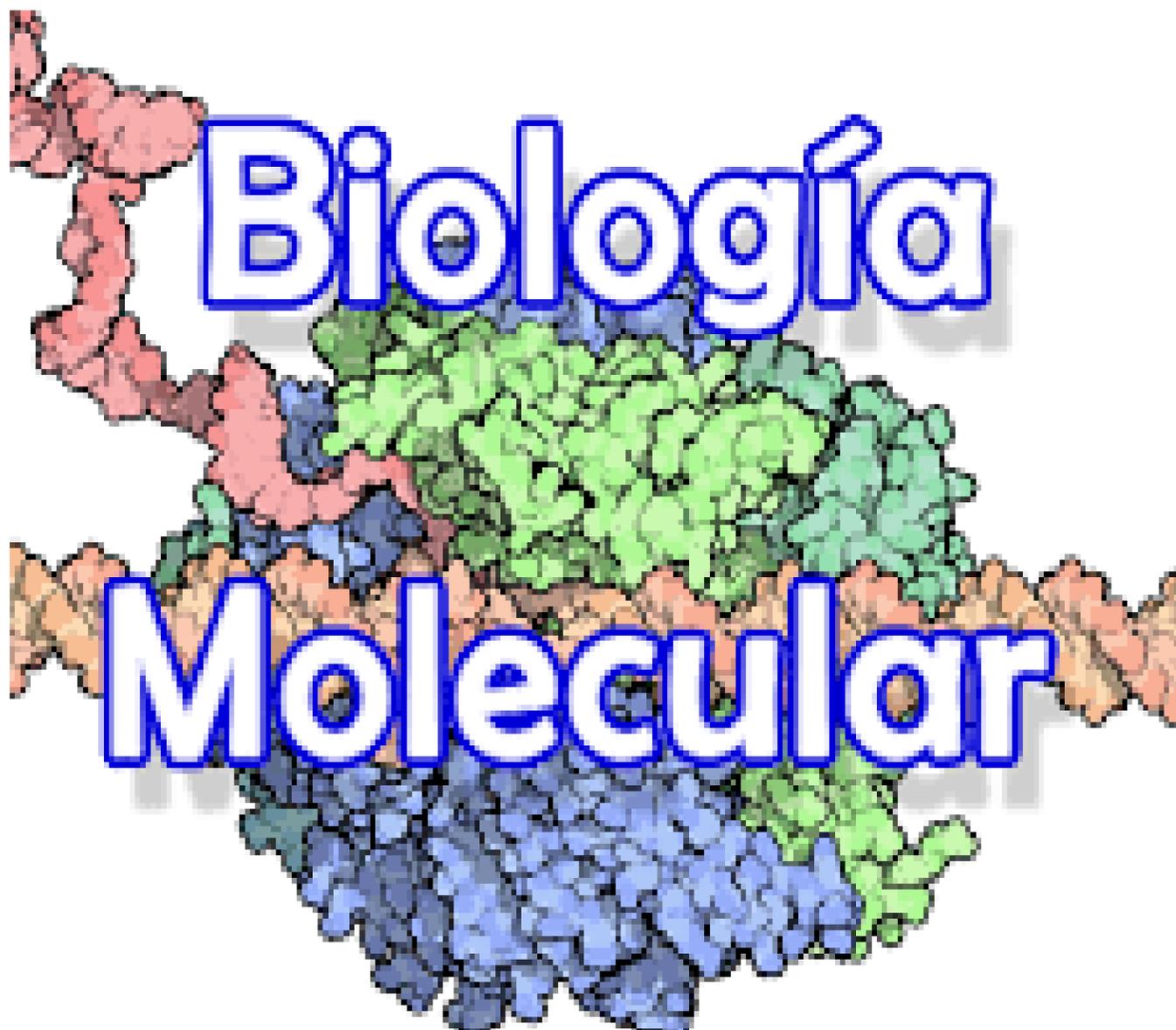


MARIA DEL PILAR CASTRO
PÉREZ



Resumen

Los ácidos nucleicos, el ADN y ARN reciben su nombre del hecho de ser moléculas con características acídicas (como la carga negativa en soluciones acuosas) y haberse localizado inicialmente en el núcleo celular, aunque ahora se sabe que también se encuentran en la mitocondria. La extracción de ácidos nucleicos es el primer paso para la mayoría de los estudios en biología molecular y para las técnicas del ADN recombinante. En el área médica, el ADN genómico suele extraerse para su uso en procesos como una PCR cualitativa o Southern blot, para diagnóstico, determinación de variantes alélicas o clonación en vectores. En teoría el ADN/ARN puede obtenerse de cualquier célula/virus que lo contenga; solamente los eritrocitos no se consideran una fuente de ADN/ARN, ya que son anucleados. Las fuentes posibles de material para la extracción de los ácidos nucleicos son: leucocitos (sangre), suero, plasma, biopsia, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido amniótico, esputo, semen, raspado bucal, folículo capilar, etc. Durante la extracción de ácidos nucleicos, y en particular en la extracción del ARN, que es una molécula más lábil ya que es de cadena sencilla, 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. Todo el proceso debe realizarse en frío; esto es, con los reactivos y las muestras a 4°C antes y durante el proceso, conservando la muestra congelada hasta justo antes de iniciar la extracción. Las técnicas comunes de extracción de ácidos nucleicos son muy diversas e incluyen procesamientos químicos y físicos que las diferencian. Extracción de ADN por la técnica fenol-cloroformo: Esta técnica se fundamenta en 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. El primer paso 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. El procedimiento de lisis celular es crítico y debe ser lo suficientemente agresivo como para lograr la fragmentación del tejido y la rotura de la membrana celular, sin dañar el ácido nucleico. Al concluir la lisis celular y la inactivación de nucleasas, se retiran los restos celulares, proceso conocido como purificación. Los métodos de purificación de ácidos nucleicos combinan estrategias tan diversas como la extracción/precipitación, la cromatografía, la centrifugación, la electroforesis y la separación por afinidad. Precipitación de ADN El ADN disuelto en la solución acuosa se precipita añadiendo alcohol absoluto (isopropanol o etílico), ya que los ácidos nucleicos son insolubles en soluciones alcohólicas. Lavado del ADN El botón de ADN obtenido en la precipitación se 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. Disolución del ADN y adición de ARNs Inmediatamente después de la evaporación del alcohol, 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). Cuantificación de los ácidos nucleicos Existen diversos métodos de cuantificación de ácidos nucleicos; los más usados son la espectrofotometría y la fluorometría. El fundamento de la espectrofotometría es que 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. e la técnica de extracción de ácidos nucleicos esté bien realizada, es prácticamente imposible eliminar la totalidad de las proteínas celulares que acompañan al ADN, así como solventes u otros componentes orgánicos empleados en la extracción, los cuales 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. La cuantificación de ADN o ARN por fluorometría es 1000 veces más sensible que la espectrofotométrica, y menos susceptible a las interferencias por proteínas y contaminantes presentes en la solución. Esta metodología 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). El ácido nucleico se mantiene en congelación (-80°C es la temperatura recomendada) hasta su empleo. La extracción de ARN de células eucariotas se lleva a cabo para desarrollar estudios de expresión génica (análisis de los niveles de ARNm), para el diagnóstico de enfermedades ocasionadas por virus de ARN o, en el caso de bacterias, para análisis de expresión de genes o validar la clonación del ADN complementario (ADNc) en un vector. Consideraciones especiales al trabajar con ARN La molécula de ARN es sumamente lábil, por lo que la clave en la extracción es evitar su degradación por acción de ribonucleasas propias de la célula. Los protocolos existentes se basan en una rápida inactivación de ARNsas endógenas, muy estables y que no requieren de cofactores para funcionar. La centrifugación en gradientes de CsCl sirve para la purificación de ambos ácidos nucleicos, aunque su uso principal es el aislamiento

del ADN genómico y plasmídico. Es una técnica laboriosa, prolongada y que requiere de un equipo especializado, como una ultracentrífuga. Cromatografía por exclusión de tamaño Esta técnica se fundamenta en la separación de ácidos nucleicos de acuerdo con su peso molecular, empleando una columna empaquetada con una matriz de gel conformada por partículas poliméricas orgánicas o de sílice; ambos materiales, mecánica y químicamente estables y con un contenido bajo en grupos iónicos, originan una red de poros hidrofílicos uniformes. Cromatografía de intercambio iónico Empleada por lo común para 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. Los ácidos nucleicos en solución se fijan de forma selectiva en sílice o vidrio, en presencia de sales cao trópicas, mientras que proteínas, metabolitos y otros contaminantes se eliminan mediante lavados. Posteriormente, los ácidos nucleicos se recuperan con una solución hiposalina. La importancia de la calidad del ácido nucleico extraído es crucial para su uso posterior en técnicas moleculares, por lo que el personal que realice estos procedimientos debe estar capacitado para observar las buenas prácticas de laboratorio, condición indispensable para obtener una cantidad y una calidad adecuadas de ARN o ADN.

Preguntas y Actividad

Ejercicios de integración

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.
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.
3. Calcule la cantidad de ADN por gramo de tejido si la concentración de ADN fue de $350 \text{ ng}/\mu\text{l}$, partiendo de 100 mg de muestra.

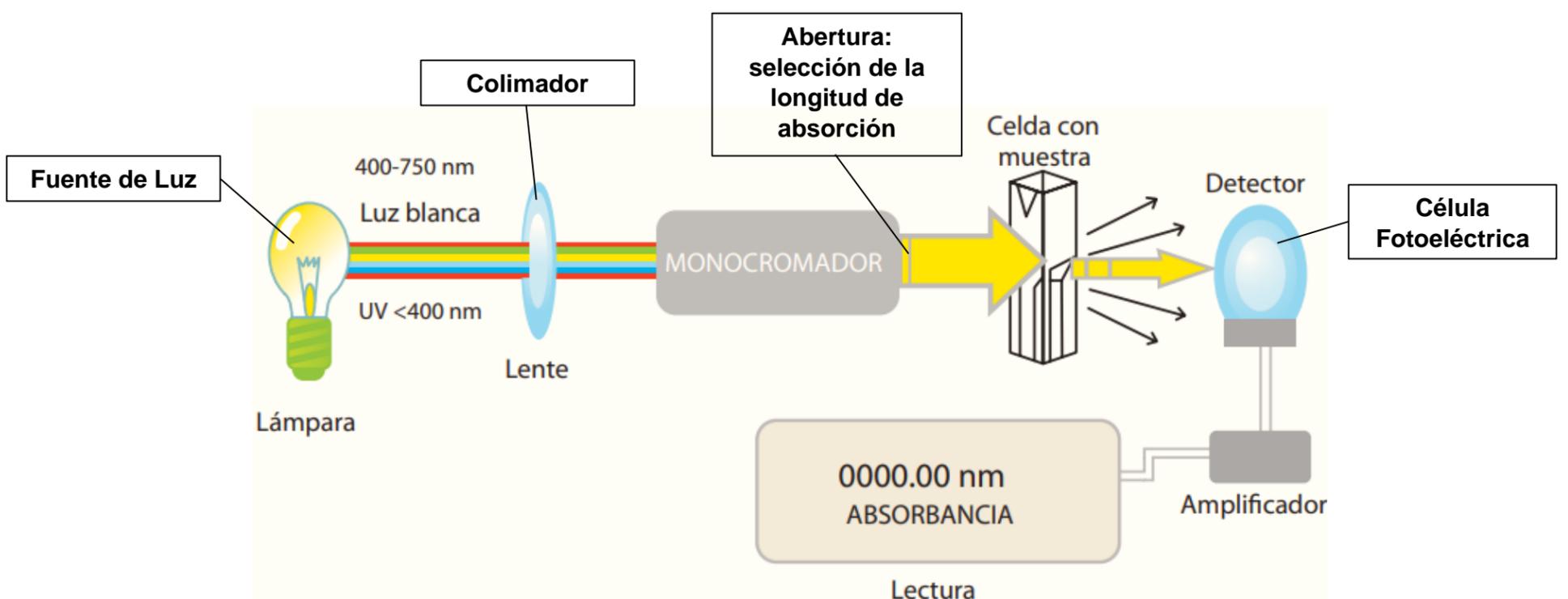
R: $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN = $0.185 \text{ a } 260\text{nm} \times 1:25 \times 40/1000$
 $= 9.25/1000 = 0.00925 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ concentración de ARN

R: Índice $260/280 = \text{OD} = 0.57 \text{ a } 260\text{nm} / \text{OD} = 0.31 \text{ a } 280\text{nm} = 1.83$
 La muestra tiene una pureza optima, ya que cuando éste se encuentra entre 1.8 y 2.0, se considera óptimo, ya que valores cercanos a 1.8 indican que la muestra contiene casi exclusivamente ADN; para el ARN el índice óptimo es de 2.0.

R: La cantidad de ADN por gramo de tejido es de 3.6 gramos, lo que equivale a 3600 mg de muestra partiendo de los 100mg 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.

R: Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. La absorción de UV de DNA es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de DNA.



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: Este detergente rompe los conglomerados de proteínas para promover la actividad enzimática. Dodecil Sulfato De Sodio (SDS): es un detergente iónico utilizado para desnaturalizar proteínas en hibridación, purificación de ácidos nucleicos y sistemas de buffer de electroforesis.

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

R: Buen rendimiento. Permite el aislamiento de todo tipo de ácido nucleico. El cloroformo se mezcla con el fenol para reducir las pérdidas de ARN total, esto favorece la separación de los ácidos nucleicos que se mantienen en la fase acuosa. A partir de células procariotas se llevará a cabo el aislamiento de ácidos nucleicos mediante un lisado se extrae con fenol. El fenol y el agua son inmiscibles, las proteínas se extraen en la fase fenólica y se separan de los ácidos nucleicos que se quedan en la fase acuosa propiedades físicas.