

UNIVERSIDAD DEL SURESTE

BIOLOGIA MOLECULAR

Docente: ING. JOSE LUIS MUÑOZ

CAPITULO 11

Alumna: Estephania A. Flores Courtois

Cuarto semestre

Medicina humana

Capítulo 11

En base a la introducción podremos mencionar que los ácidos nucleicos como el ADN y ARN reciben su nombre ya que son moléculas con características acídicas (como la carga negativa en soluciones acuosas) y se encuentran localizadas inicialmente en el núcleo celular y la mitocondria como habíamos visto en temas anteriores su extracción debe de llevar un proceso complicado ya que deben aislarse del resto de los componentes celulares, como lípidos y proteínas, más abundantes que los ácidos nucleicos basándonos en esto podremos definir las consideraciones necesarias para su extracción, las cuales son las siguientes: debido a la estructura del ADN podremos apreciar que cuando se pipetear, agita o revuelve el ADN se genera un flujo hidrodinámico que puede separar las dos cadenas de ADN por esta misma razón cuando se desea obtener fragmentos de ADN genómico es fácil, pero conforme se requieran tamaños moleculares elevados la técnica se dificulta. Los fragmentos de ADN generalmente obtenidos por las técnicas de extracción de ADN oscilan entre 100 y 150 kb y son adecuados para Southern blot, reacción en cadena de la polimerasa es decir la PCR, electroforesis y construcción de bibliotecas genómicas.

Elección del método de extracción

Como sabemos es vital este paso para la correcta realización de los estudios necesarios y gracias a la tecnología y actualización en la biología molecular podremos encontrar un número amplio de métodos que podremos elegir, sin embargo existen criterios importantes para la elección del método:

- Tipo de ácido nucleico que se va a extraer
- Organismo origen del ácido nucleico
- Fuente del ácido nucleico
- Técnica en que se utilizará el ácido nucleico extraído

Fuente del ácido nucleico

Como sabemos existen un sinnúmero de fuentes de extracción solamente los eritrocitos no son considerados una fuente de extracción debido a que son células anucleadas, en ser humano tenemos las siguientes fuentes:

- Leucocitos (sangre)
- Suero, plasma
- Biopsia
- Orina
- Heces
- Líquido cefalorraquídeo
- Líquido sinovial
- Líquido anmiótico
- Esputo
- Semen
- Raspado bucal
- Folículo capilar

Sin importar la prueba o el tipo de muestra utilizada para la extracción veremos que se enfocan en una técnica minuciosa, que involucra lisis de la célula, separación, purificación, precipitación, lavado y disolución, como se había mencionado anteriormente todo proceso ya sea extracción de ADN y ARN siempre debe considerarse el uso de material nuevo, estéril, libre de ADNsas y ARNsas, y el uso de guantes para impedir la degradación de la muestra con nucleasas provenientes del ambiente (pelo, sudor, saliva, polvo), así como para impedir cualquier contaminación con ácidos nucleicos exógenos además de esto siempre se debe de mantener una correcta conservación de los reactivos y las muestras a 4°C antes y durante el proceso, conservando la muestra congelada hasta justo antes de iniciar la extracción.

Extracción de ADN

Básicamente como se había mencionado existe un gran numero de técnicas de extracción, las cuales son las siguientes:

- Extracción de ADN por la técnica fenol-cloroformo: método en el cual se realiza fundamenta con la lisis total de las células y sus estructuras subcelulares mediante el empleo de detergentes con la posterior eliminación de las proteínas mediante su extracción y la de componentes lipídicos con solventes orgánicos lo cual deja al ADN puro, esta es muy usada debido a la cantidad y calidad del ADN, los pasos que se usan son los siguientes:

1. Lisis de las células y liberación del ADN: este paso se basa en la extracción es la homogeneización del tejido y la lisis con detergentes (Triton o docedil sulfato sódico, SDS) capaces de romper las membranas celular y nuclear, y liberar el ácido nucleico de las células de donde se extraerá el ADN, este proceso es realmente difícil ya que debe ser lo suficientemente agresivo como para lograr la fragmentación del tejido y la rotura de la membrana celular, sin dañar el ácido nucleico, comúnmente se utiliza un buffer de lisis para poder lograr este proceso. Cuando este proceso se enfoca en el ADN, la homogeneización se lleva a cabo con un homogeneizador manual para evitar la rotura mecánica de la molécula; para el ARN se emplea un homogeneizador eléctrico que gira a unas 200 a 1000 rpm y para las células con pared celular, como las células vegetales, se prefiere el empleo de sonicadores, los cuales, mediante ondas de sonido, rompen la pared celular y la membrana celular y nuclear, para liberar el ADN. En el caso de la sangre periférica como sabemos debe de utilizarse tubos con EDTA.
2. Extracción de proteínas y lípidos con solventes orgánicos: paso enfocado en concluir la lisis celular y la inactivación de nucleasas, se retiran los restos celulares, proceso conocido como purificación, básicamente aquí se combinan estrategias tan diversas como la extracción/precipitación, la cromatografía, la centrifugación, la electroforesis y la separación por afinidad, existen dos procesos importantes en este paso los cuales son: a) una fase orgánica (fenólica) en la parte inferior del tubo de precipitado que contiene lípidos, proteínas y b) una fase acuosa en la parte superior (menos densa), que contiene los ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles
3. Precipitación de ADN: una característica importante es que los ácidos nucleicos son insolubles en soluciones alcohólicas por esta misma razón el ADN disuelto en la solución acuosa se precipita añadiendo alcohol absoluto (isopropanol o etílico), un punto a recalcar es que para facilitar la precipitación también suelen añadirse cationes monovalentes (K^+ , Na^+ , NH_4^+) a la solución de ácidos nucleicos cargados negativamente, con el fin de generar sales insolubles en alcohol de fácil precipitación, dentro de los cuidados que deben realizarse en este paso es que la precipitación se favorece incubando a bajas temperaturas ($-20^{\circ}C$); una centrifugación posterior permite la obtención de una pastilla o botón del ácido nucleico en el fondo del tubo, al decantar el alcohol

4. Lavado del ADN: con el botón ya obtenido por el proceso anterior veremos que se debe de lava con etanol al 70% por, al menos, dos ocasiones. El contenido de alcohol de esta solución (70%) mantiene al ADN precipitado, y el H₂O (30%) permite la disolución de las sales presentes posterior a esto se seca y se evapora el alcohol
5. Disolución del ADN y adición de ARNs: posterior a la evaporación sabremos que el botón de ADN se disuelve en soluciones que aseguren su preservación, como agua estéril y libre de ADNsas, o bien soluciones amortiguadoras, como el buffer Tris EDTA (TE), específicamente es vital saber que debe de haber una cantidad exacta para las correctas disoluciones tanto para el ADN así como para el ARN

Cuantificación de los ácidos nucleicos

Existen dos métodos vitales y comunes para la cuantificación, los cuales son:

1. Espectrofotometría: método el cual tiene un fundamento importante: cualquier solución que contenga moléculas suspendidas permite el paso de un haz de luz a través de ella en proporción inversa a la cantidad de moléculas que contiene, sabiendo esto veremos que los nucleótidos de ADN y ARN presentan la absorción máxima a una longitud de onda de 260 nm (luz ultravioleta, UV); por lo tanto, los espectrofotómetros son los aparatos más utilizados para determinar la concentración de ácidos nucleicos en solución de igual manera este método también maneja una densidad óptica (OD) la cual es una unidad de absorbancia y tiene valores particulares para cada molécula específica en una determinada longitud de onda por unidad de distancia, para los ácidos nucleicos se tiene una OD de 1 a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADNds, 37 µg/ml de ADNss, 40 µg/ml de ARN o 33 µg/ml de oligonucleótidos.

Valoración de la pureza del ácido nucleico extraído

Realmente los métodos que se realizan son bastante buenos y eficientes aun no se puede eliminar por completo las proteínas celulares que acompañan al ADN, así como solventes u otros componentes orgánicos empleados en la extracción por esta misma razón los mismos se presentan como contaminantes de la solución de ácido nucleico, lo que puede repercutir en las técnicas en que se pretenda emplear el ácido nucleico

2. Fluorometría: método el cual se basa en la unión específica de colorantes fluorescentes al ácido nucleico, que absorbe luz de una determinada longitud de onda y emite luz de una longitud de onda superior (de menor energía) específicamente es más sensible que la espectrofotométrica, y menos susceptible a las interferencias por proteínas y contaminantes presentes en la solución por esta razón se tiene requerimientos más extensos para una correcta concentración, los colorantes más empleados para esta concentración son el Hoechst 33258, una bis-benzimida que se intercala en la doble cadena de ADN en regiones ricas en AT, que se excita en el espectro UV (350 nm) y emite en el visible a 450 nm, los materiales utilizados son los fluorómetros que mandan la señal electrónica para la misma concentración de una sustancia varía de un instrumento a otro, por lo que mediciones hechas en equipos diferentes no pueden compararse

Preservación del ADN

Como sabemos es vital la congelación del ácido nucleico para tener una conservación correcta. Es importante recordar que a menor temperatura la preservación se prolonga, así como que múltiples descongelaciones ocasionan una degradación progresiva en los ácidos nucleicos, por lo que se recomienda hacer alícuotas

Técnica de isotiocianato de guanidina/fenol-cloroformo para extracción de ARN total

Los componentes mencionados funcionan como componentes de solución para la lisis ya que el isotiocianato de guanidina es un potente desnaturizante de proteínas con capacidad de inhibir ARNsas, por lo que es ampliamente utilizado en la extracción de ARN. El fenol y el cloroformo se utilizan en la extracción del ARN con los mismos fines que en la extracción del ADN (formar las fases orgánica y acuosa, desnaturizar proteínas e inactivar nucleasas). Teniendo esto en cuenta es importante mencionar que solución fenólica empleada en la extracción del ARN es ácida (pH 5 a 6), para favorecer la extracción del ARN sobre la del ADN, ya que a pH ácido, el ADN es retenido en la fase orgánica y en la interfase, dejando el ARN en la fase acuosa, posteriormente el ARN se purifica mediante precipitación a baja temperatura con isopropanol y con ayuda de una centrifugación de manera similar a como se hace con ADN

Otros métodos de extracción

Realmente existen muchos métodos de extracción con diferentes fundamentos, como por ejemplo los siguientes:

- Gradiente con cloruro de cesio: se trata de un método utilizado para la elaboración de genotecas de ADNc, en las que se requiere ARN alta pureza e integridad o para aislar ARN de tejidos con altos niveles de ARNs endógena, como el páncreas
- Cromatografía por exclusión de tamaño: método con el fundamento de la purificación en gel de agarosa de un ácido nucleico de determinado tamaño, usado sobre todo en la clonación de vectores, específicamente es una técnica rápida y reproducible.
- Cromatografía de intercambio iónico: técnica utilizada separar proteínas, se ha convertido en un método alternativo que permite la concentración y la purificación de ADN de calidad, de manera rápida y con la misma eficacia que la extracción por gradientes de CsCl.
- Cromatografía de absorción: técnica en donde los ácidos nucleicos en solución se fijan de forma selectiva en sílice o vidrio, en presencia de sales caotrópicas, mientras que proteínas, metabolitos y otros contaminantes se eliminan mediante lavados

Preguntas

1. Calcular la concentración de ARN en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ obtenida de una muestra diluida 1:25 que arrojó una absorbancia de 0.185 leída a 260 nm

Se corresponde con una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$

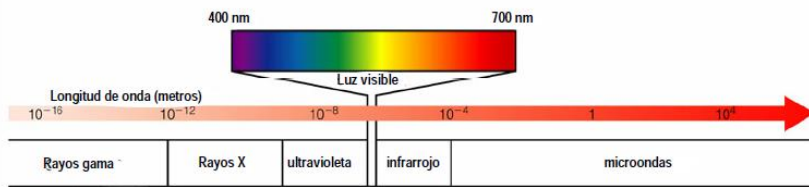
2. Valorar la pureza de la preparación de ácidos nucleicos obtenida de una muestra cuya absorbancia a 260 nm fue de 0.57; mientras que a 280 nm fue de 0.31. Según el índice $260\div 280$, ¿qué pureza tiene la muestra? Explique la interpretación del resultado

Puedo mencionar que hubo un cambio en la pureza de cada muestra debido a que existe la diferencia de sensibilidad debido a la presencia de contaminantes en la muestra puede ser disolventes y reactivos residuales

3. Calcule la cantidad de ADN por gramo de tejido si la concentración de ADN fue de 350 ng/ μ l, partiendo de 100 mg de muestra.

¿?

4. Dibuje el espectro de luz infrarrojo, visible y ultravioleta e indique en su esquema en qué longitud absorben los ácidos nucleicos y las proteínas; además, explique por qué estas moléculas, a esos nanómetros, presentan un máximo de absorción



Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción debido a que absorben la luz con más

intensidad específicamente a 260 nm y las proteínas tienen una máxima de absorción debido a que tienen una longitud de onda de 280 nm

5. ¿Qué función tiene el detergente SDS frente a las membranas y las proteínas de la célula en la técnica de extracción de ácidos nucleicos?

R: básicamente se debe a que este detergente rompe los conglomerados de proteínas para promover la actividad enzimática

6. Investigue y explique cuáles propiedades tiene el fenol que favorecen que los ácidos nucleicos se queden en la fase acuosa y no en la fenólica

Básicamente veremos que se debe a que el fenol favorece la separación de los ácidos nucleicos que se mantienen en la fase acuosa