

Práctica 3. Extracción de ADN, purificación y cuantificación

P3A: Extracción de ADN de saliva. Método de precipitación salina

DANAGENE saliva kit (BioTed, cod. 603.4)

P3B: Extracción de ADN de sangre. Método de columna de absorción

DANAGENE spin blood DNA kit (BioTed, cod. 606.1)

Fundamento

Los ácidos nucleicos son macromoléculas poliméricas encargadas de almacenar, transmitir y expresar la información genética de los seres vivos. Estas biomoléculas se encuentran en todos los seres vivos bajo dos fórmulas:

- El ácido desoxirribonucleico (ADN) que contiene la información genética y hereditaria de un organismo y se controla su transmisión a la descendencia.
- El ácido ribonucleico (ARN) que se encarga de la expresión del ADN mediante la síntesis de proteínas.

La estructura del ADN es una larga cadena de monómeros (nucleóticos) con una estructura secundaria de doble hélice complementaria que contienen la información genética codificada por la secuencia de sólo 4 bases [A: Adenina, T: Timina, C: Citosina y G: Guanina] (figura 1). El flujo de la información genética (transmisión y expresión) a partir de los genes del ADN es unidireccional y se recoge en el dogma central de la biología (figura 2).

La secuencia de ADN de un ser vivo es muy específica y conservada lo que permite identificar un organismo por técnicas moleculares como PCR o secuenciación a partir de la extracción de ADN de sus restos biológicos .

La extracción de ADN se puede realizar a partir de cualquier célula o tejido de un ser vivo. El ADN está confinado en el interior de las células principalmente en el núcleo de la célula o en órganos citoplasmáticos como mitocondrias o cloroplastos protegidos por membranas. Para tener acceso al DNA se debe vencer las barreras que constituyen las membranas y paredes en su caso.

La **extracción** de ADN permite exponer esta molécula a diversos reactivos y enzimas para realizar diferentes técnicas de diagnóstico y la **purificación** permite eliminar sustancias y elementos que pueden interferir en los análisis.

En la práctica realizamos la extracción de ADN genómico a partir de 2 muestras biológicas: células de la mucosa bucal (incluidas en la saliva) y de la sangre.

Cualquier protocolo técnico se divide en 3 fases:

1. Pretratamiento de la muestra
2. Extracción del ADN
3. Purificación del ADN

Figura 1. Estructura del ADN: Cromosoma vs cromatina

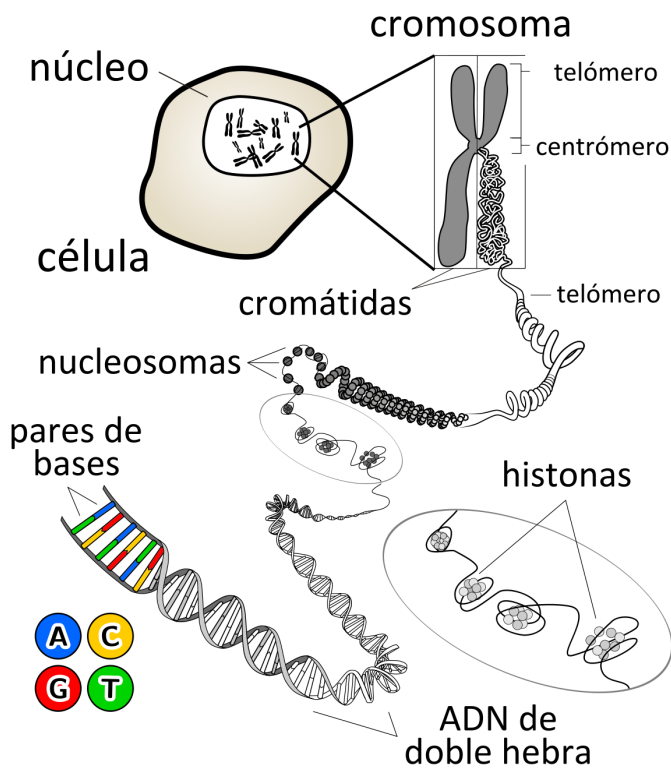
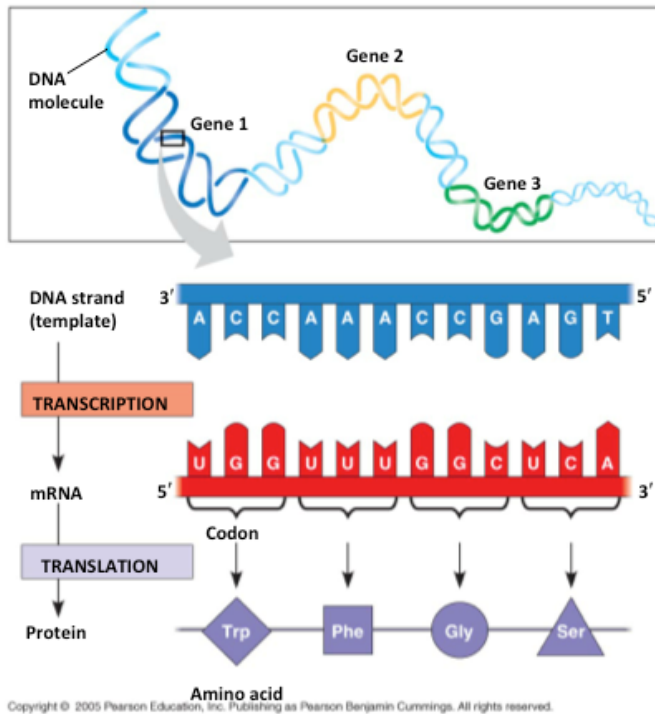


Figura 2. Flujo de la información genética: ADN-RNA-Proteína-Carácter



P3A: Extracción de ADN de saliva. Método de precipitación salina

DANAgene saliva kit (BioTed, cod. 603.4)

Equipos y materiales de laboratorio

1. Microtubos estériles tipo Eppendorf de 1,5 mL y gradillas
2. Tubos de centrifuga estériles de 15 o 50 mL y gradillas (opcional)
3. Baño de agua a 37°C
4. Vortex
5. Microcentrífuga
6. Rotores de centrifuga para tubos de 1,5 mL y 15 o 50 mL (opcional)
7. Juego de micropipetas (P1000, P200, P20, P10)
8. Puntas de pipeta con filtro.
9. Tiras de papel absorbente estéril.
10. Cronómetro
11. Equipo de electroforesis (Ver práctica de electroforesis)
 - Cubeta de electroforesis con plataforma y peines
 - Fuente de electroforesis
12. Transiluminador

Reactivos necesarios

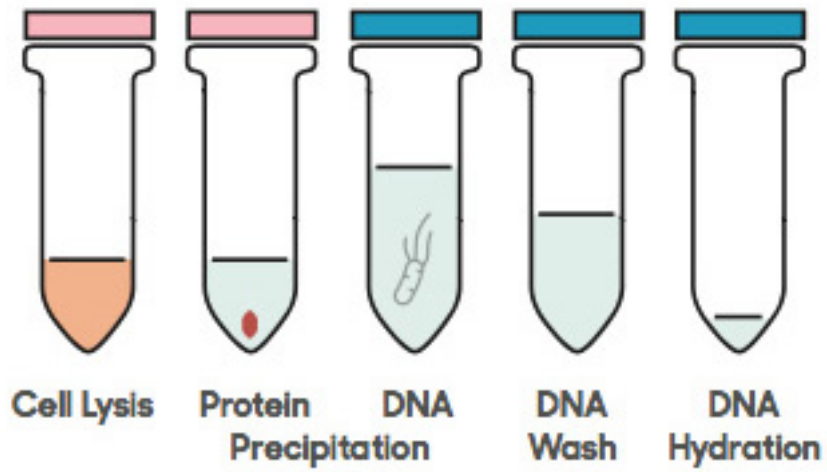
1. DANAgene Saliva Kit
 - Tampón de lisis (incubar a 37°C para disolver el posible precipitado)
 - Tampón precipitación de proteínas
 - Tampón de hidratación
 - Proteinasa K (20mg/mL)
 - RNasa (10mg/mL)
2. Isopropanol
3. Etanol 70%
4. Agarosa (Ver práctica de electroforesis)
5. Tampón de electroforesis (TAE)
6. Colorante de DNA tipo Dana Blue 0,1% (BioTed)
6. Marcador de peso molecular
7. Tampón de carga de DNA en pocillo de gel de agarosa
8. Hielo picado

Muestra

Saliva directa, aproximadamente **600 µL**

Actividade do PFPFP do Ensino Medio. Práctica 3

Pasos secuenciales en la extracción de ADN de saliva por el procedimiento de purificación por precipitación de proteínas con altas concentraciones de sales.



Protocolo (duración: 3 + 1 horas)

Recogida de muestra de saliva

1. Se debe lavar la boca y esperar 30 min antes de recoger **600 µL** de saliva en un tubo Eppendorf con la ayuda de una punta de pipeta truncada de 1 mL.

Ojo: La muestra de saliva se puede almacenar a 4°C hasta unas 2 horas antes de su procesamiento.

Lisis celular

2. Centrifugar **600 µL** de saliva durante **90 seg a 13-16.000 x g**. Eliminar el sobrenadante con una pipeta de 1 mL sin dañar el pellet visible de células.

3. Añadir en el siguiente orden **600 µL** de Tampón de lisis, **5 µL** de Proteinasa K y finalmente **5 µL** de RNasa. Resuspender mediante pipeta para disgregar el pellet de células.

4. Incubar a 37°C durante **30-60 min** para lisar las células. Aplicar vortex a las muestras cada **10-15 min** durante el periodo de incubación.

Precipitación de proteínas

5. Dejar enfriar las muestras **10 min a 4°C** (aconsejable en hielo picado).

6. Añadir **200 µL** de Tampón de precipitación de proteínas al lisado celular.

7. Vortex a máxima velocidad durante **20-30 seg**.

8. Centrifugar a **13-16.000 x g** durante **5 min**. y se debe apreciar un precipitado correspondiente a los fragmentos celulares.

Ojo: Si se observan partículas flotando, incubar 5 min en hielo y volver a centrifugar de nuevo.

Precipitación de DNA

9. Traspasar el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo Eppendorf nuevo que contiene **600 µL** de isopropanol.

10. Mezclar unas **50 veces** por inversión.

11. Centrifugar a **13-16.000 x g** durante **2 min**. Se debe observar un pellet blanco que corresponde al DNA.

12. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo brevemente con tiras de papel absorbente.

13. Añadir **600 µL** de etanol 70% para lavar el DNA.

14. Centrifugar a **13-16.000 x g** durante **1 min**. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante sin tocar el pellet de DNA.

Ojo: En este paso el pellet de DNA se despegará fácilmente de la pared de tubo por lo que el sobrenadante se debe eliminar con mucho cuidado. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las últimas gotas de etanol residual.

Actividade do PFP do Ensino Medio. Práctica 3

15. Invertir el tubo Eppendorf en un papel absorbente y dejar secar durante unos **5-10 min.**

Ojo: El tubo se puede dejar secar abierto en el interior de una campana de flujo laminar durante unos 5-10 min.

Hidratación de DNA

16. Añadir **250-500 µL** de agua estéril o Tampón de hidratación y vortex con los dedos durante unos **1-2 min.**

17. Incubar a **50°C** durante **1 h** con agitaciones con los dedos cada **10-15 min** para ayudar a la rehidratación del DNA.

Ojo: Se puede dejar hidratar durante toda la noche a temperatura ambiente.

18. Conservar a **2-5°C** (nevera) para su utilización en los próximos días para PCR o digestión. Para almacenajes más largos conservar a **-20** o **-80°C**.

Cuantificación de DNA

19. La cantidad de DNA genómico obtenida se puede cuantificar mediante espectrofotómetro, pico-nanodrop o por separación electroforética en geles de agarosa (Ver protocolo).

Observaciones

El ADN obtenido (genómico + mitocondrial) se puede utilizar para amplificación (PCR), digestiones (enzimas de restricción), separación (electroforesis), transferencia (blotting) e hibridación con sondas específicas.

Tiempo estimado de la práctica 3 horas + 1 hora

Revisión de material y reactivos 10 min.

Desarrollo del protocolo 2 h 50 min.

[Opcional] cuantificación del DNA vía:

Pico-nanodrop: 2 min.

Espectrofotómetro: 10 min.

Electroforesis: 60 min (Permite ver también la integridad del DNA).

Ojo: Requiere tener preparado algún material previamente.

P3B: Extracción de ADN de sangre. Método de columna de absorción DANAGENE spin blood DNA kit (BioTed, cod. 606.1)

Equipos y materiales de laboratorio

1. Microtubos estériles tipo Eppendorf de 1,5 mL y gradillas para tubos de 1,5 mL
2. Juego de micropipetas (P1000, P200, P50, P10)
3. Puntas de pipeta con filtro (P1000, P200, P50, P10)
4. Estufa o baño de agua a 70°C
5. Vortex
6. Microcentrífuga
7. Rotores de centrífuga para tubos de 1,5 mL
8. Cronómetro

Componentes de Blood DNA kit

- Tampones de lisis RBC
- Tampón de lisis de tejidos
- Tampón de lisis/unión
- Proteinasa K (liofilizado) y tampón de la proteinasa (PB)
- Tampón de desinhibición
- Tampón de lavado
- Tampón de elución
- Columnas de sílica retención DNA
- Tubos colectores

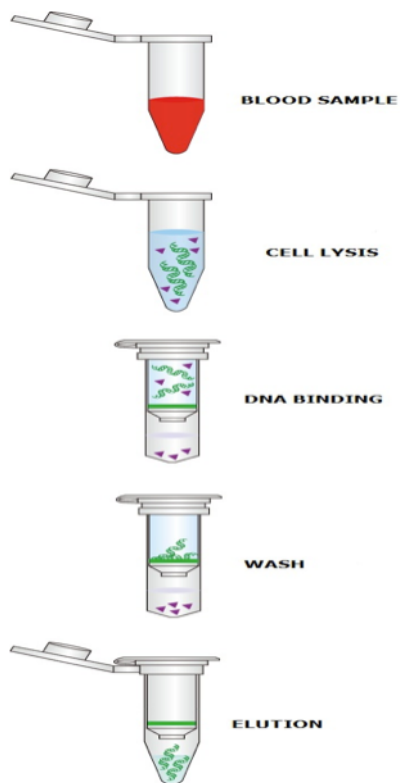
Reactivos necesarios

1. Etanol 96%
2. Isopropanol

Muestra

Sangre periférica, aproximadamente **200 µL**

Figura: Secuencia en la extracción y purificación de DNA a partir de sangre utilizando columnas de adsorción de sílica.



Preparaciones preliminares

- La **proteínasa K** en solución. Reconstituir el vial liofilizado añadiendo **1,3 mL** de tampón de proteinasa o Agua libre de nucleasas. Almacenar a -20°C y descongelar antes de su uso.
- Verificar que el **Tampón de lisis/unión** no tiene precipitados debido a baja T^{a} . Si es necesario, disolver los precipitados calentando la solución a 37°C
- Añadir **10 ml** de Etanol 100 % al **Tampón de Desinhibición**. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Añadir **40 ml** de Etanol 100 % al **Tampón de Lavado**. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.
- Preparar un **incubador o baño de agua a 70°C** .
- Pre-calentar el **Tampón de Elución a 70°C** .

Protocolo (duración 2 horas)

Recogida de muestra de sangre periférica

1. Extraer aprox. **300 µL de sangre total** y utilizar directamente.

Ojo: La sangre se puede extraer con anterioridad y conservar a 4°C. Para utilizar en el protocolo se debe llevar a temperatura ambiente (TA aprox. 20°C) y evitar que tenga coágulos o precipitados.

Lisis celular

2. Añadir en un tubo Eppendorf (1,5 mL) **25 µL** de Proteinasa K y **300 µL** de sangre y agitar con dedo índice.

Ojo: Si la muestra de sangre no es fresca o presenta coágulos se debe incubar la sangre con la proteinasa hasta 30 min.

3. Añadir **300 µL** de Tampón de lisis/unión, mezclar vigorosamente con vortex durante 15 seg.

4. Incubar a **70°C** durante **15 min.**

Ojo: Durante la incubación el lisado debe tomar un color amarronado.

Preparación de columnas y unión de DNA a membrana

5. Añadir al lisado (paso 4) **300 µL de etanol (96%)** y mezclar vigorosamente con vortex.

6. Montar una columna de sílica en un tubo colector por cada muestra a analizar sobre una gradilla.

7. Cargar la mitad de lisado (**315 µL**) en la columna y centrifuga a **10.000 rpm** durante **1 min.** Elimina el tubo colector.

8. Repite el punto 7 con la otra mitad del lisado.

9. Colocar la columna nuevamente en un tubo colector y añadir **500 µL** de Tampón de Desinhibición. Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min y eliminar el líquido.

Ojo: Centrifugar de nuevo a mayor velocidad (**15.000 rpm**) si toda la muestra no paso por la columna .

Lavados y secado de la membrana de sílica

- 10.** Añadir **500 µL** de Tampón de Lavado en el reservorio de la columna y centrifugar a **14.000 rpm** durante **1 min**. Descartar el filtrado y colocar la columna de nuevo en el tubo colector.
- 11.** Añadir de nuevo **500 µL** de Tampón de lavado en la columna y centrifugar a **14.000 rpm** durante **1 min**. Descartar el filtrado y colocar la columna de nuevo en el tubo colector.
- 12.** Centrifugar de nuevo la columna a máxima velocidad (14.000 rpm) durante **2 min** para eliminar el etanol residual

Elución del DNA

- 13.** Transferir la columna a un microtubo Eppendorf de 1,5 mL y añadir sobre la membrana de la columna **100 µL** de **Tampón de Elución** precalentado a 70°C. Incubar 1 min a TA.
- 14.** Centrifugar a máxima velocidad (14.000 rpm) durante **1 min** para recuperar el DNA genómico puro.

Ojo: Para recuperar la mayor parte del DNA de la columna (incrementar el rendimiento) u obtener una solución con mayor concentración de DNA es posible aplicar diferentes modificaciones en el protocolo:

- Realizar una segunda elución con 100 µL de tampón de elución.
- Realizar una segunda elución con los 100 µL de elución inicial.
- Realizar una primera elución con 50 µL de tampón elución, incubar 3 min y centrifugar. Realizar una segunda elución con los 50 µL de tampón restantes

Cuantificación de DNA

La cantidad de DNA genómico obtenida se puede cuantificar mediante espectrofotómetro, pico-nanodrop o por separación electroforética en geles de agarosa utilizando un marcador de peso molecular que permita la cuantificación como el ladder Lambda-Hind III (Ver protocolo de electroforesis).

Observaciones

El ADN obtenido (genómico + mitocondrial) se puede utilizar para amplificación (PCR), digestiones (enzimas de restricción), separación (electroforesis), transferencia (blotting) e hibridación con sondas específicas.

Tiempo estimado de la práctica 1 hora + 1 hora: 2 horas

Revisión de práctica, material y reactivos: 30 min.

Extracción de la muestra de sangre para 8 grupos: 30 min.

Protocolo de extracción de DNA de sangre: 60 min.