



### 1. TÍTULO PRÁCTICA DE LABORATORIO:

#### EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO – MÉTODO: KIT COMERCIAL (NucleoSpin® Blood)

**Integrantes:**

**Código:**

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

### 2. OBJETIVOS

#### General:

- Comprender los principios físico-químicos que permiten la extracción y purificación de ADN genómico de células humanas.

#### Específicos:

- Entender el fundamento teórico del proceso de extracción del ADN genómico a partir de muestras de sangre humana.
- Extraer y purificar ADN genómico a partir de muestras de sangre humana.
- Conocer y utilizar equipos y reactivos básicos empleados en Biología Molecular.

### 3. REFERENTES CONCEPTUALES

Actualmente el aislamiento de ADN es un paso esencial para muchos experimentos y gracias a las diferentes técnicas del ADN recombinante que se han desarrollado, hoy en día es posible aislar, secuenciar y manipular genes individuales derivados de cualquier tipo celular. Aunque los métodos son muy sencillos, los procedimientos deben ser adaptados al organismo del cual se obtendrá el ADN debido a que la estructura y composición de los organismos varía. Las diferencias entre las técnicas han de tener en cuenta la organización, la cantidad y la pureza del ADN que se requiere para posteriores análisis (cantidad de contaminantes como polisacáridos, ácidos nucleicos y nucleasas).

El procedimiento básico para la extracción de ADN se puede dividir en varios pasos, algunos de los cuales se realizan simultáneamente, dependiendo del protocolo a usar, finalizando con la cuantificación y verificación de la calidad del ADN obtenido. Los pasos comunes a todos los métodos de extracción de ADN son:

- **Lisis celular:** Los métodos más usados se basan en el uso de detergentes aniónicos, enzimas, agentes desnaturizantes o la combinación de éstos, que permiten la ruptura de las membranas celulares.
- **Eliminación de proteínas:** Se lleva a cabo mediante el uso de enzimas proteolíticas tales como la proteinasa K. Algunos protocolos de extracción realizan lisis con detergentes como el SDS



en presencia de la proteínasa K en un solo paso. Adicionalmente, la digestión se acompaña del uso de la sal sódica del ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) para inhibir la acción de las ADNasas.

- **Eliminación de ARN:** Se realiza mediante la digestión del ARN con ARNasas como la ribonucleasa A pancreática bovina. Este paso en algunos protocolos se lleva a cabo después de la extracción de ADN.
- **Purificación:** se lleva a cabo con solventes orgánicos tales como el fenol y el cloroformo, los cuales tienen la propiedad de desnaturalizar las proteínas. El cloroformo suele acompañarse de alcohol isoamílico en proporción 24:1 volumen a volumen (v:v) para facilitar la separación de las fases acuosas y orgánicas. Estos solventes se utilizan en una relación de 1:1 (v:v) de la muestra que se pretende limpiar, quedando las proteínas desnaturalizadas en la interfase de la solución, mientras el ADN queda en la fase acuosa.
- **Precipitación del ADN:** Se logra mediante la precipitación con etanol en presencia de cationes monovalentes a concentración de 0,1 a 0,5M. El etanol en presencia de estos cationes induce un cambio estructural en el ADN que causa la agregación y precipitación del mismo. Adicionalmente, con este tratamiento se remueven los residuos de fenol y cloroformo.

Existen diferentes estuches (o kits) comerciales que permiten la extracción del ADN, en esta práctica se empleará un kit comercial que puede ser empleado para la extracción de ADN genómico a partir de diferentes tipos de muestras tales como sangre total, células eucariotas en cultivo, suero, plasma u otros fluidos biológicos. El método se basa en la obtención de un lisado inicial de la muestra que será posteriormente pasado a través de una columna con membrana de sílica, a la cual se unirá el ADN. Posteriormente el ADN se lava y se eluye desde la membrana para así recuperarlo en un microtubo, listo para observarlo en gel de agarosa que nos permite determinar la integridad del ADN y si es adecuado para usarlo en otras reacciones como clonación, amplificación por PCR o secuenciación.

#### 4. ACTIVIDADES PREVIAS (revise al final de la guía el formato para el desarrollo de estas actividades en el informe de la práctica)

- 4.1. Mencione los diferentes tipos de células que componen la sangre. ¿Qué significa una muestra de sangre total?
- 4.2. Indique que composición suelen tener los tampones (o *buffer*) de lisis y analice cuál es el efecto de cada uno de sus componentes sobre las células. Analice porque se debe adicionar proteínasa K en el procedimiento.
- 4.3. Analice por qué se debe realizar una incubación a temperatura alta (70°C).
- 4.4. Analice por qué se debe realizar lavado de las columnas luego de la lisis e indique que componentes suelen tener los tampones de lavado.
- 4.5. Investigue cómo están diseñadas las columnas de los kits de extracción de ácidos nucleicos y analice cómo funcionan estas como para permitir la extracción y purificación de ADN.

#### 5. MATERIALES Y REACTIVOS

MATERIALES REQUERIDOS POR PRÁCTICA	
Micropipetas 20µL, 50µL, 200µL y 1mL	3 juegos
Puntas para micropipeta de 1000µL	2 cajas



Puntas para micropipeta de 200 $\mu$ L	2 cajas
Puntas para micropipeta de 10 $\mu$ L	2 cajas
Gradilla para tubos de 10 mL	1

<b>MATERIALES REQUERIDOS POR GRUPO DE TRABAJO</b>	
Microtubos tipo eppendorf (1,5 mL)	3
Gradilla para microtubos	1
Columnas kit comercial	1
Tubos colectores del kit comercial	2

<b>REACTIVOS REQUERIDOS</b>	
Etanol 96-100%	5 mL
Muestra de sangre en EDTA	5 mL
<b>Kit Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification:</b>	
Proteinasa K	25 $\mu$ L por grupo
Tampón de lisis B3	200 $\mu$ L por grupo
Tampón de lavado BW1	500 $\mu$ L por grupo
Tampón de lavado BW5	600 $\mu$ L por grupo
Tampón de elución	100 $\mu$ L por grupo

<b>EQUIPOS REQUERIDOS</b>	
Baño maría 70°C	1
Vórtex	1
microcentrifuga	1

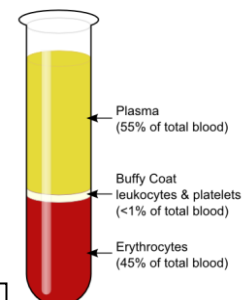
<b>MATERIALES QUE DEBEN TRAER EL ESTUDIANTE</b>	
Toallas de papel secante	
Marcadores para plástico o vidrio	
Elementos de bio-protección (gafas, cofia, tapabocas, guantes, bata, zapatos cerrados)	

## 6. PROCEDIMIENTO

Para el desarrollo de esta práctica se utilizará el kit comercial denominado NucleoSpin® Blood (Macherrey- Nagel™. Las figuras provienen de la guía del fabricante.

### 6.1. Preparación de la muestra

- A partir de una muestra de sangre total tomada con anticoagulante EDTA, tome 500  $\mu$ L y colóquelos en un microtubo de 1,5 mL. Centrifuge y extraiga el *buffy coat* (unos 200 $\mu$ L) en otro microtubo de 1.5 mL. Si es sangre humana omita este paso, una gran cantidad de leucocitos puede tapan la columna.



**Figura 1.** A la derecha se observa un esquema de las fracciones de una muestra de sangre total una vez centrifugado.



## 6.2. Lisis de la muestra

- A los 200ul de buffy coat (o sangre completa en su defecto) adicione 25uL de proteinasa K y 200uL de buffer de lisis B3.
- Mezcle por vórtex.
- Ponga a 70°C en baño maría por 15 minutos.

## 6.3. Ajuste de las condiciones de unión del DNA

- Adicione 210ul etanol (96-100%).
- Mezcle por vórtex.

## 6.4. Unión de DNA a la columna

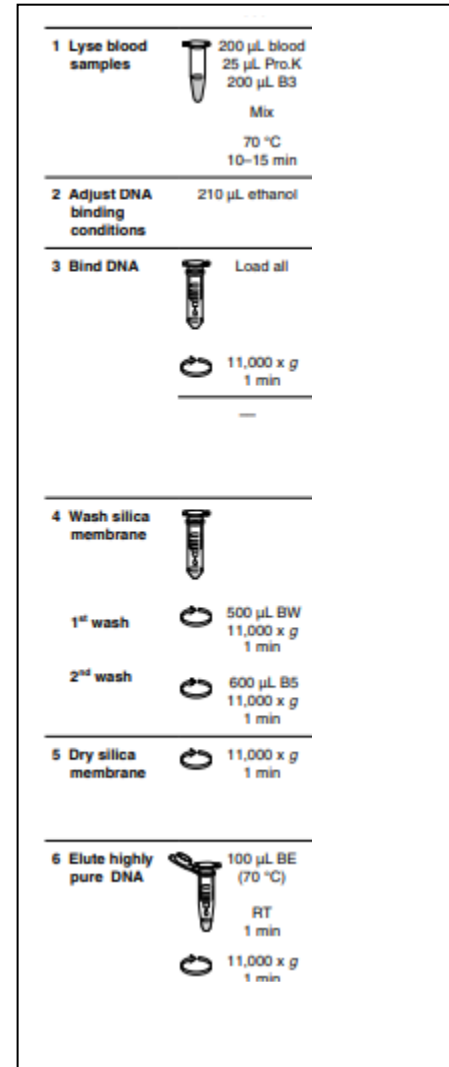
- Ponga en contenido en la columna y centrifugar a 11,000xg por 1 minuto.
- Deseche el contenido del tubo colector.

## 6.5. Lavados

- Ponga 500ul de buffer de lavado BW (1) en la columna que tiene el DNA adherido.
- Centrifugue a 11,000xg por 1 minuto.
- Deseche el contenido del tubo colector.
- Ponga 600ul de buffer de lavado B5 (2) en la columna que tiene el DNA adherido.
- Centrifugue a 11,000xg por 1 minuto.
- Deseche el contenido del tubo colector.
- Para eliminar el etanol restante, centrifugue nuevamente a 11,000xg por 1 minuto.
- Deseche el contenido y el tubo colector.

## 6.6. Elución

- Ponga un tubo colector nuevo, en la columna y poner 100uL de buffer de elución precalentado a 70°C (Si desea que el DNA quede más concentrado ponga entre 50 y 75uL de buffer de elución).
- Incube 1minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugue a 11,000xg por 1 minuto.
- El DNA quedará en el tubo colector, páselo a un tubo eppendorf con tapa y rotule.



**Figura 2.** En la figura se observa el esquema del procedimiento del kit comercial a realizar en la práctica

**Manejo de residuos:** los residuos deben descartarse en caneca verde (orgánico), gris (reciclable) y roja (peligroso). Residuos de sustancias químicas deben ir en recipientes especializados.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Jhonson T., Case, C. Laboratory experiments in microbiology. 6a. Edición. San Francisco (California USA). Ed. Addison Wesley Logman, Inc.; 2001.
- INFORMACIÓN DEL PRODUCTO: NucleoSpin® Blood (Macherrey- Nagel™). [https://www.mnnet.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM\\_gDNABlood.pdf](https://www.mnnet.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNABlood.pdf)



## 8. GUÍA PARA LA REALIZACIÓN DEL INFORME DE LABORATORIO

- Para el informe de la práctica se presentará uno por grupo de trabajo (máximo 4 integrantes).
- **El día de la práctica se debe entregar este informe de laboratorio.**
- A continuación, encontrará el formato para realizar el informe.



## INFORME DE PRÁCTICA DE LABORATORIO

### 1. TÍTULO PRÁCTICA DE LABORATORIO:

**EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO – MÉTODO: KIT COMERCIAL NucleoSpin® Blood**

**Integrantes:**

**Código:**

---

---

---

---

---

---

---

---

### 1. FLUJOGRAMA (valor 0,5)

Realice un flujograma del procedimiento a seguir para desarrollar el protocolo de purificación de ADN de células sanguíneas, descrito en esta práctica.

### 2. RECOPIACIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES

Coloque la evidencia del proceso experimental

### 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS (valor 3,0)

Desarrolle aquí las preguntas del numeral 4 de la guía (actividades previas).

### 4. CONCLUSIONES (valor 1,0)

Redacte una conclusión que resuelva la siguiente pregunta: en medicina ¿qué utilidad puede tener el conocer el procedimiento realizado en esta práctica?

### 5. BIBLIOGRAFÍA (valor 0,5)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver.