

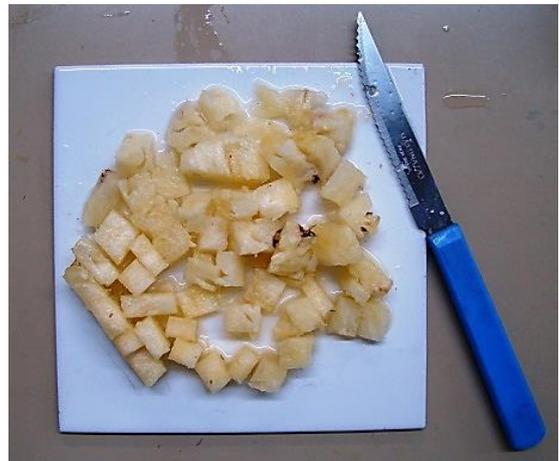
EXTRACCIÓN DE ADN (3)

PROCEDIMIENTO BÁSICO PARA FUENTES ALTERNATIVAS

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 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 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 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 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 mucosa, 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. <http://learn.genetics.utah.edu>

EXTRACCIÓN DE ADN (3) / FUENTES ALTERNATIVAS

ACTIVIDAD PRÁCTICA

OBJETIVO

Extraer ADN a partir de diversas fuentes vegetales.

MATERIALES

Una fuente de ADN vegetal, sal gruesa, detergente neutro (lavavajillas), agua fría, licuadora o procesadora de alimentos, 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 son disgregadas con detergente en solución salina, liberando los ácidos nucleicos que precipitan con el agregado del etanol frío.

A. Preparación de la muestra

1. Elegir una fuente de ADN (hojas, frutos, flores o semillas).
2. Triturar el tejido. Mezclar en la licuadora (15-20 segundos), triturar en la procesadora de alimentos o romper el tejido manualmente en una bolsa plástica, hasta obtener un volumen aproximado de 100 ml. La cantidad de agua a ser agregada depende de la fuente vegetal elegida.
3. Colar la masa de modo de obtener un jugo espeso.



EXTRACCIÓN DE ADN (3) / FUENTES ALTERNATIVAS

B. Test de pectina (Control)

1. Separar una parte del jugo y mezclar con una cantidad equivalente de etanol (95%).
2. Agitar la mezcla, dejar reposar y observar el precipitado formado.
3. Interpretar.

Un coágulo transparente, bastante gelatinoso y firme indica una alta proporción de pectina; un coágulo frágil, más o menos gelatinoso, que se rompe y divide en 2 o 3 pedazos cuando se agita levemente indica una proporción media o moderada de pectina; un precipitado filamentosos granulados, que se rompe en varios pedazos con agitación bastante leve indica una baja proporción de pectina.

C. Extracción de ADN

1. Lisis de las membranas celulares.

En el resto del jugo disolver una pizca de sal gruesa antes de agregar dos cucharadas soperas de detergente. Mezclar suavemente durante 5 a 10 minutos.

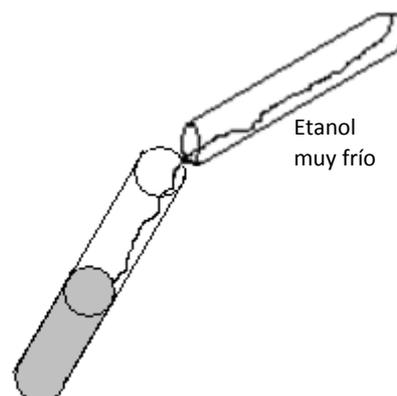
2. Digestión de las proteínas.

Colocar una pizca de ablandador de carne en los recipientes (tubos de ensayo, frascos o vasos) donde será realizada la extracción. Distribuir suavemente el jugo, sin sobrepasar 1/3 de la capacidad del recipiente.

3. Precipitación del ADN con etanol frío.

Agregar un volumen equivalente de etanol 95% 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 solución. Esperar 10 minutos sin mezclar las capas y observar los agregados moleculares que precipitan en la interfase de las dos y llegan hasta la superficie.

4. Observación de los agregados moleculares formados.
5. Comparar esos agregados con los formados en el test de pectina.
6. Retirar el ADN con una varilla de madera o una aguja de *crochet*.



EXTRACCIÓN DE ADN (3) / FUENTES ALTERNATIVAS

NUESTRO COMENTARIO

Por motivos de bioseguridad, descartamos la extracción de ADN a partir de fuentes animales y humanas en el laboratorio de enseñanza.

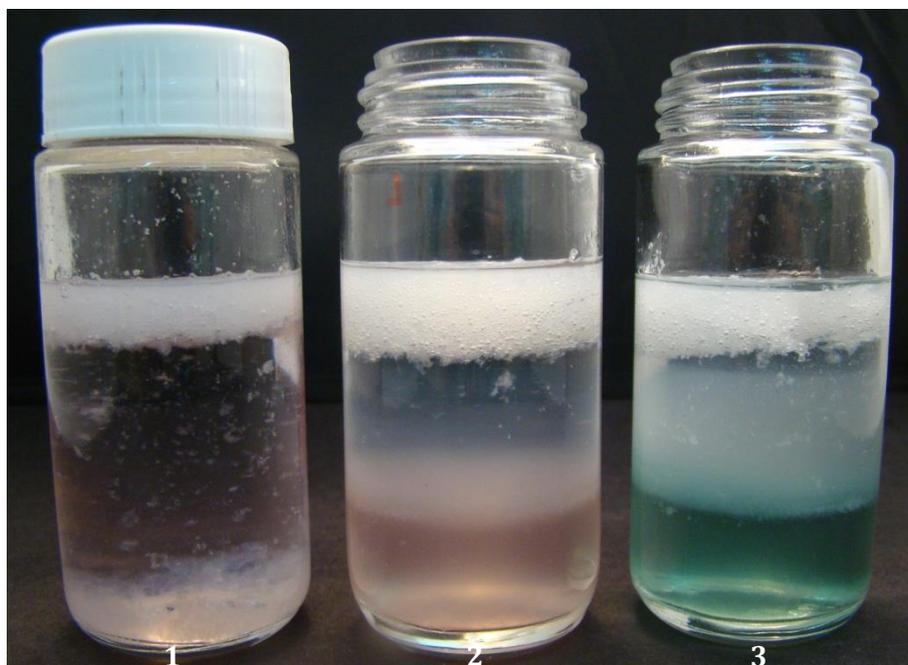
En términos generales, la fuente de ADN debe ser suficientemente barata como para permitir multiplicar los grupos de trabajo. Hemos tenido muy buenos resultados con el germen de trigo natural, pero no siempre lo encontramos en los comercios. Las frutas son interesantes, la condición es elegir aquellas de bajo contenido en pectina (piña, acerola, maracuyá, fresas, pera, duraznos, cajú, etc.)

El procedimiento de extracción de ADN fue aplicado en varias fuentes vegetales, utilizando un lavavajillas (*Limp*) y un ablandador de carne como fuente de proteasas (*Maggi*). Paralelamente repetimos el procedimiento con un producto para lavar la ropa (*Ariel*) que contiene enzimas. Se aplicó el test de la pectina como control.

La elección de la cebolla se justifica por ser uno de los protocolos clásicos disponibles en la web, pero tiene el inconveniente de su olor fuerte y generar reclamos lacrimógenos. Además de ello, la mayor parte de los agregados formados parecen ser de pectina (Figura 1).

Figura 1. Extracción de ADN de cebolla roja.

1: test de pectina; 2: extracción con lavavajillas y proteasa; 3: extracción con detergente de lavar la ropa con enzimas.



EXTRACCIÓN DE ADN (3) / FUENTES ALTERNATIVAS

La col (berzas) fue un éxito totalmente inesperado (Figura 2). El aspecto de los aglomerados en el test de pectina y en los *tests* de extracción es muy diferente, indicando que estaríamos en presencia de ADN. En el test de pectina en la capa superior se observan restos de tejido que no se eliminan al colar. Tal vez fuera conveniente sustituir el colador por un filtro de paño o de papel.

Los experimentos realizados con kiwi y maracuyá fueron decepcionantes (Figuras 3 y 4). Tal vez porque las frutas no estaban suficientemente maduras. El resultado con la piña es interesante, pero faltó el test de pectina.

Figura 2. Extracción de ADN de col.

1: test de pectina; 2: extracción con lavavajillas y proteasa; 3: extracción con jabón para lavar la ropa (con enzimas).



EXTRACCIÓN DE ADN (3) / FUENTES ALTERNATIVAS

Figura 3. Extracción de ADN de maracuyá

1: test de pectina; 2: extracción con lavavajillas y proteasa; 3: extracción con detergente de lavar la ropa con enzimas.

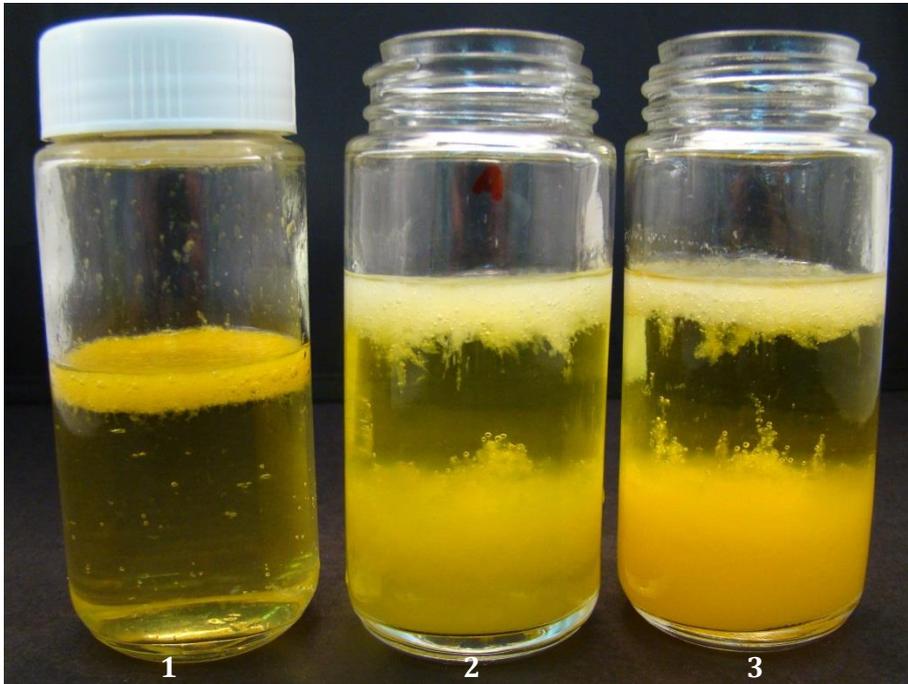
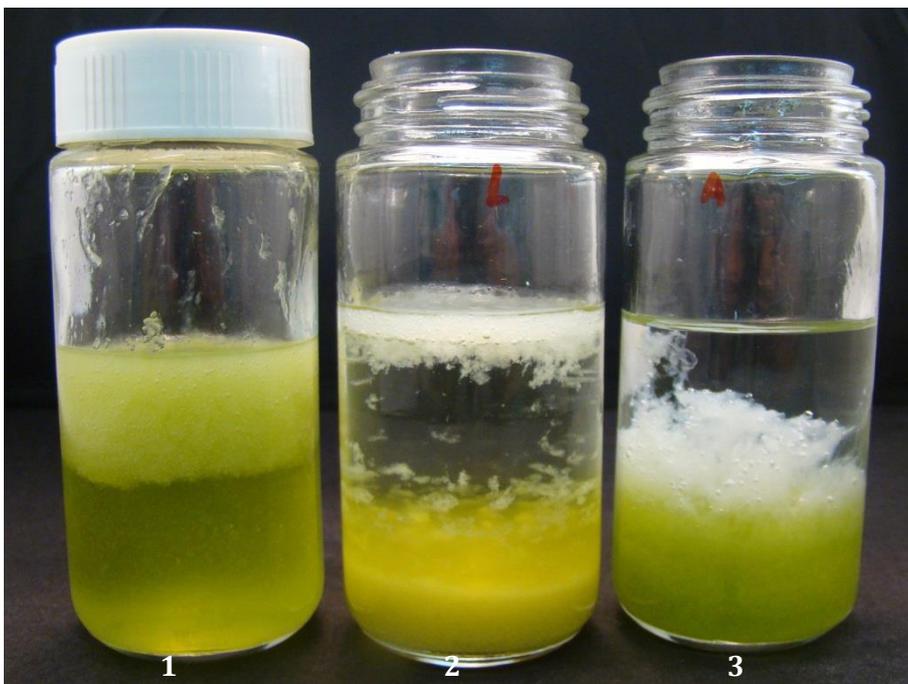


Figura 4. Extracción de ADN de kiwi

1: test de pectina; 2: extracción con lavavajillas y proteasa; 3: extracción con detergente de lavar la ropa con enzimas.



EXTRACCIÓN DE ADN (3) / FUENTES ALTERNATIVAS

Figura 5: Extracción de ADN de kiwi y ananá (piña).



¿CÓMO ARMAR UN PROYECTO?

Extraer ADN de frutas con diferente grado de maduración.

Extraer ADN de frutas locales.