



UNIVERSIDAD DE SUCRE
PROGRAMA DE MEDICINA
GENÉTICA
PRÁCTICA # 4

Extracción de Ácidos nucleicos por solubilidad en Fenol -Cloroformo

Autores: Osorio Sossa Jhonatan¹, Payares Celins Luis José¹, Zúñiga de Hoyos Kennia¹, Vitola Moguea Aldair¹.

1. Estudiantes de IV semestre de Medicina de la Universidad de Sucre
Sincelejo - Colombia

INTRODUCCION: La extracción de ADN tiene como objetivo principal obtener la mayor cantidad posible del ADN de alto peso molecular, libre de proteínas, carbohidratos y otros inhibidores de enzima. Los ácidos nucleicos son la molécula que guarda el código genético de todas las células. Sin importar que el organismo sea multicelular o unicelular, eucariota o procariota, todos tienen el DNA como vehículo de su código genético. El estudio de la genética ha permitido que la raza humana indague en profundidad estructura y características del ADN; en ese sentido el proceso de extracción del ADN genómico sigue ciertas pautas para su correcta purificación que son muy diferentes a los empleados en la purificación de proteínas, lo que refleja las diferencias básicas en la estructura de estos dos tipos de macromoléculas. El primer paso en la purificación del ADN por lo general consiste en homogeneizar las células y aislar los núcleos de los cuales se extrae el ADN. El medio de extracción ordinario contiene un detergente (SDS); a continuación le agrega solución de TE para resuspender el ADN, luego los ácidos nucleicos se precipitan añadiendo etanol. Para concluir el análisis de la extracción del ADN hay que resaltar que en este proceso ocurre una lisis celular lo cual significa que el ADN queda libre por consiguiente hay que protegerlo de las enzimas porque estas podrían degradarlo. Existen métodos y tecnologías diferentes para el aislamiento de ADN genómico. En general todos estos métodos involucran la destrucción y lisis del material celular, seguido de una precipitación de proteínas típicamente obtenida por digestión con proteinasa K, y la extracción del ADN usando el método de fenol: cloroformo, usualmente el material genético es recuperado por precipitación usando etanol o isopropanol. La elección de cada método dependerá de muchos factores como: la cantidad requerida de ADN, la pureza y aplicación del mismo.

El objetivo para la purificación y extracción de ADN por el método fenol: cloroformo, consiste en desnaturalizar las proteínas que enrollan al ADN como las histonas y permitir la cuantificación de un ADN libre de péptidos o proteínas. Así mismo el uso de cloroformo permite que todo el fenol sea lavado y se halle libre de proteínas.

Palabras claves: ADN, fenol: cloroformo, Nanodrop.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar la práctica correspondiente a la extracción de ácidos nucleicos por solubilidad en fases inmiscibles fue necesario el uso de materiales como: Nanodrop, tubos eppendorf de 1.5 mL, centrifuga refrigerada, vórtex, proteinasa k, micropipetas, buffer de extracción (Tris-HCL, EDTA 1mM, SDS 0.5%), fenol cloroformo, Acetato de potasio 5M, Isopropanol 100%, Etanol 70% (V/V) y material para descartar. Inicialmente se depositó 250 uL de sangre en un tubo de 1.5 ml previamente esterilizado, luego se adicionó al tubo de eppendorf 250 uL de buffer de lisis y se incubó en hielo por 5 min, luego se centrifugó a 12000rpm por 10 min y se lavó el pellet nuevamente.

Después se adicionó al pellet 245 uL del buffer de lisis y 5 uL de proteinasa k y se homogenizó, luego se agregó 25 uL de acetato de potasio y se incubó en hielo por 10 min, luego se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min en un centrifuga refrigerada, luego evitando tocar el fondo del vial con la punta de la pipeta se extrajo el sobrenadante y se transfirió a un tubo de eppendorf limpio y se descartó el resto del precipitado.

Luego se adicionó a cada tubo de eppendorf 100 uL de fenol equilibrado y 100 uL de cloroformo y se mezcló usando el vórtex, después se centrifugó las muestras a 12000 rpm durante 1 min. Luego sin tocar la fase orgánica se transfirió el sobrenadante a otro vial y se agregó 100 uL de cloroformo, así mismo se mezcló

usando el vortex y nuevamente se centrifugó a 12000 rpm por 1 min. Posteriormente se transfirió del sobrenadante la cantidad que se pudo arrastrar y se le adicionó el doble del volumen de isopropanol 100% frío. Después se dejó incubando las muestras a -20 °C, luego de transcurrido ese tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C y se vertió el isopropanol y se enjuagó el pellet con etanol 70%. Después se centrifugó a 12000 rpm a 4°C, seguido se descartó el etanol y se secaron las muestras a 55°C por 30 min.

Luego se resuspendió el ADN en 5 uL de buffer TE y se llevó al Nanodrop donde se cuantificó el ADN extraído y finalmente se almacenó las muestras a -20°C.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la práctica fueron los siguientes:

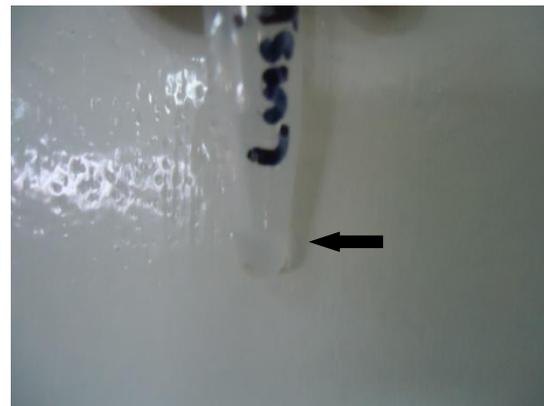


Imagen 1: Muestra de ADN apta para cuantificación.

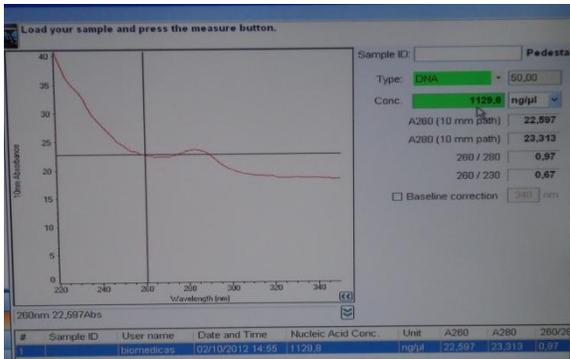


Imagen 2: valores de ADN extraídos mediante el fenol: cloroformo cuantificado en el Nanodrop.

CONCENTRACIÓN 1g/µl	RELACIÓN 260/280	RELACIÓN 260/230
1129.8 ng/µL	0.97	0,67

Tabla 1- valores aceptables para ADN extraídos por fenol: cloroformo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la realización de la práctica, se obtuvo DNA genómico puro de una muestra de sangre venosa mediante el método fenol: cloroformo. En la cual luego de la lisis celular a través de los detergentes, la desproteinización se logra en general agitando la mezcla con un volumen de fenol. El fenol (o alternativamente cloroformo) es un desnaturizador 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.

La viabilidad para cuantificar este ADN, es muy confiable, puesto que provee un ADN de muy buena calidad libre de proteína, dado que los péptidos son extraídos en fase orgánica a través del fenol y la digestión se logra a por medio de la enzima proteinasa K.

Este método de extracción de ADN a través de fenol: cloroformo se caracteriza por la utilización de reactivos altamente tóxicos, al igual que pérdidas significativas de ácidos nucleicos.

CONCLUSIÓN

- El cloroformo permite que todo el fenol sea lavado; es decir libre de proteínas.
- La extracción de ácidos nucleicos por solubilidad en fases inmiscibles, proporciona un ADN de mejor calidad.

BIBLIOGRAFIA

- 1. MARTINEZ JARRETA, M Begoña.** La prueba del ADN en medicina forense. Masson: Buenos Aires.1999.
- 2. ED McGrawHill,** Gerald karp. Biología celular y molecular. 1998.

Las consultas correspondientes fueron llevadas a cabo en la biblioteca universitaria de la Facultad de Ciencias de la salud, y a través la web.