

SINTESIS

CAP 11

BIOLOGIA MOLECULAR

**ROLANDO DE JESUS
PEREZ MENDOZA**

**IQ.JOSE LUIS MUÑOZ
MORALES**

**UDS UNIVERSIDAD
DEL SURESTE**

**SAN CRISTOBAL
DE LAS CASAS**

**06 DE JUNIO
DEL 2021**



Extracción de ácidos nucleicos

Consideraciones para la extracción de ácidos nucleicos

La molécula de ADN con independencia de la estabilidad química dada por su estructura helicoidal, es físicamente frágil, por ser larga, tortuosa y con un peso molecular alto, lo que provoca que se someta a fuerzas hidrodinámicas que la disgregan.

Elección del método de extracción

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.

Tipo de ácido nucleico que se va a extraer: ADN de cadena sencilla (ADNss), DNAds, ARN total, ARN mensajero (ARNm) o ARN ribosomal (ARNr).

Fuente del ácido nucleico

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.

Extracción de ADN

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

Lisis de las células y liberación del ADN

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

Extracción de proteínas y lípidos con solventes orgánicos

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 DNAsas, 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

Espectrofotometría

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.

Dilución: como se requieren volúmenes relativamente grandes de solución para cubrir la capacidad de las celdas de los espectrofotómetros, suelen manejarse diluciones 1:100 a 1:1000 del stock de ADN, en una solución en fosfato de sodio dibásico, 1.5 μ M a pH 5.2 (Na₂HPO₄), que permite leer los nucleótidos sin interferencia

Constante: proveniente del valor teórico de OD para cada ácido nucleico: a) 50 para el ADNds; b) 40 para ARN; c) 33 para oligonucleótidos, y d) 37 para ADNss.

Valoración de la pureza del ácido nucleico extraído

A pesar de que 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.

Contaminación con proteínas: índice 260÷280 Dado que las proteínas (en particular los aminoácidos aromáticos) absorben luz a una longitud de onda de 280 nm, por lo común el índice de absorción 260÷280 nm se utiliza para valorar la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a la contaminación con proteínas.

Contaminación con fenol y sales: índice 260÷230 La absorción de luz UV a una longitud de onda de 230 nm significa que la muestra está contaminada con iones fenolatos o tiocianatos, péptidos, compuestos aromáticos u otras sustancias

Fluorometría

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).

Preservación del ADN

El ácido nucleico se mantiene en congelación (-80°C es la temperatura recomendada) hasta su empleo

Extracción de ADN

por la técnica de salting OUT Si bien muchos pasos y soluciones son comunes al método de extracción por fenol-cloroformo, la principal diferencia en esta metodología radica en el

empleo de una solución concentrada de sales en lugar de solventes orgánicos para la lisis celular y la extracción de proteínas.

Extracción de ARN

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

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

El isotiocianato de guanidina y el fenol se utilizan como componentes de la solución de lisis. El isotiocianato de guanidina es un potente desnaturalizante de proteínas con capacidad de inhibir ARNsas, por lo que es ampliamente utilizado en la extracción de ARN.

Otros métodos de extracción

Los métodos comerciales para la extracción de ácidos nucleicos suelen basarse en cromatografía de intercambio aniónico, y emplean algún tipo de columna

Gradiente con cloruro de cesio

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

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.

Cromatografía de absorción

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 finales del cap. 11

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 puede realizar a través de una Espectrofotometría o Fluorometría, Los nucleótidos de ADN y ARN presentan la absorción máxima a una longitud de onda de 260 nm, una OD de 1 a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADNds, 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADNss, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN o 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligonucleótidos los espectrofotómetros, suelen manejarse diluciones 1:100 a 1:1000 del stock de ADN, en una solución en fosfato de sodio dibásico, 1.5 μM a pH 5.2 (Na_2HPO_4)

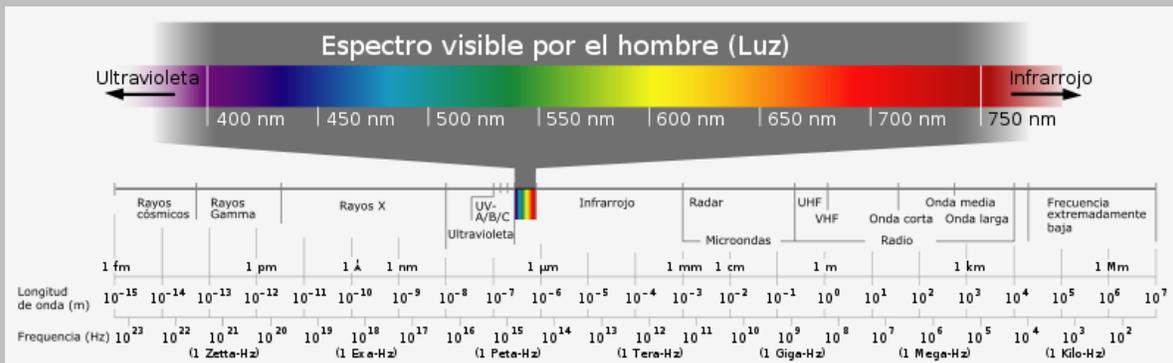
2. Valorar la pureza de la preparación de ácidos nucleicos obtenida de una muestra cuya absorbancia a 260 nm fue de 0.57; mientras que a 280 nm fue de 0.31. Según el índice $260\div 280$, ¿qué pureza tiene la muestra? Explique la interpretación del resultado.

El índice de absorción $260\div 280$ nm se utiliza para valorar la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a la contaminación con proteínas. Cuando éste se encuentra entre 1.8 y 2.0, se considera óptimo, disminuir hasta 0.2 a 0.3 unidades el índice, mientras que la basicidad puede aumentar la absorción de luz de estas moléculas es característico, la absorción en otras longitudes de onda de la muestra de ácidos nucleicos se compara con la absorción a 260 nm, con el fin de valorar la pureza del ácido nucleico extraídos

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

la doble cadena de ADN en regiones ricas en AT, que se excita en el espectro UV (350 nm) en 100mg

4. 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.



La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración –a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas-; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución –a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará ...

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?

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

Se debe a su PH ya que para la purificación de ADN el fenol debe tener un pH≈7-8. Posteriormente se precipita el ADN de la fase acuosa con isopropanol o etanol absoluto y se lava con etanol al 70% para eliminar sales y pequeñas moléculas orgánicas que podrían aún estar presentes en la muestra

Bibliografía:

Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem, 1987;162:156–159.

Miller D.D., Dykes H.F., Polesky S.A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cell. Nucleic Acids Res,

1988;16:1215.

Quiagen. Sample and assay technologies. RNeasy MicroKit English

(pdf). Disponible en: <http://www.qiagen.com/products/>.

Sambrock J., Russell D., Molecular cloning: A laboratory manual,

Vol 1, 3ª ed. Nueva York: Cold Spring Harbor, 2001.

