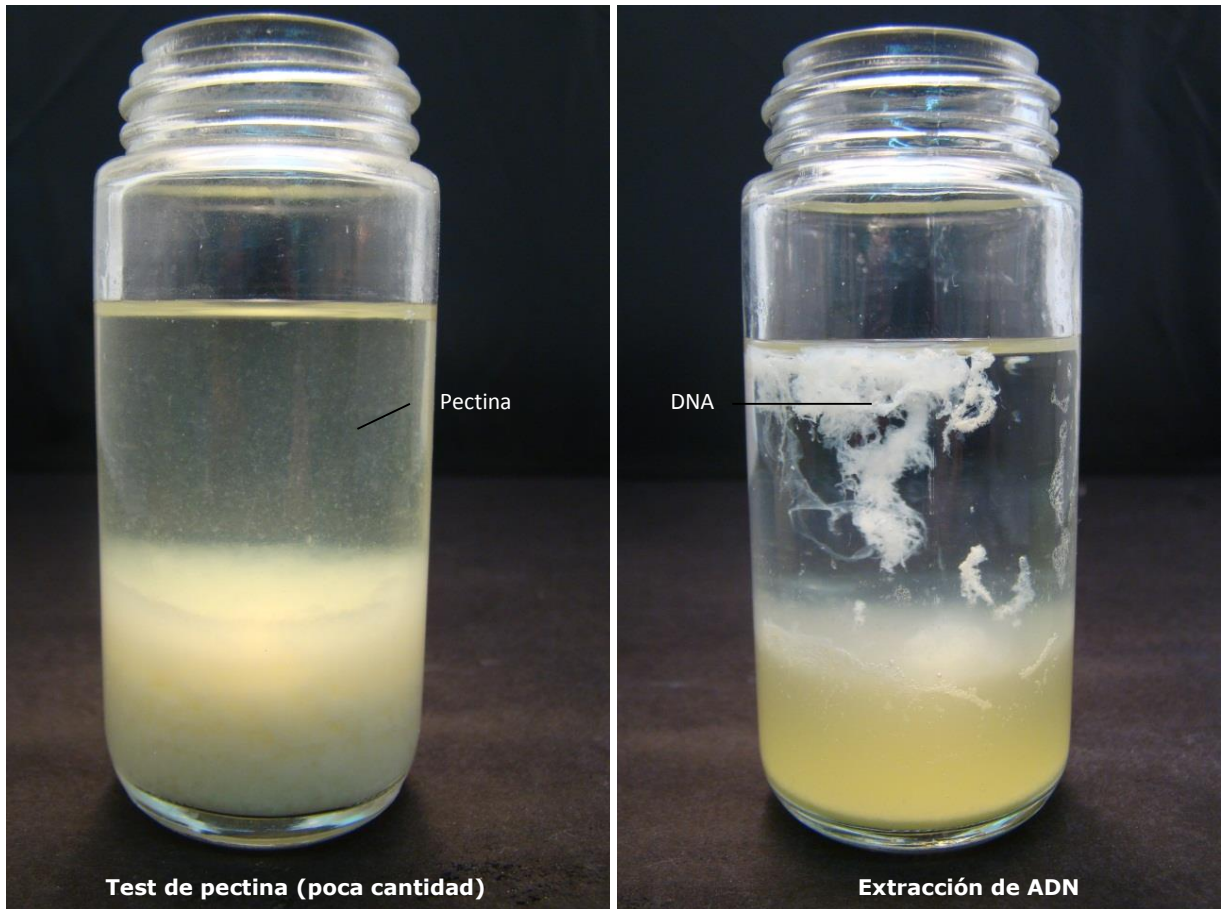


Figura 2. Extracción de ADN de arvejas secas con diferentes agentes detergentes.



EXTRACCIÓN DE ADN (2) / PROCEDIMIENTO BÁSICO

Tratamiento con calor

Otra recomendación encontrada en los protocolos que circulan en Internet es que la mezcla de "sopa" + sal+ detergente sea colocada en baño María a 55-60°C, de modo de inactivar las enzimas presentes y favorecer la liberación del ADN. En otros protocolos, la temperatura del baño es de 70°C. En todos ellos, una vez transcurridos 15 minutos exactos, la mezcla debe ser transferida a un baño de hielo, para evitar la degradación del ADN. Una vez enfriada la mezcla, se agrega la proteasa.

Los resultados de la extracción de ADN de arvejas secas con y sin tratamiento de calor pueden ser visualizados en la Figura 3.

El protocolo del GSLC (Genetic Science Learning Center) que no contempla el tratamiento con calor, nos permitió extraer ADN de las arvejas. Agregando el tratamiento con calor, con el mismo protocolo se obtuvieron aglomerados gelatinosos de pectina. Las arvejas contienen pectina. Una extracción rápida a temperatura ambiente libera ADN, pero una extracción más lenta a una temperatura elevada (60°C) durante 15 minutos provocaría la gelatinización de la pectina generando una nube turbia como se observa en las 3 repeticiones del experimento.

En función de los resultados anteriores, no vemos ninguna necesidad de complicar el procedimiento. Para alcanzar los objetivos didácticos, el tratamiento con calor resulta superfluo.

Figura 3. Extracción de ADN de arvejas secas con y sin tratamiento de calor.

Los 3 frascos de la izquierda corresponden a extracciones sin tratamiento de calor, los 3 frascos de la derecha a extracciones con tratamiento de calor.



Observación microscópica

Recomendada en varios protocolos y frecuentemente solicitada por los alumnos, la observación microscópica de los filamentos resulta obviamente un fiasco. Nunca falta alguien que acredite poder ver la doble hélice y no merece la pena hablar de manómetros. La decepción permanece.

EXTRACCIÓN DE ADN (2) / PROCEDIMIENTO BÁSICO

Medición de la masa seca

El ADN extraído puede ser colocado en un papel de filtro o en un trozo de papel de aluminio. La masa puede calcularse como:

Masa (papel + ADN) – Masa (papel) = Masa ADN

A menos de contar con una balanza adecuada, el procedimiento de secado y pesado del DNA no aporta datos interesantes.

¿CÓMO ARMAR UN PROYECTO?

Comparar los resultados de la extracción de ADN de arvejas con el de otros granos (lentejas, por ejemplo).

Comparar los resultados obtenidos de la extracción de ADN de arvejas secas, de arvejas congeladas y de arvejas en lata.

Comparar los resultados obtenidos con diferentes proteasas (jugo de piña, líquido de limpieza para lentes de contacto, etc.).

Comparar los resultados obtenidos cuando se agregan proteasas junto con el detergente.

Comparar la cantidad de ADN extraído a partir de diferentes fuentes.