

1. Título práctica de laboratorio:

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO BACTERIANO

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General

- Comprender los principios físico-químicos que permiten la extracción y purificación de los ácidos nucleicos.

Específicos:

- Aprender a extraer y purificar ADN genómico de bacterias mediante el procedimiento de HotSHOT (Hot Sodium Hydroxide and Tris), basado en la técnica de lisis alcalina.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

Aislamiento de Ácidos Nucleicos

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).

Los pasos comunes en todos los procedimientos son la lisis celular, la separación de proteínas y lípidos, y la precipitación de ADN.

Lisis Celular

Con este procedimiento se modifican o destruyen las moléculas de la pared celular y la membrana plasmática (y la envoltura nuclear en el caso de células eucariotas). Para ello se usan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos. También se suelen usar inhibidores de ADNasas que inactiven las enzimas que puedan degradar el ADN.

Las bacterias son quizás las células de las cuales podemos extraer y obtener una buena cantidad de ADN sin mayores inconvenientes, por ejemplo, de suspensiones de bacterias se puede extraer ADN en cantidad suficiente en condiciones bastante suaves como pueden ser una simple ebullición,

congelación o una combinación de ambas, como el método que se utilizará para esta práctica denominado Hotshot (Brewster & Paoli, 2013).

Separación De Proteínas y Lípidos

Para degradar las proteínas asociadas al ADN se adiciona una proteasa y la fracción proteica se puede precipitar con sales como el acetato de amonio o el acetato sódico. Así mismo, proteínas y lípidos suelen ser separados del ADN utilizando solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Los solventes utilizados suelen ser fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. Estos solventes son altamente contaminantes tanto para los humanos como para el medio ambiente, por lo que actualmente se utilizan métodos de basados simplemente en la precipitación del ADN con etanol absoluto y centrifugación.

Precipitación del ADN

Como el ADN es insoluble en alcohol, este se puede precipitar utilizando etanol o isopropanol fríos (-20°C), y posteriormente recuperarlo por centrifugación. El alcohol también suele llevarse las sales añadidas con anterioridad. Finalmente, los restos de etanol y sales son eliminados con un lavado con etanol al 70% - centrifugación y los restos se eliminan por evaporación.

La muestra de ADN o pellet puede ser hidratado para mantenerlo en solución, de modo tal que puede ser re suspendido en agua (pH 7.0) o en una solución amortiguadora. Se debe re suspender con cuidado de no causar rotura de moléculas de alto peso molecular por lo que se recomienda incubar a 55°C de 1 a 2 horas y en agitación suave.

Una vez obtenido el ADN se puede almacenar a 4°C si su uso es inmediato; si se requiere almacenarlo por más tiempo se preserva a -20°C o -80°C durante meses, en soluciones de baja concentración de sales.

El aislamiento de ARN es muy diferente al aislamiento de ADN debido a las diferencias en las propiedades de cada uno de estos ácidos nucleicos y a que las ribonucleasas contaminantes pueden destruir rápidamente el ARN. Por ello las células deben lisarse bajo condiciones de inhibición de ARNasas y rápidamente.

4. CONSULTA PREVIA

- 4.1. Resuelva el taller anexo a esta guía y súbalo a la plataforma antes de la práctica de laboratorio (anexo 1).
- 4.2. Realice los cálculos matemáticos para preparar el tampón de lisis HotShot, teniendo en cuenta la concentración de las soluciones madre, la concentración de la solución de trabajo y el volumen final a preparar que será de 5 mL finales. Complete la siguiente tabla con los datos requeridos:

	Concentración solución madre	Concentración solución de trabajo	Volumen para preparar 5 mL de solución de trabajo
NaOH	1 N	25 mM	
EDTA disódico	0,1 M	0,2 mM	
Twwen 20	100 %	0,1 %	

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • Micropipetas de 200 μL • Micropipetas de 1 mL • 3 Microtubos • Gradilla microtubos • Vortex • Microcentrifuga • Baño María 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 mL de solución de lisis: <ul style="list-style-type: none"> ○ NaOH 25 mM ○ EDTA disódico 0,2 mM pH 12 ○ Tween 20 0,1% • 5 mL de Tris - HCl 40 mM pH 5 • 20 mL de cepa bacteriana crecida una noche. • 1 cubeta de hielo

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad (Bata, guantes de nitrilo, monogafas, tapabocas, etc)
- Toallas absorbentes: 5 hojas

6. PROCEDIMIENTO

El siguiente método de extracción de ADN es un protocolo sencillo, sin embargo, el tiempo de ejecución es de aproximadamente 4 horas, razón por la cual se realizarán los dos primeros pasos del proceso en la sesión de práctica de laboratorio: lisis celular y separación de proteínas y lípidos.

Extracción y purificación de ADN - Método Hotshot.

Lisis celular y eliminación de proteínas y lípidos

1. Crecer las células bacterianas toda la noche a 30°C o 37°C (la temperatura depende de la cepa) en medio líquido y a 250 rpm. El docente le entregará la cepa ya crecida.
2. Tomar 1 mL del caldo bacteriano y pasarlo a un microtubo (tenga en cuenta mezclar el caldo al momento de recoger la muestra).
3. Centrifugar 5 min a 10.000 rpm para coleccionar las células.
4. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el pellet de bacterias.
5. Adicionar **150 μ l de buffer de lisis** y resuspender las células.
6. Agitar en vórtex durante 30 segundos.
7. Incubar a 95°C por 15 min en baño María, o en su defecto, en un Erlenmeyer grande.
8. Después de la incubación, colocar los tubos en hielo o a 4°C, durante 5 minutos.
9. Adicionar 150 μ l de Tris-HCl 40mM, pH 5.0 para neutralizar la solución básica.
10. Mezclar suavemente mediante pipeteo y dejar sedimentar por 5 minutos.
11. Recoger 150 microlitros del sobrenadante en un tubo limpio.

- ✓ **5 μ l de este sobrenadante puede ser usado para una mezcla de reacción de PCR de 25 μ L.**
- ✓ **12 μ l pueden usarse para observar la muestra de ADN en gel de agarosa.**

Marcar bien los tubos con las muestras y entregarlas al docente para que estas sean almacenadas hasta la sesión de electroforesis en gel de agarosa.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alejos Velázquez, L. Aragón Martínez, M. y Cornejo Romero, A. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. Extracción y purificación de ADN. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/extraccion.pdf>
2. Somma, M. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Extracción y Purificación de ADN. Organización mundial de la salud oficina regional para Europa. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n4.pdf>
3. Eguiarte, L., Souza, V y Aguirre, X. (Compiladores). Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2007
4. Jhonson T. Y Case, C. Laboratory experiments in microbiology. 6a. Edición. San Francisco (California USA). Ed. Addison Wesley Logman, Inc.; 2001.
5. Jeffrey D. Brewster y George C. Paoli. DNA extraction protocol for rapid PCR detection of pathogenic bacteria. Analytical Biochemistry 442 (2013) 107-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.013>

8. GUÍA PARA REALIZACIÓN DEL INFORME DE LABORATORIO.

- Para el informe de la práctica se presentará uno por grupo de trabajo.
- A continuación, encontrará el formato para realizar el informe.

INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

1. FLUJOGRAMA (VALOR 0.5)

Realice un flujograma del procedimiento a seguir para desarrollar el protocolo de extracción de ADN que se realiza durante esta práctica. **Recuerde que será lo único que pueda ingresar a la práctica.**

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS (VALOR 3.0)

Desarrollo las actividades descritas en el numeral 4 de la guía. **Recuerde que esta actividad es previa a la práctica presencial.**

3. 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?

4. BIBLIOGRAFÍA (VALOR 0.5)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con las normas APA.

ANEXO 1. TALLER DE FUNDAMENTACIÓN PARA LA PRÁCTICA DE EXTRACCIÓN DE ADN.

Realice la lectura del siguiente artículo, y de acuerdo a la información brindada en este, responda las preguntas:

Marcos-Merino, José María, gallego, Rocío Esteban, & Ochoa de Alda, Jesús Gómez. (2019). Extracción de ADN con material cotidiano: desarrollo de una estrategia interdisciplinar a partir de sus fundamentos científicos. *Educación química*, 30(1), 58-69. Epub 14 de octubre de 2019. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2019.1.65732>

No copie y pegue, redacte lo que comprende y si considera necesario, acompañe con un dibujo o esquema detallado de lo que entiende

1. ¿Se puede extraer ADN de una muestra compuesta exclusivamente por eritrocitos? Explique su respuesta.
2. Para el primer paso de la extracción de ADN es necesario romper la envoltura de la célula ¿se puede usar el mismo método de ruptura para células humanas, protozoos, hongos, plantas o bacterias? Explique su respuesta colocando la información de forma clara y resumida en la siguiente tabla, considerando de qué está compuesta la envoltura celular de cada uno de los organismos de la lista (**no copie y pegue**, redacte):

Organismo	Condiciones del método de lisis celular
Células humanas	
Protozoos	
Hongos	
plantas	
Bacterias	

3. El ADN tiene carga neta negativa. Explique desde el enfoque fisicoquímico a que se debe esta característica y porque El ADN es soluble en agua.
4. Explique desde el enfoque fisicoquímico porque las sustancias detergentes solubilizan las membranas biológicas.
5. ¿Porque es importante mantener el pH tanto al interior de las células como cuando se realizan procedimientos con técnicas moleculares? ¿Qué tipo de sustancias se utilizan en laboratorio para mantener el pH constante durante los experimentos?
6. Explique desde el enfoque fisicoquímico porque las sales contribuyen a la lisis celular y a la precipitación de proteínas y lípidos.
7. Explique desde el enfoque fisicoquímico porque el etanol contribuye en la precipitación del ADN.
8. Según se desprende de la lectura de este artículo, ¿cuáles son las aplicaciones del uso de técnicas moleculares como la extracción de ADN?