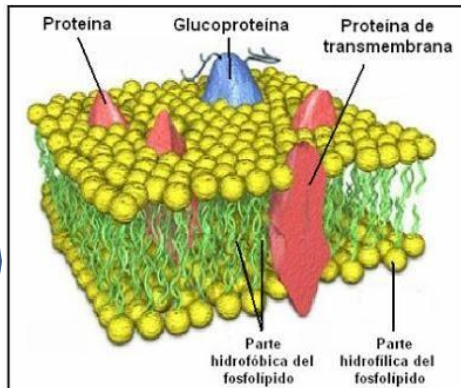
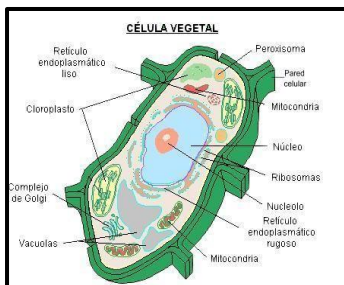
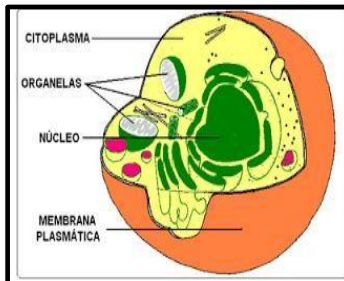
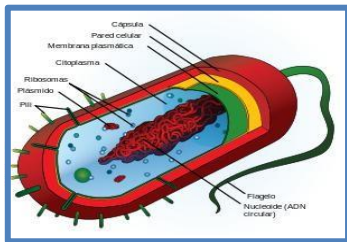


UD3: EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS



EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos se encuentran confinados en el interior de las células, en el interior del **núcleo**, bien en el **seno del citoplasma** o bien en **orgánulos celulares** como mitocondrias y cloroplastos.



Las membranas celulares son las estructuras que limitan a la célula y además le permiten tener relación con el medio exterior.

Químicamente están constituidas por una bicapa lipídica en cuyo seno se encuentra dispersa una gran variedad de proteínas.

La pared celular, peculiaridad común a **bacterias**, **levaduras**, **hongos** y **células vegetales** es una capa que recubre la membrana celular y proporciona rigidez y protección a las células. **Químicamente**, su composición es variable según el organismo del que se trate.

Membranas y paredes constituyen una verdadera barrera que se deberá vencer si queremos tener acceso a los ácidos nucleicos.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

EXTRACCIÓN



Con la extracción se consigue hacer accesibles los ácidos nucleicos a los reactivos y enzimas que se emplean en las diversas técnicas.

PURIFICACIÓN



Con la purificación se eliminan las sustancias y elementos que puedan interferir.

La obtención de **ácidos nucleicos purificados** a partir de una muestra biológica se suele llevar a cabo mediante un único *protocolo técnico continuado*.



1. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA
2. EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS
3. PURIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

- Los ac. nucleicos pueden obtenerse de prácticamente cualquier muestra biológica.
- Debido a la diversidad y variabilidad del posible material de partida (sangre, tejidos...), en muchas ocasiones se requiere un *pretratamiento específico de la muestra biológica* concreta, que permite obtener suspensiones celulares sobre las que se realizará la extracción y purificación de ácidos nucleicos.

- ✓ Sangre
- ✓ Tejidos blandos
- ✓ Semen
- ✓ Saliva y células epiteliales
- ✓ Pelos
- ✓ Uñas
- ✓ Huesos y dientes
- ✓ Orina
- ✓ Otras «muestras límite»: sudor, manchas, objetos...



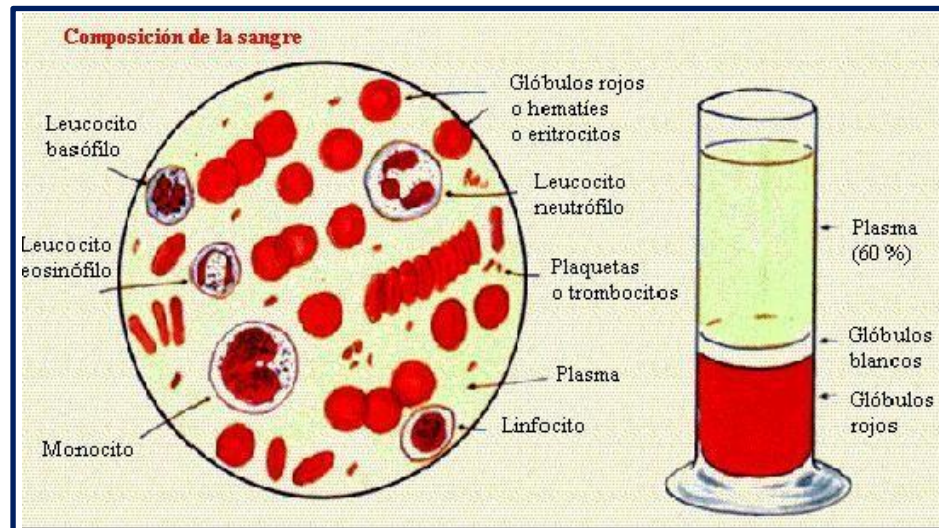
Las suspensiones celulares están formadas por células libres y agregados celulares que flotan dispersos en el seno de un medio líquido.

PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

SANGRE

La sangre es una de las muestras biológicas más habituales para estudiar los ácidos nucleicos de un individuo, purificándolos a partir de uno de sus componentes celulares, los **leucocitos**. Muchos de los componentes sanguíneos interfieren en las técnicas de biología molecular.

Ejemplo: **grupo -hemo** de la hemoglobina es un potente inhibidor de la PCR, por lo que un objetivo común en los distintos pretratamientos es la eliminación de la hemoglobina por medio de la lisis de los hematíes.

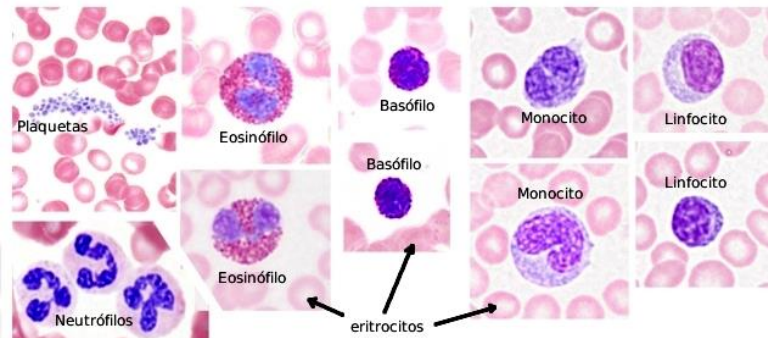
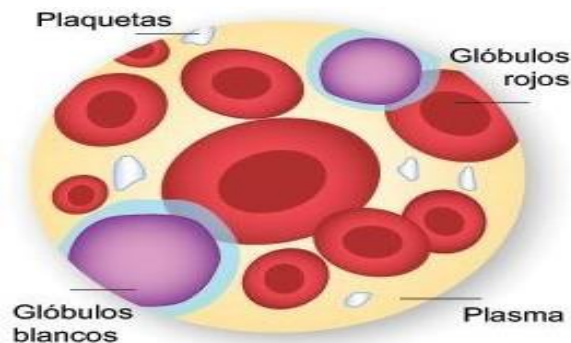


PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

SANGRE

La sangre es un tejido formado por:

- Un componente líquido → **plasma**.
- Un componente celular constituido por:
 - **Hematíes**: células sin núcleo ni mitocondrias cuyo interior está ocupado por la hemoglobina (proteína que contiene hierro). Su función principal es el transporte de los gases respiratorios.
 - **Leucocitos**: *células nucleadas* de mayor tamaño que los hematíes. Intervienen en el proceso de defensa del organismo. Hay diferentes tipos:
 - Polimorfonucleares: **neutrófilos, eosinófilos y basófilos**,
 - Mononucleares: **linfocitos y monocitos**.
 - **Plaquetas**: fragmentos celulares sin núcleo. Intervienen en la coagulación sanguínea.



PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

SANGRE

El pretratamiento más habitual en muestras de sangre consiste en:

- **LISIS DE LOS HEMATÍES:** Consiste en romper los hematíes con una solución o tampón de lisis en la proporción 1:3 (es decir, un volumen de sangre por tres volúmenes de lisis).
Actualmente hay muchas soluciones de lisis comerciales, la mayoría de ellas basadas en fenómenos osmóticos y/o detergentes suaves).
- **CENTRIFUGADO DE LA MUESTRA:** una vez producida la lisis de los hematíes, se centrifuga la muestra y se obtiene un sedimento o pellet y un sobrenadante.
- **ELIMINACIÓN DEL SOBRENADANTE:** Consiste en eliminar la fracción líquida sobrenadante con una pipeta Pasteur. Con esto se eliminarán los componentes del plasma sanguíneo y la hemoglobina, liberada por la rotura de hematíes.
- **CONSERVACIÓN DEL SEDIMENTO:** en el sedimento habrán quedado los leucocitos.

Este pretratamiento también es válido para muestras de médula ósea.

PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

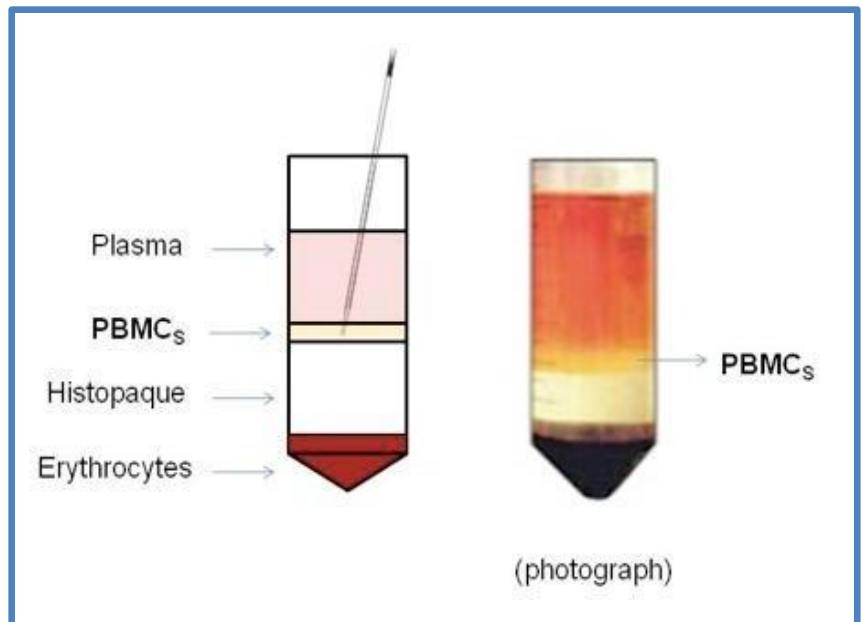
SANGRE: OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA

La sangre se puede utilizar también como material de partida para detectar, aislar y estudiar ácidos nucleicos de algunos retrovirus que infectan linfocitos como el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH).

En estos casos interesa aislar las células mononucleadas de sangre periférica o PBMC (de la terminología inglesa Peripheral blood mononuclear cell), es decir, monocitos y linfocitos, antes de extraer los ácidos nucleicos.

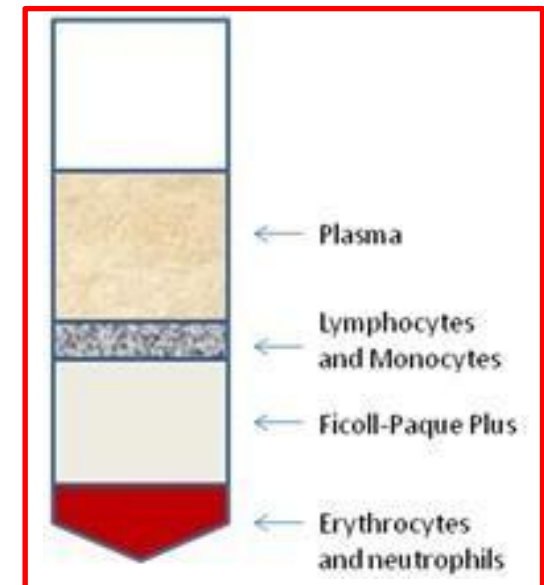
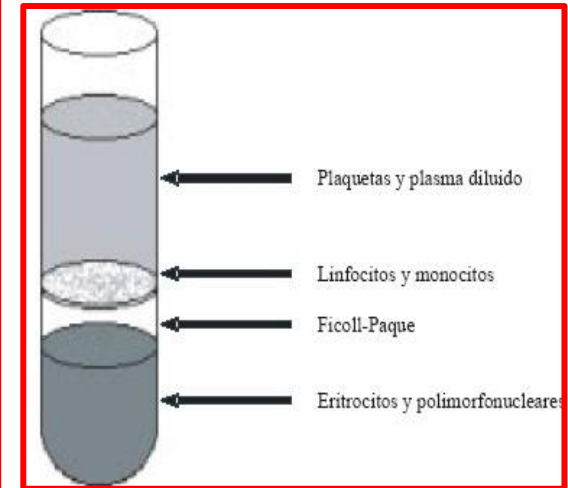


CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD CON UN MEDIO DE SEPARACIÓN



CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD

1. Se coloca en un tubo el **medio de separación** y encima la **sangre**.
2. Se centrifuga (20-30 minutos a 400-800 rpm, según el reactivo usado). Durante la centrifugación:
 - La **polisucrosa** ☐ causa agregación de los hematíes facilitando su rápida sedimentación.
 - Los **granulocitos**, cuya densidad $>$ que el medio de separación, sedimentan también en el fondo del tubo.
 - Las **células mononucleadas**, (densidad $<$ que el medio de separación) permanecen en la interfase entre este y el plasma.
3. Se elimina el plasma sobrenadante → la capa de células mononucleadas se aspira cuidadosamente con una pipeta pasteur → se transfiere a un tubo limpio → se lava con tampón o solución salina para eliminar restos de plasma y plaquetas.
4. Apartir de las células lavadas se puede continuar con el proceso de extracción de ácidos nucleicos.



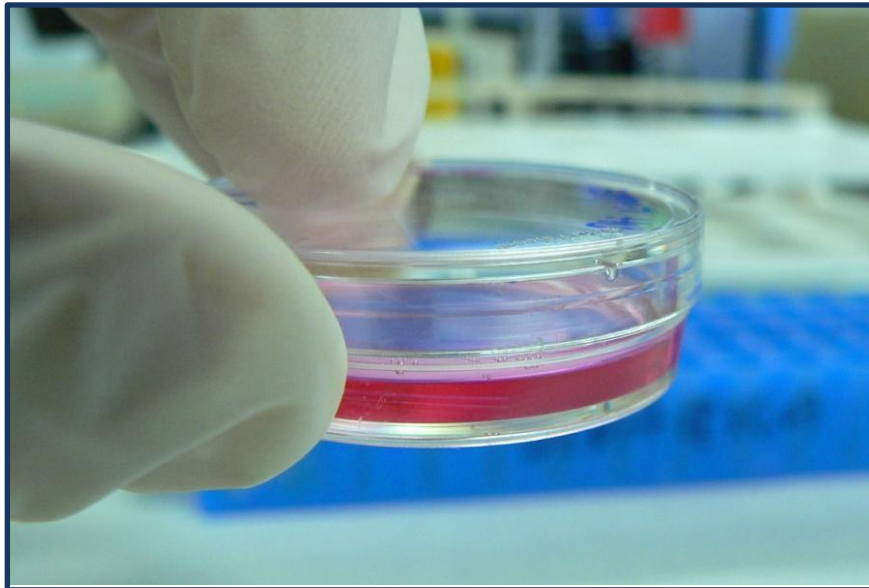
PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

CULTIVOS CELULARES

Los **cultivos celulares** son métodos de obtención de células en vitro mediante siembras controladas en medios adecuados.

Son un buen material de partida para realizar estudios genómicos y de expresión génica en determinadas condiciones y bajo determinados estímulos.

El pretratamiento de estas muestras consiste en la recolección de las células antes de seguir con la extracción de ácidos nucleicos.



PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

CULTIVOS CELULARES

CULTIVOS CELULARES EN SUSPENSIÓN



Si las células crecen en suspensión en el medio de cultivo se procede de la siguiente manera:

- Recolectar en un tubo
- Eliminar el medio de cultivo mediante centrifugación.
- Lavar las células con tampón o suero fisiológico antes de iniciar la extracción y purificación de ADN y/o ARN.



PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

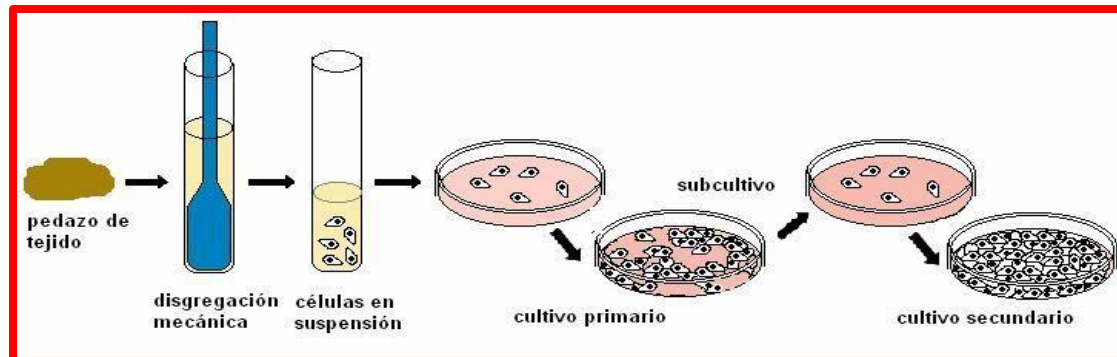
CULTIVOS CELULARES

CULTIVOS EN MONOCAPA

Las células crecen en monocapa adherida a la pared del frasco de cultivo

➤ **Dos posibilidades:**

- Utilizar el propio frasco para continuar el proceso de extracción:
 - Retirar del frasco el medio de cultivo
 - Lavar la monocapa con tampón o solución salina
 - Iniciar in situ, en el propio frasco, el proceso de extracción
- Pasar la monocapa a un tubo:
 - Despegar la monocapa de células de la pared del frasco (raspador o enzimas)
 - Recolectar las células en un tubo.
 - Lavar las células antes de seguir con la extracción.



PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

TEJIDOS ANIMALES O VEGETALES FRESCOS

HOMOGENEIZACIÓN: es el tratamiento mecánico o químico al que se somete un tejido para liberar las células que lo integran.



HOMOGENEIZACIÓN MECÁNICA



Homogenización
mecánica
automatizada



Homogenización
mecánica
manual con
mortero



HOMOGENEIZACIÓN QUÍMICA

TEJIDOS ANIMALES O VEGETALES FRESCOS

HOMOGENEIZACIÓN MECÁNICA

Consiste en someter el tejido a una acción trituradora o abrasiva para desmenuzarlo.

Según la manera de proceder puede ser **automatizada** o **manual**.

Homogenización mecánica automatizada → Se consigue utilizando varias máquinas o elementos mecánicos.

- El tejido se corta en pequeños fragmentos
- Luego se homogeneiza por la acción mecánica que proporcionan instrumentos como los trituradores mecánicos, por la adición de agentes abrasivos y agitación, por esferas de vidrio o cerámica que colisionan violentamente contra la muestra mediante un movimiento de oscilación.
- Una vez homogeneizado el tejido, se transfiere a un tubo limpio para iniciar la extracción.
- Hay que tener en cuenta que el proceso de rotura mecánica del tejido puede liberar proteasas y enzimas responsables de la degradación de los componentes celulares
- Por ello, conviene realizar estos procesos en frío y de forma rápida, o bien añadir, inhibidores enzimáticos.

TEJIDOS ANIMALES O VEGETALES FRESCOS

HOMOGENEIZACIÓN MECÁNICA

Homogenización mecánica **manual con mortero**

Es un método que minimiza el problema de la degradación.

Se procede de la siguiente manera:

- Se colocan los fragmentos de tejido en un mortero
- Se cubren con nitrógeno líquido.
- La baja temperatura del nitrógeno líquido permite la congelación rápida del tejido y evita la formación de cristales en el interior de las células.
- A continuación, con la mano del mortero se pulverizan los fragmentos congelados hasta conseguir un polvo fino
- Se deja evaporar el nitrógeno líquido.
- El polvo obtenido se transfiere a un tubo para iniciar el proceso de extracción.

En algunos protocolos, la homogeneización mecánica se realiza directamente en un tampón de lisis, simultaneándola con el primer paso del proceso de extracción.

TEJIDOS ANIMALES O VEGETALES FRESCOS

HOMOGENEIZACIÓN QUÍMICA:

- Consiste en someter al tejido a la acción de proteasas y detergentes que degradan los componentes tisulares, disgregando las células.
- Se suele realizar para muestras pequeñas y cortes de tejido en congelación.

- Se añade a la muestra la mezcla de incubación que contienen las proteasas y detergentes para la digestión del tejido.
- Se incuba la muestra a 37-56°C durante 12-24 horas
- Pasado el tiempo de incubación, se retira la muestra y se sigue con el proceso de extracción.
- Si en la mezcla de incubación se añaden enzimas y detergentes que desestabilizan y rompen las membranas celulares, se puede también simultanear la homogeneización del tejido con el primer paso del proceso de extracción.

PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

TEJIDOS FIJADOS EN FORMOL E INCLUIDOS EN PARAFINA

- El tejido fijado en formol e incluido en parafina o tejidos FFPE es un material muy útil para la realización de estudios retrospectivos, aunque **la calidad de los ácidos nucleicos recuperados suele ser peor que la de aquellos purificados a partir de tejidos frescos.**
- Esta **pérdida de calidad** se debe a que durante el proceso de fijación:
 - **El ADN se fragmenta**
 - El ARN puede ser **parcialmente degradado**, según el tiempo que transcurra entre la obtención y la fijación de la muestra.

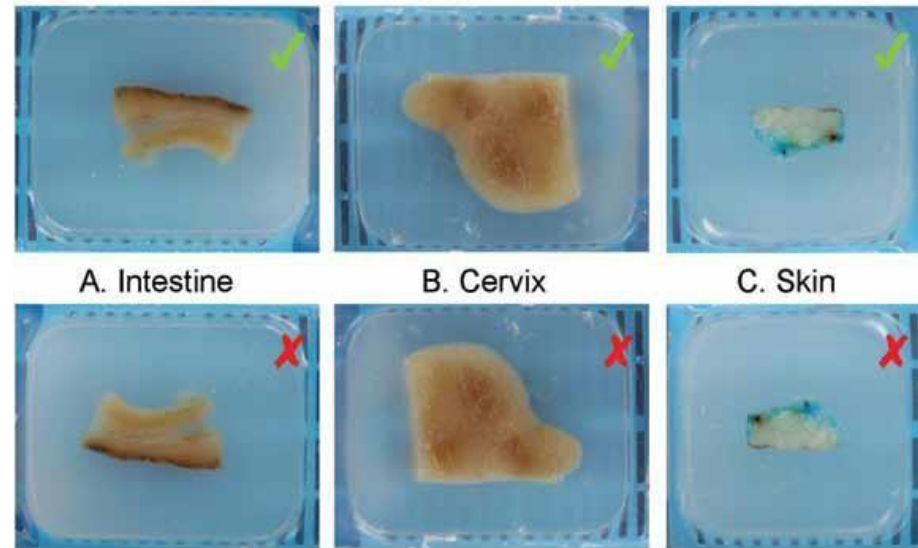


PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

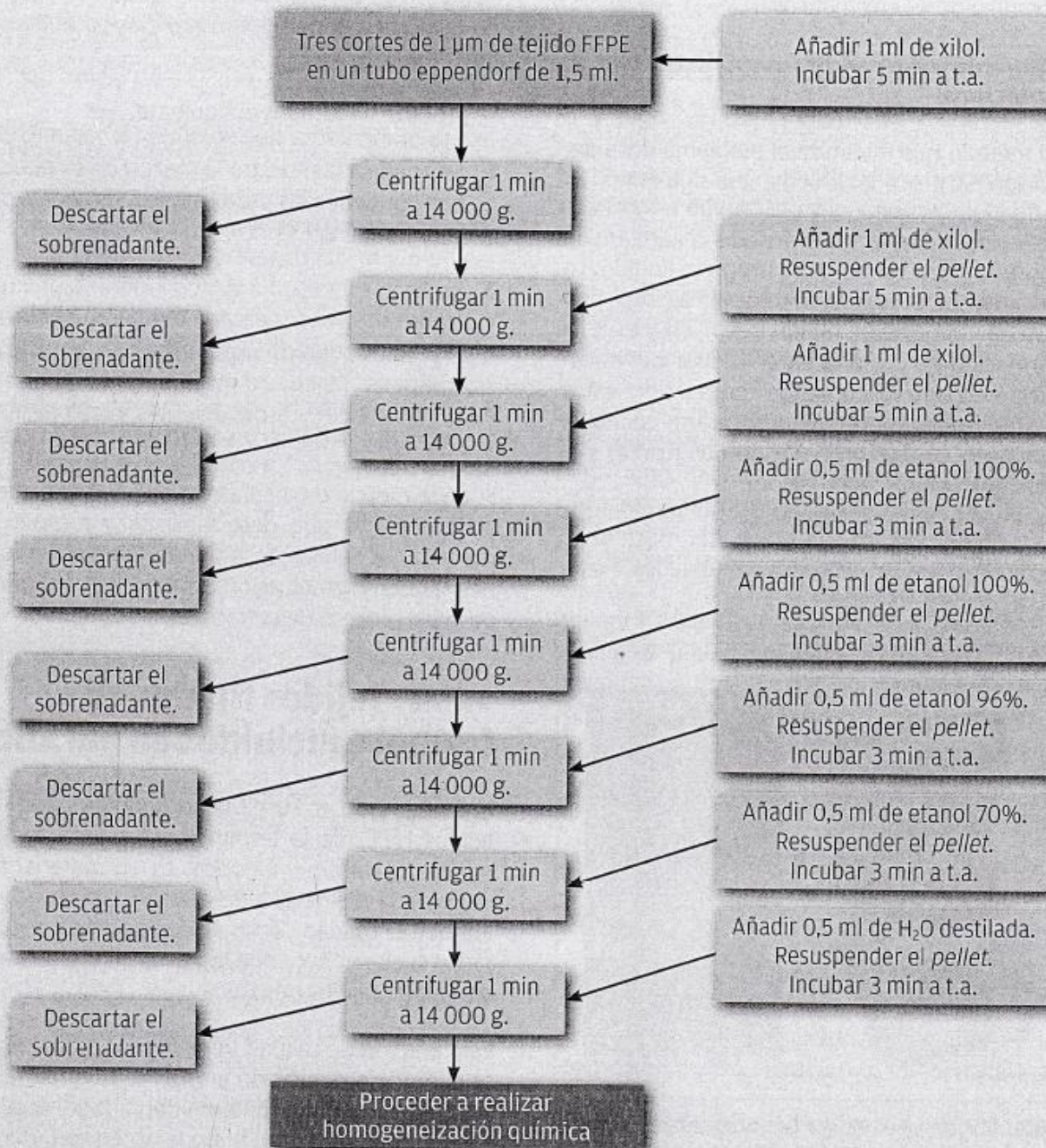
TEJIDOS FIJADOS EN FORMOL E INCLUIDOS EN PARAFINA

La **desparafinización** consiste en la eliminación de la parafina en los tejidos FFPE.

- Con un microtomo, se obtienen cortes finos (5-10 μm) del tejido.
- Se transfieren, aproximadamente 5-10 mg de cortes, a un tubo eppendorf.
- Se incuba secuencialmente con:
 - **xilol** u otro agente desparafinante
 - **etanoles** a concentración decreciente
 - **agua destilada**.
- Finalmente, el tejido desparafinado y rehidratado se somete a una homogeneización química similar a la descrita para los tejidos frescos.



Documento 3.3. Protocolo de pretratamiento de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina



PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

CULTIVOS DE BACTERIAS Y LEVADURAS

El pretratamiento consiste en situar las bacterias y levaduras en tampón de suspensión.

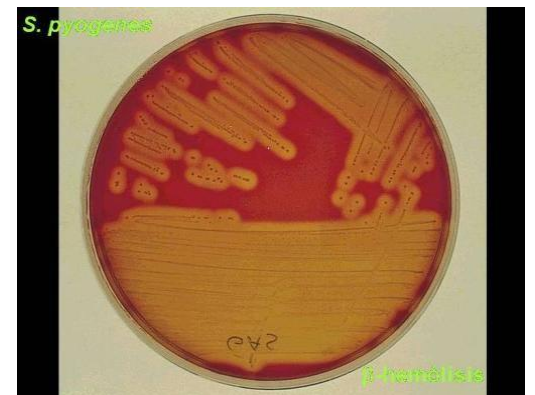
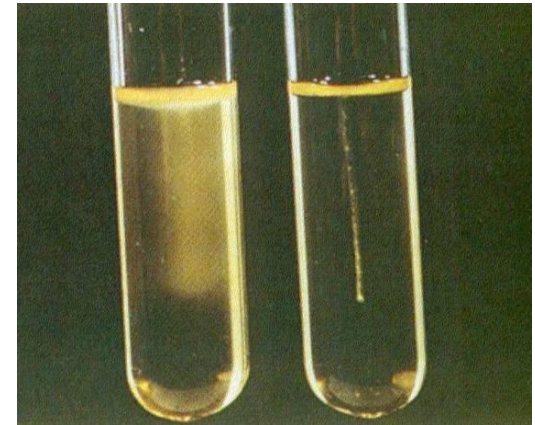
Según el medio en el que se encuentra el material de partida, se pueden dar dos situaciones:

➤ **Cultivo en medio líquido:**

- Se centrifuga el tubo para eliminar el medio de cultivo sobrenadante.
- El sedimento se resuspende en el tampón de suspensión.

➤ **Colonias aisladas en un medio sólido (placa de agar)**

- Se recoge una colonia de la superficie de la placa con un asa de siembra estéril
- Se resuspende la colonia en el tampón de suspensión.



PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

CÉLULAS DE LA MUCOSA ORAL

El pretratamiento de las muestras de células de la mucosa oral, antes de iniciar la extracción, consiste en **centrifugar la suspensión celular y eliminar el sobrenadante**.

En el mercado se encuentran soluciones y kits comerciales para la recogida y conservación de este tipo de células.

Existen diversos sistemas de obtención:

- ✓ Mediante raspado de la mucosa oral con torunda o cepillo. En este caso la muestra tomada directamente del raspado se sumerge en una solución conservante para que las células se desprendan.
- ✓ Mediante enjuague con una solución conservante.
- ✓ Recolectando directamente saliva.



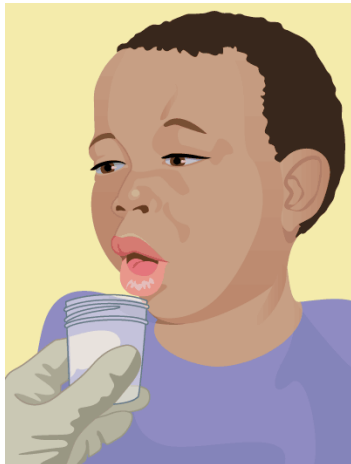
PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

ESPUTO

El esputo puede usarse como material de partida para detectar o confirmar la presencia de microorganismos patógenos causantes de infecciones respiratorias.

El pretratamiento consiste en la **fluidificación con un agente mucolítico del tipo N-acetil-L-cisteína en una disolución de citrato sódico**.

Si el microorganismo que se quiere detectar es una micobacteria se puede añadir también hidróxido sódico para descontaminar la muestra.



SOLUCIÓN MUCOLÍTICA Y DESCONTAMINANTE PARA ESPUTOS

- **N-acetil-L-cisteína: 0,375 gr**
- **Citrato sódico x 2 H₂O: 14,5 gr**
- **Hidróxido sódico: 20,0 gr**
- **Agua destilada: hasta 1000 ml.**

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de ac. nucleicos implica dos procesos:

- La lisis celular para liberar los ácidos nucleicos
- La inactivación de nucleasas celulares (ADNasas, ARNasas) para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

- Ambos procesos, lisis celular e inactivación de las nucleasas, se consiguen mediante la incubación de la suspensión celular con una solución de lisis.
- En células con pared celular – bacterias, levaduras, hongos y células vegetales – será necesario aplicar algunas variaciones del tratamiento para vencer la dificultad de lisis que presentan.

El proceso de extracción consiste en la *obtención de un lisado celular de aspecto homogéneo en el que los ácidos nucleicos se encuentran libres de las estructuras celulares en las que se mantenían aislados.*

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

LA SOLUCIÓN DE LISIS

La composición de la solución de lisis depende del tipo de célula que se va a lisis y puede incluir *detergentes*, *EDTA*, *proteasas* y *agentes caotrópicos*.

DETERGENTES:

- Son los componentes principales de la solución de lisis.
- Su función es *desestructurar la bicapa lipídica de las membranas y desnaturalizar las proteínas que se insertan en ella*.
- Así efectúan la lisis celular y la liberación del contenido citoplasmático y nuclear al medio de reacción.
- El **dodecil-sulfato-sódico** es el detergente más utilizado en las soluciones de lisis celulares, sobre todo para muestras humanas y de animales, en combinación con EDTA.



DODECIL-SULFATO-SÓDICO

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

LA SOLUCIÓN DELISIS



EDTA:

- Es un quelante de cationes (Ca y Mg).
- El Mg es un cofactor de la ADNasas, necesario para su funcionamiento.
- Al atrapar los cationes de magnesio que hay en el medio de reacción, se inhibe la actividad de las ADNasas.

Quelante: secuestrador o antagonista de metales pesados.

La inactivación de nucleasas es muy importante para obtener una buena cantidad de ácidos nucleicos no fragmentados.

Esto es debido a que:

- La vida media del ARNm en condiciones fisiológicas es muy corta, ya que es rápidamente degradado por ARNasas citoplasmáticas que evitan que la proteína que codifica se sintetice permanentemente.
- Con la lisis celular, se libera el ADN de las estructuras que lo contienen y lo ponen en contacto con ADNasas citoplasmáticas.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

LA SOLUCIÓN DE LISIS

PROTEASAS:

- A la solución de lisis se le pueden añadir proteinasas – como la proteína K – que **digieren las proteínas, tanto las de la membrana celular como las citoplasmáticas** facilitando la rotura y disolución de las membranas y eliminando las nucleasas.
- Su empleo es especialmente útil en muestras de tejidos frescos

AGENTES CAOTRÓPICOS:

- Es otra solución eficaz para inactivar las nucleasas, al añadir agentes caotrópicos que desnaturalizan las macromoléculas se impide que realicen su actividad.

SOLUCIÓN DE LISIS

Solución de lisis para leucocitos y células animales:

- Dodecil-sulfato-sódico: 2%
- EDTA: 25 mM
- PH: 8,0

Solución de lisis con proteínasa K:

- Tris-HCl: 10 mM, Ph8
- NaCl: 400 mM
- EDTA: 2 Mm
- SDS: 2%
- Proteínasa K: 0,5 mg/ml

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

TRATAMIENTOS EN CÉLULAS CON PARED CELULAR

La presencia de pared celular en algunas bacterias, levaduras, hongos y células vegetales dificulta la lisis celular. Para degradar esta pared son necesarios otros tratamientos como:

- *Tratamientos enzimáticos*
- *Tratamientos mecánicos*
- *Bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB)*

TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

Se emplean enzimas que digieren los componentes de la pared

- **Lisozima** o **lisosastin** degrada la pared de **bacterias G+**
- **Litícase** o **zimolasa**, pared **c. vegetales**, **levaduras** y **hongos**

Este tratamiento enzimático se puede poner en práctica antes de usar la solución de lisis o bien simultáneamente, incorporando la enzima a la solución de lisis celular.

TRATAMIENTO MECÁNICO

En **bacterias**, una alternativa al tratamiento enzimático específico es la ruptura de la pared por medios mecánicos, como: **ebullición en agua destilada o tampón, ciclos de congelación-descongelación...**

TRATAMIENTO CON CTAB

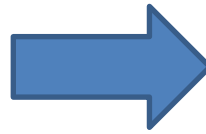
Otra característica común de las células con pared celular es su alto contenido en polisacáridos que interfieren en muchos procesos enzimáticos utilizados. Por esta razón es frecuente sustituir el SDS por otro detergente iónico, el CTAB que elimina estos compuestos

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

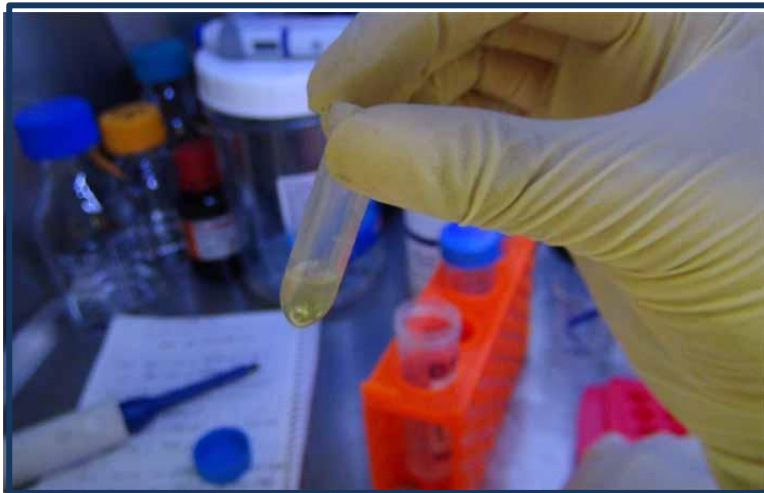
VERIFICACIÓN DEL RESULTADO DE LA LISIS

Finalizada la fase de extracción, deberemos comprobar que se haya conseguido una solución homogénea que indique que el proceso de lisis celular ha sido eficiente.

Si la lisis celular no es homogénea → se observa presencia de grumos, cuerpos celulares...



Transcurrido el tiempo de incubación estándar del protocolo que se esté realizando, se deberá añadir más solución de lisis y reincubar la muestra, incluso a temperaturas elevadas (37- 65°C).



EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

CONSIDERACIONES EN LA EXTRACCIÓN DE ADN

Cuando se quiere purificar exclusivamente ADN, porque el ARN puede interferir en los estudios posteriores, una vez finalizada la lisis celular y antes de iniciar la purificación, *es necesario eliminar el ARN presente en el lisado*.



- Se añade al medio de reacción ARNasa
- Se incuba a 37°C durante 15-45 minutos

Este paso no suele ser necesario en muestras de sangre periférica o médula ósea porque la contaminación por ARN es mínima, pero sí es aconsejable en otro tipo de muestras como saliva, tejidos y raspados celulares.

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Una vez finalizada la lisis → los ácidos nucleicos se encuentran inmersos en un extracto celular complejo junto con **proteínas**, **sales minerales**, **componentes celulares solubles** y los propios **reactivos** empleados en la extracción.

El **proceso de purificación** consiste en separar los ácidos nucleicos de los demás componentes del lisado.

TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN



- Purificación con solventes orgánicos
- Precipitación con sales
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de adsorción
- Purificación mediante esferas magnéticas
- La ultrafiltración

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PURIFICACIÓN CON SOLVENTES ORGÁNICOS



Se basa en la distinta solubilidad de los compuestos que integran el lisado celular en solventes orgánicos.



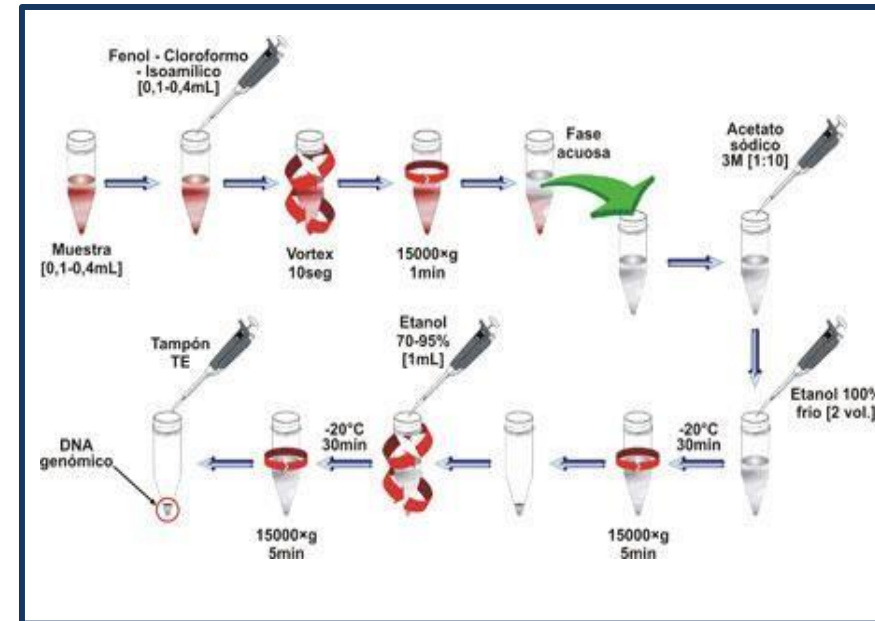
PROCEDIMIENTO:

- Eliminación de compuestos solubles en solventes orgánicos.
- Precipitación del ADN.
- Lavado del ADN.
- Resuspensión del ADN.

* PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PURIFICACIÓN CON SOLVENTES ORGÁNICOS

- Añadir un volumen igual al de la muestra de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y agitar con vórtex.
- Centrifugar a temperatura ambiente y transferir la parte acuosa (que contiene el ácido nucleico) a otro tubo
- Añadir **acetato sódico** para facilitar la precipitación con etanol
- Después añadir etanol al 100% frío.
- Dejar precipitar a -20°C durante 30 min
- Centrifugar y eliminar el sobrenadante.
- Lavar con etanol al 70%, para re-precipitar
- Centrifugar y eliminar el sobrenadante de nuevo.
- Resuspender en tampón TE.



TAMPÓN TE (Tris-Edta) RESUSPENDER ADN

- **Tris HCl:** 10 mM, PH:8
- **EDTA:** 1 mM

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PRECIPITACIÓN CON SALES(SALTING-OUT)

- La precipitación con sales se basa en la precipitación de proteínas en presencia de altas concentraciones salinas.
- Las elevadas concentraciones salinas generan medios con elevada fuerza iónica.
- Esto determina un incremento en las interacciones hidrofóbicas entre proteínas, disminuyendo su solubilidad en medio acuoso y provocando su precipitación.



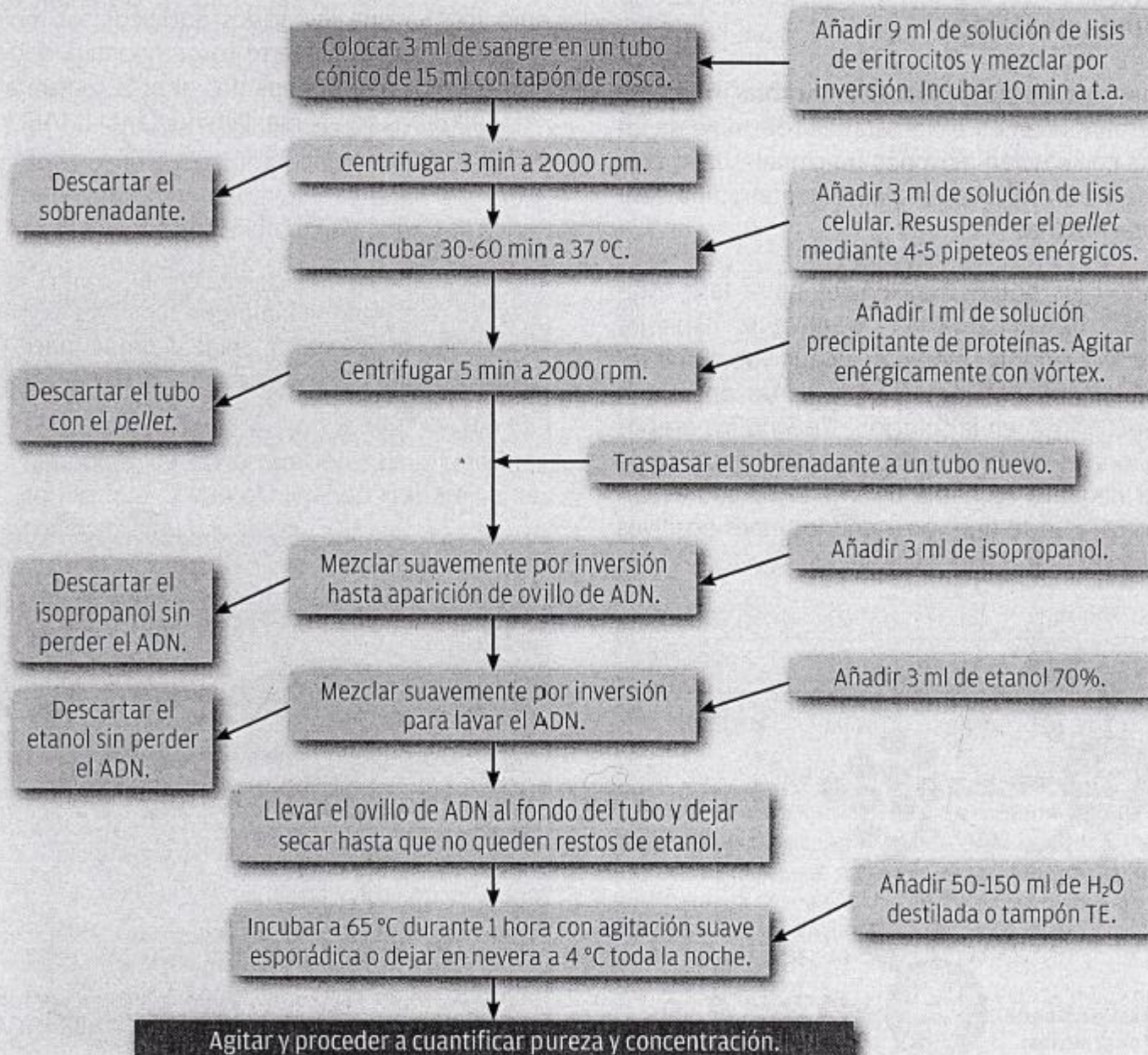
PROCEDIMIENTO:

- Precipitación de proteínas
- Precipitación de ADN
- Lavado y resuspensión del ADN



Documento 3.11. Protocolo de precipitación con sales

Purificación de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica anticoagulada con EDTA



PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PRECIPITACIÓN CON SALES (SALTING-OUT)

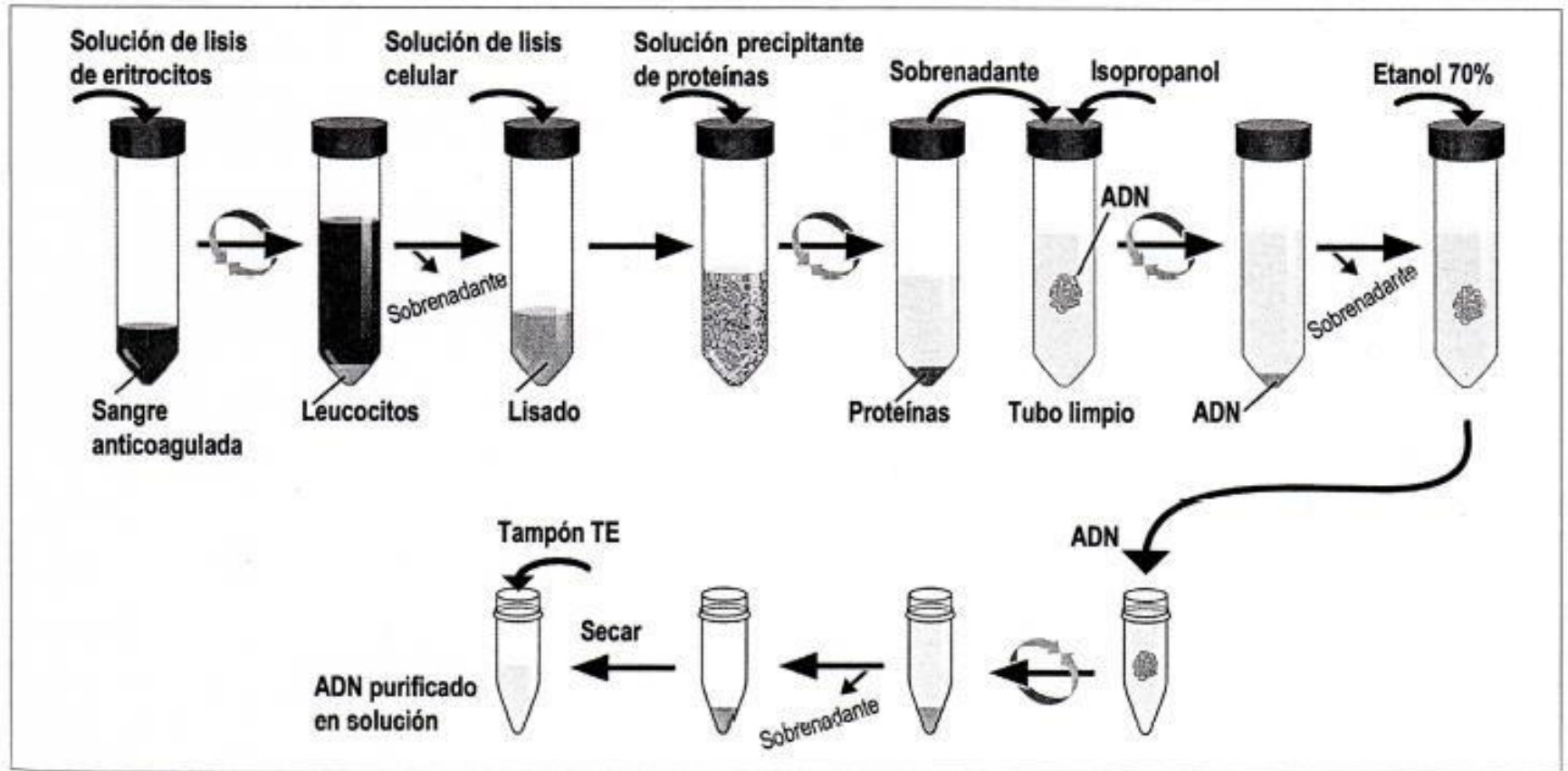


Fig. 3.9. Esquema de la purificación de ADN genómico por el método de precipitación con sales.

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PRECIPITACIÓN CON SALES (SALTING-OUT)

PRECIPITACIÓN CON SALES (SALTING-OUT)

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

- Se añade al lisado un volumen igual de una solución salina concentrada, que actúa como solución precipitante de proteínas y se agita vigorosamente con vórtex durante 20-30 segundos.
- A continuación, se centrifuga la mezcla, con lo que las proteínas sedimentan en el fondo del tubo como un pellet de color pardo
- En el sobrenadante quedan los ácidos nucleicos, sales y componentes hidrosolubles del lisado.

PRECIPITACIÓN DEL ADN

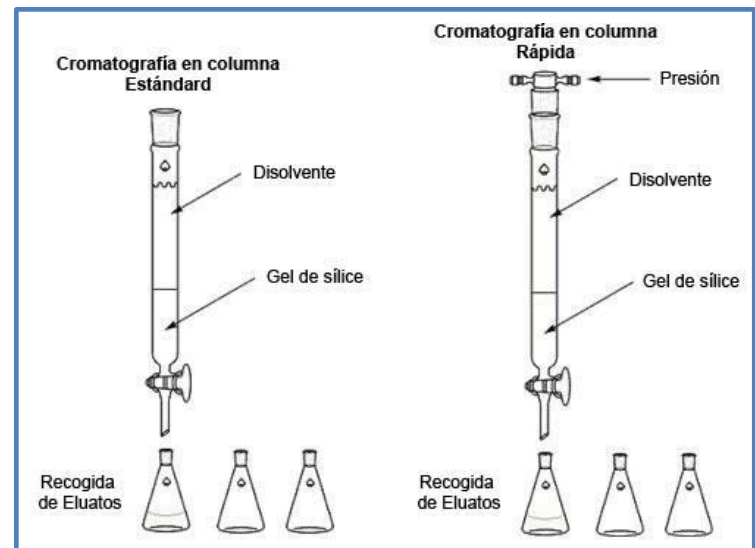
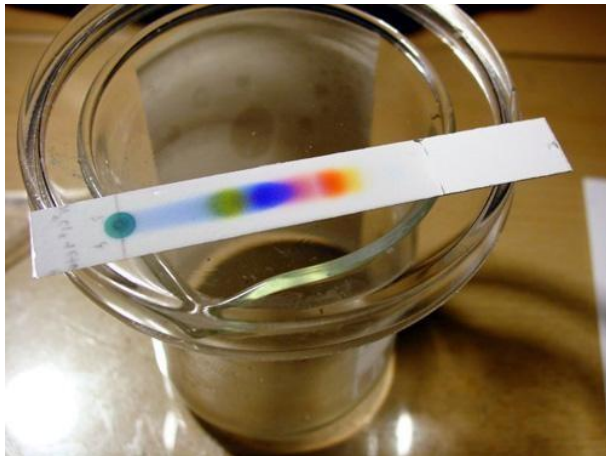
- El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio
- Se añade un volumen igual de isopropanolol y se mezclan por inversión suave del tubo varias veces.
- El ADN precipita en forma de maraña de hebras blanquecinas, que se sedimentan mediante centrifugación.

LAVADO Y RESUSPENSIÓN DEL ADN

- Se elimina el sobrenadante y el ADN se lava con etanol 70-95° y se resuspende en agua destilada o tampón TE como el método anterior.

CROMATOGRAFIA

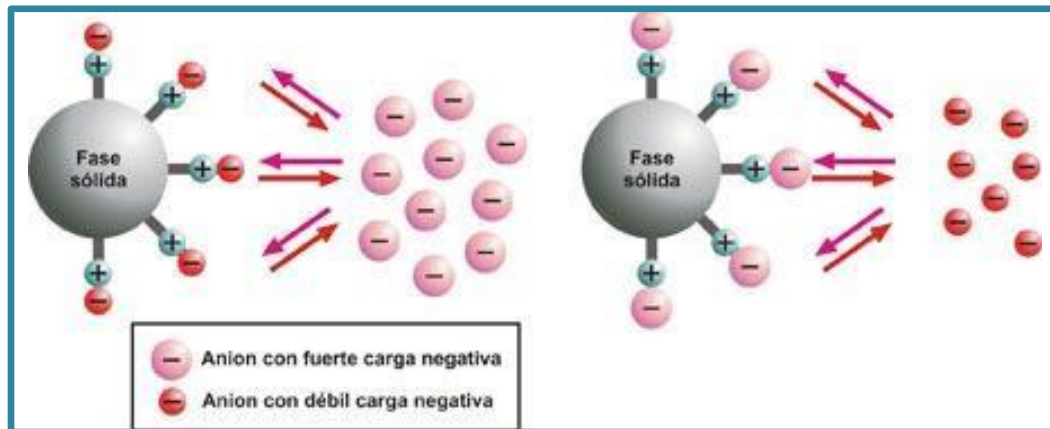
- **Conjunto de técnicas que tienen como finalidad la separación de mezclas basándose en la diferente capacidad de interacción de cada componente en otra sustancia.**
- De forma general, consiste en pasar una fase móvil (una muestra constituida por una mezcla que contiene el compuesto deseado en el disolvente) a través de una fase estacionaria fija sólida.
- La fase estacionaria retrasa el paso de los componentes de la muestra, de forma que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo.
- Las diversas técnicas para la separación de mezclas complejas se fundamentan en la diversidad de afinidades de las sustancias por un medio móvil gas o líquido y un medio absorbente estacionario (papel, gelatina, alúmina o sílice) a través del cual circulan.



PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO

- Se basa en la unión electrostática reversible de iones en solución a grupos funcionales cargados que están unidos covalentemente a una fase estacionaria.
- Cuando los grupos funcionales de la fase estacionaria tienen carga **positiva**, se habla de intercambiadores aniónicos, ya que se van a unir reversiblemente los **iones negativos** (aniones) que se encuentren en la solución.
- Cuando los grupos funcionales de la fase estacionaria tienen carga **negativa** se habla de intercambiadores catiónicos, puesto que van a unir los **iones positivos** (cationes) presentes en la solución.



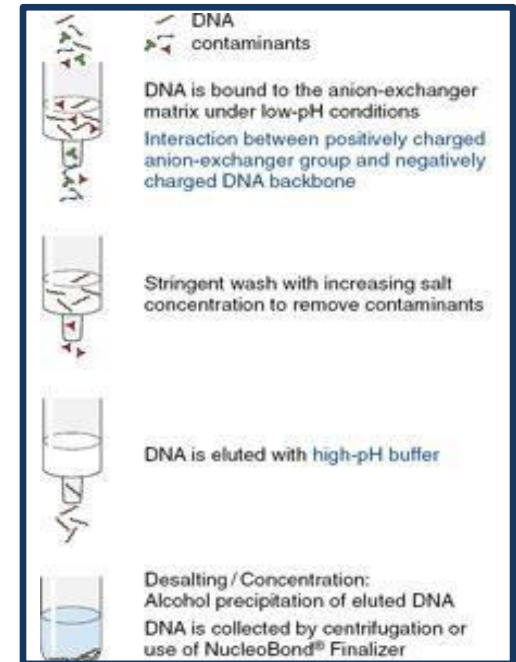
Iones en solución se unen a grupos funcionales anclados a una fase estacionaria que tienen carga de signo contrario.

* PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO

PROCEDIMIENTO:

- La columna de cromatografía se carga con una dilución de lisado en un tampón de baja salinidad y pH neutro.
 - En estas condiciones, los ácidos nucleicos tienen carga negativa y se unen a los grupos funcionales del intercambiador, que tienen carga positiva.
 - Las proteínas, los polisacáridos y otros contaminantes del lisado con carga positiva no se unen al intercambiador y eluyen de la columna.
- La columna se lava con tampones de concentración salina creciente, con los que se van eliminando contaminantes con débil carga negativa.
- El ADN se eluye de la columna con un tampón de máxima salinidad y alto pH.
- Los ácidos nucleicos se precipitan con isopropanolol.
- Se lavan con etanol y se resuspenden en agua destilada o tampón TE.



Los grupos funcionales más utilizados son:

- Metilaminoetanol (MAE)
- Dietilaminoetil (DEAE)

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

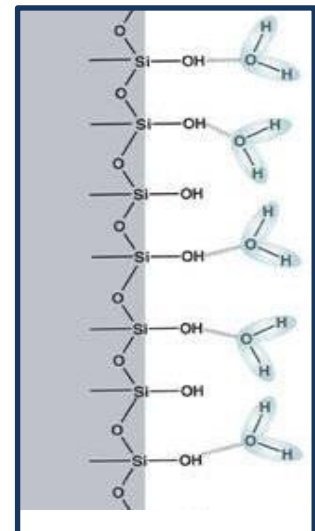
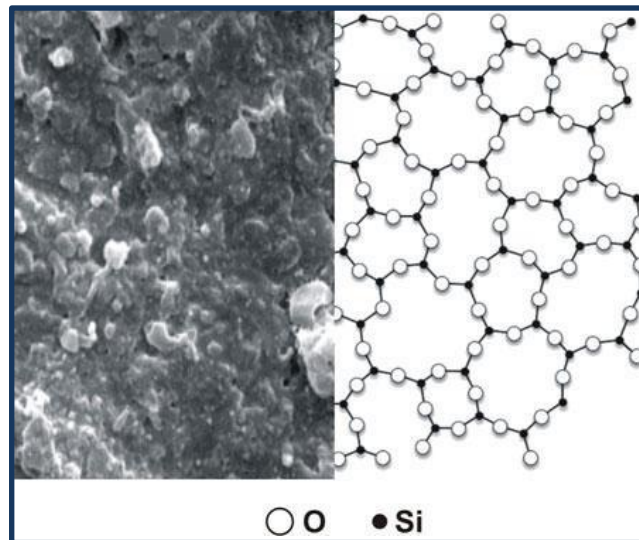
CROMATOGRAFIA DE ADSORCIÓN

La cromatografía de adsorción se basa en la capacidad de adsorción de los ácidos nucleicos al vidrio y a la sílice en presencia de *sales caotrópicas*.



Un **agente caotrópico** es una **sustancia que desorganiza la red tridimensional del agua** influyendo en la organización de sus moléculas a través de sus enlaces de hidrógeno, y en la interacción de estas con otros solutos como macromoléculas tales como proteínas, ADN o ARN, tendiendo a desnaturalizarlas o disolverlas. Ejemplos: **urea, tiourea y sales de guanidina**

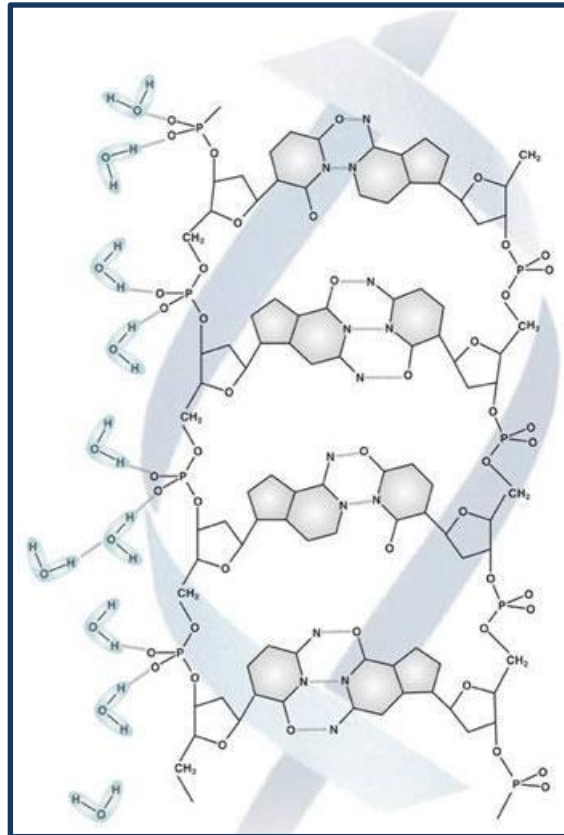
Si observamos la estructura molecular del vidrio, vemos que tiene una **estructura de tetraedro** debida a la composición de SiO_4 , que **establece puentes de hidrógeno con el agua**, por lo que toda la superficie esta recubierta de una capa hidratante.



PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

CROMATOGRAFIA DE ADSORCIÓN

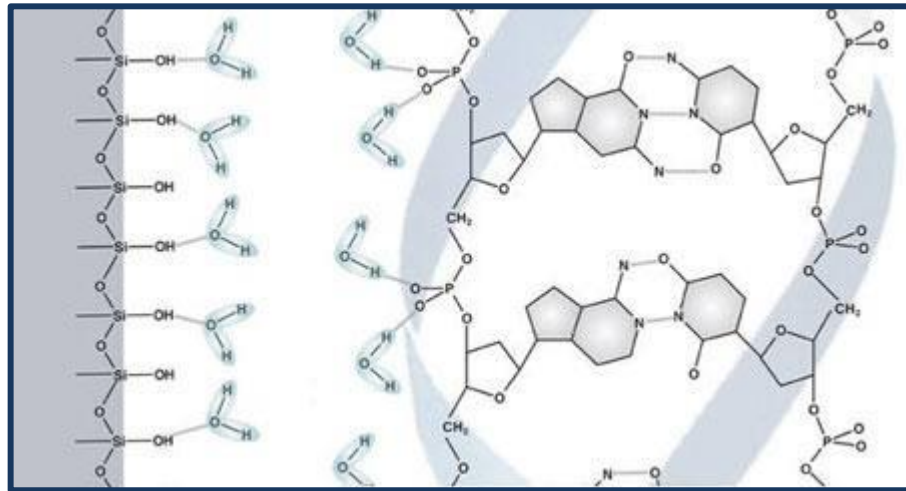
El ADN esta *cargado negativamente debido a los grupos fosfato*, por lo que también esta recubierto por una capa hidratante al establecer de nuevo interacciones con ésta por puentes de hidrógeno.



PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

CROMATOGRAFIA DE ADSORCIÓN

Estas dos estructuras deberían impedir la interacción entre ambas moléculas (el ADN y el vidrio o la membrana de sílice).



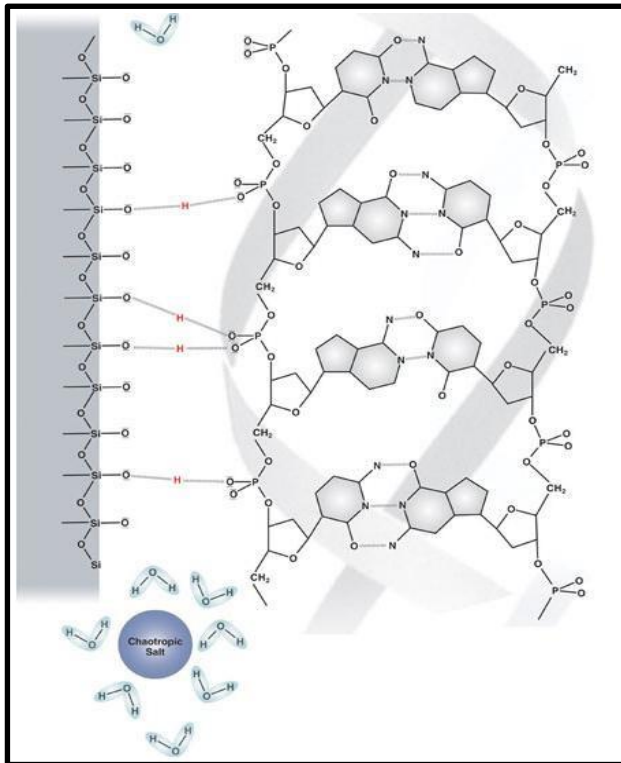
SAL CAOTRÓPICA

(Yoduro potásico-experimento de Vogelstein)

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

CROMATOGRAFIA DE ADSORCIÓN

Las sales caotrópicas atraen las moléculas de agua y eliminan la capa hidratante que recubre las diferentes biomoléculas, lo cual permite que dichas moléculas (membrana de sílice y ADN) interactúen por medio de diferentes mecanismos.



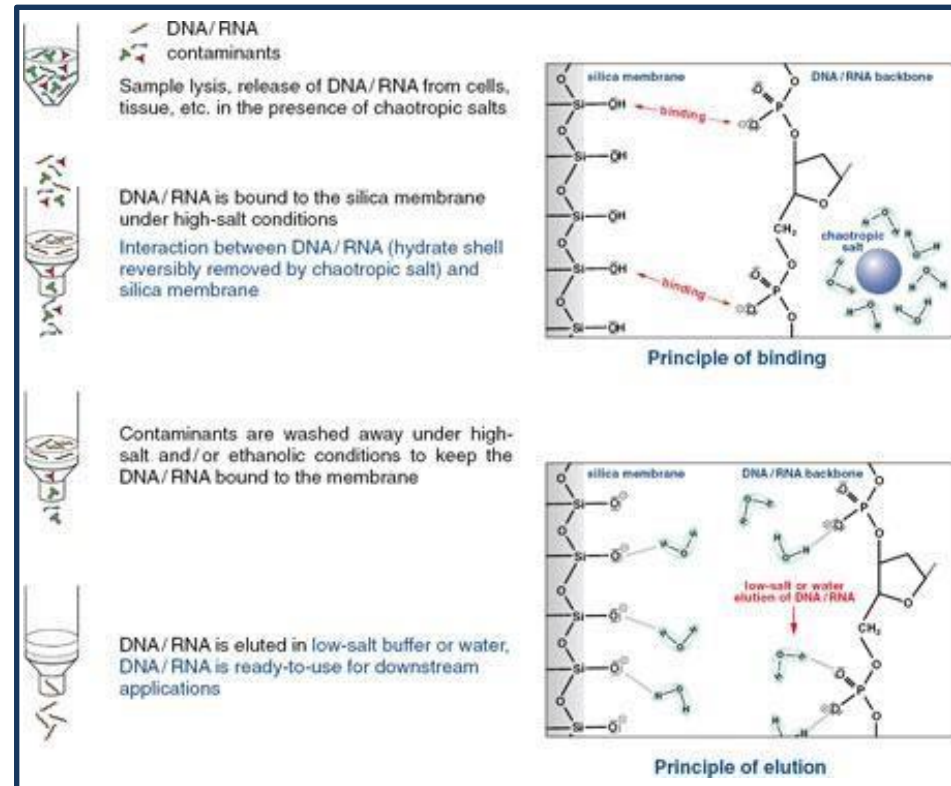
- Los **ácidos nucleicos se unen perfectamente a la membrana de sílice de las columnas**
- Las **proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen** y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado.
- Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílice mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos) o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana.

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

CROMATOGRAFIA DE ADSORCIÓN

PROCEDIMIENTO:

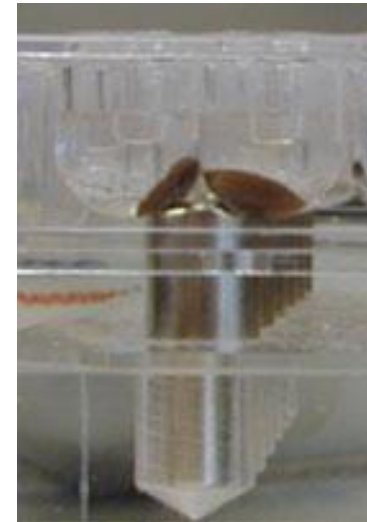
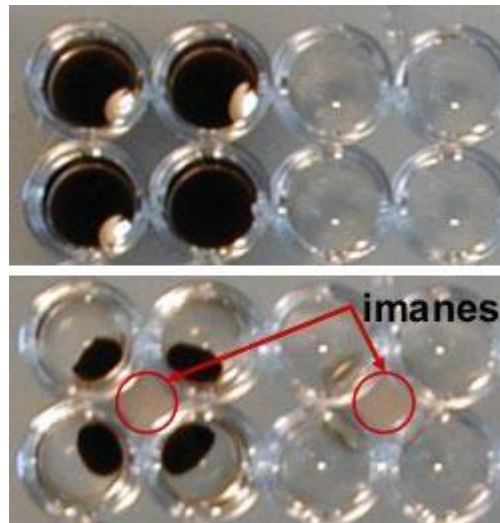
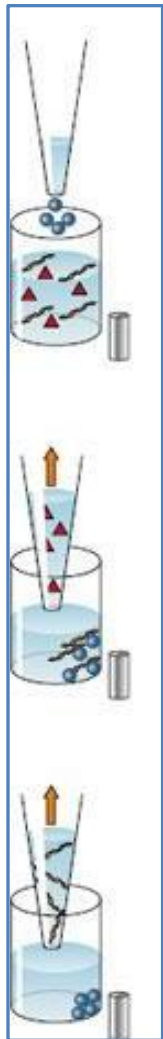
- La columna se carga con el lisado diluido en un tampón que contiene un agente caotrópico y se centrifuga, → los ácidos nucleicos quedan unidos a la membrana de la columna (adsorción) → el medio líquido con las proteínas y componentes celulares contaminantes se recoge en el tubo colector y se elimina.
- Los ácidos nucleicos unidos a la mb. → se lavan con etanol de 70° para eliminar restos de contaminantes.
- Finalmente, la columna se ajusta en un tubo eppendorf limpio → se añade sobre la memb la cantidad adecuada de agua destilada o tampón TE.



PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PURIFICACIÓN MEDIANTE ESFERAS MAGNÉTICAS

- La purificación mediante esferas magnéticas se basa en la **unión de los ácidos nucleicos a microesferas magnéticas que pueden ser retenidas mediante un imán.**
- Las microesferas suelen estar constituidas por nanopartículas de magnetita encapsuladas en una matriz inerte.
- El tubo que contiene la mezcla se coloca en un soporte con imán (separador magnético), de manera que las esferas unidas a los ácidos nucleicos, son atraídas por el imán y se agrupan en la zona de la pared del tubo que está en contacto con el mismo.



PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ULTRAFILTRACIÓN

La **ultrafiltración** se basa en la retención por tamaño de las moléculas de los ácidos nucleicos mediante membranas con un tamaño de poro determinado.

PROCEDIMIENTO:

- La muestra se carga directamente en la columna y se centrifuga, de manera que **sobre el filtro quedan retenidos los ácidos nucleicos y al tubo colector pasan los contaminantes.**
- El filtro se lava con etanol para eliminar restos de contaminantes.
- Para resuspender los ácidos nucleicos se añade a la columna agua destilada o tampón TE, se incuba unos minutos a temperatura ambiente y se transfiere a un tubo limpio mediante pipeteo.



CONSIDERACIONES ESPECIALES PARA LA PURIFICACIÓN DEARN

El ARN es muy sensible a la acción de la **ARN asasa** y se degrada rápidamente por su acción



- LasARN asason enzimas muy resistentes que están presentes en todas las superficies y materiales, como consecuencia de la contaminación por bacterias, hongos y células de descamación de la piel.
- La esterilización del material por calor no las elimina, puesto que al desnaturalizarse con las temperaturas elevadas pierden su actividad, cuando disminuye la temperatura recuperan su conformación nativa y recobra su actividad.



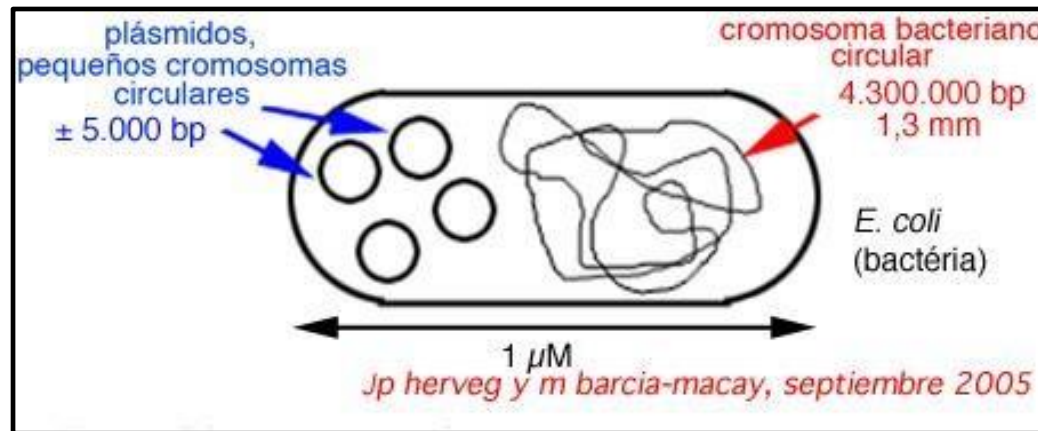
Condiciones especiales para la purificación del ARN:

- Trabajar con guantes en cabina de flujo laminar, para evitar contaminaciones.
- Limpieza de superficies con soluciones comerciales inactivadoras de ARN asasa.
- Debe estar certificado que todo el material que se use (tubos eppendorf, puntas de pipeta...) se encuentre libre de ARN asasa.
- La solución de lisis debe contener un agente caotrópico que inactive las ARN asasa. El más utilizado es el isotiocianato de guanidinio.
- Todos los reactivos empleados en el proceso y el agua destilada deben estar libres de ARN asasa.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Los **plásmidos** son moléculas circulares de ADN extracromosómico bacteriano de pequeño tamaño, que en muchas ocasiones portan **genes de resistencia a antibióticos** o **factores de virulencia**.

El problema se plantea durante su purificación, puesto que hay que separarlos del ADN cromosómico bacteriano y del ARN bacteriano.



PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

- CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD.
- LISIS ALCALINA

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD

Tradicionalmente la separación se basaba en la **diferencia de densidad de ambos tipos de moléculas**.

- Una vez purificado todo el ADN bacteriano (cromosómico + plasmídico) se sometía a una Ultracentrifugación en gradiente de densidad.
- Como **el ADN plasmídico tiene una densidad mucho menor que el ADN cromosómico**, ambos tipos se separaban en bandas diferenciadas.
- La técnica era muy laboriosa.

LISIS ALCALINA

Actualmente, el método más usado en la purificación de plásmidos es la **lisis alcalina**, que se basa en diferencias en el proceso de desnaturalización/renaturalización de ambos tipos de moléculas.

Consta de varias fases:

- **Lisis alcalina**
- **Neutralización rápida**
- **Purificación del ADN plasmídico**

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

LISIS ALCALINA

LISIS ALCALINA

- Se resuspenden las bacterias en una solución de suspensión.
- Se añade una solución de lisis fuertemente alcalina (pH 11) compuesta por el **detergente SDS** e **hidróxido de sodio**.
- Durante el período de incubación se produce la lisis de las bacterias por la acción del SDS y la desnaturalización del ADN, tanto el cromosómico como el plasmídico, por el pH alcalino

NEUTRALIZACIÓN RÁPIDA

Se añade a la mezcla una **solución concentrada de acetato potásico a pH ácido** (pH=4,8) que produce:

- El **ADN plasmídico**, al ser de un tamaño menor, **renaturaliza** perfectamente, **recuperando su estructura** nativa superenrollada y manteniéndose en solución.
- La alta concentración salina provoca la precipitación de las proteínas y el detergente que producen agregados que atrapan también la maraña de ADN cromosómico no renaturalizado.
- En el sobrenadante queda el ADN plasmídico en su configuración nativa.

PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

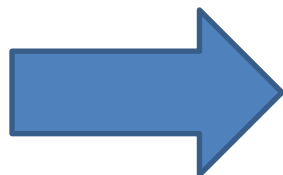
El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio, se trata con ARNasa para eliminar el ARN contaminante y se purifica por alguno de los métodos descritos.

AUTOMATIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN

Las diferentes metodologías de extracción y purificación se han automatizado y se han optimizado con el diseño de *robots automáticos de extracción o kits de reactivos específicos* para diferentes muestras.

Actualmente hay soluciones automatizadas prácticamente para cualquier laboratorio de biología molecular, independientemente del volumen de muestras que se vaya a procesar y del tipo de muestras (sangre, tejidos animales o vegetales, cultivos bacterianos, muestras forenses...)

TIPOS DE INSTRUMENTOS AUTOMÁTICOS



- Basado en el uso de partículas magnéticas
- Basados en cromatografía de adsorción
- ***Instrumentos modulares:*** brazos manipuladores y módulos de agitación, vacío, centrifugación....

VENTAJAS DE LA AUTOMATIZACIÓN

- Garantiza la obtención de ácidos nucleicos altamente purificados
- Minimiza la contaminación por proteínas
- Evita la contaminación cruzada entre muestras
- Aporta rapidez ya que permite obtener ácido nucleico purificado en menos de una hora

CALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS PURIFICADOS

La calidad de los ácidos nucleicos purificados viene determinada por tres parámetros:

- **INTEGRIDAD**
- **PUREZA**
- **CONCENTRACIÓN**

Una buena calidad en la obtención de ácidos nucleicos es la clave para conseguir una adecuada funcionalidad de los mismos en las diferentes técnicas de biología molecular.

INTEGRIDAD

- Es el **parámetro que determina si un ácido nucleico conserva su tamaño original.**
- La mejor manera de valorar la integridad de los ácidos nucleicos es la ***electroforesis en gel de agarosa***.
- Dependiendo del tipo de ácido nucleico que hayamos purificado, el resultado esperado en la electroforesis varía:
 - ADN genómico
 - ADN plasmídico
 - ARN

CALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS PURIFICADOS

INTEGRIDAD

ADN genómico.

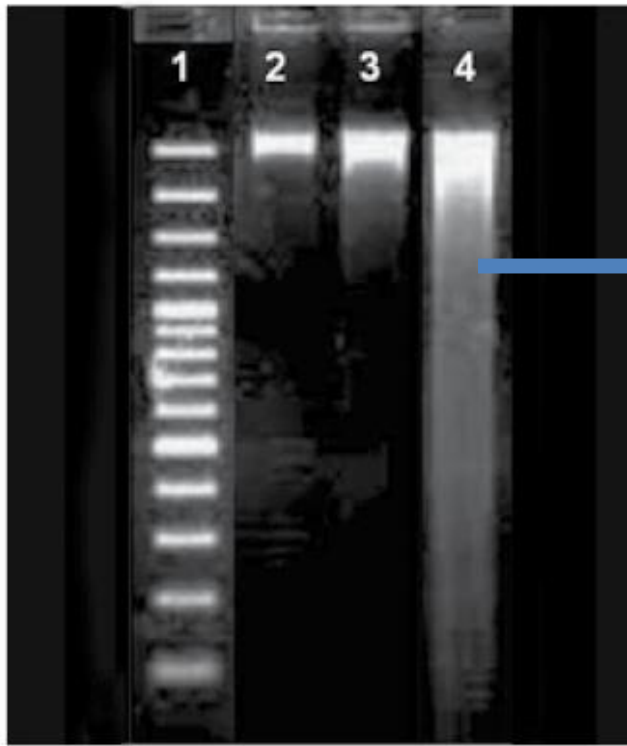
- En las muestras en las que el **ADN haya mantenido su integridad**, se obtendrá una **banda única de ADN perfectamente definida** en la parte superior del gel.
- Si el **ADN se fragmenta o degrada**, aparecerá una **estela fluorescente o smear** (en inglés) a lo largo de la calle de electroforesis, cuya extensión e intensidad dependerán del grado de degradación de la muestra.
- Este patrón electroforético no es aplicable a las muestras purificadas a partir de tejido FFPE

ADN plasmídico.

- Lo ideal es obtener una única banda en la electroforesis, correspondiente al plásmido con su estructura nativa.

ARN:

- Es normal que aparezca un ligero smear, debido al **ARNm** (conjunto de múltiples moléculas distintas con tamaños diferentes), con **dos bandas nítidas, correspondientes a los ARNr 28S y 18S**.
- En ocasiones se observa una **tercera banda, más débil**, correspondiente a los **ARNr 5.5S y 5S** y a los ARNt.

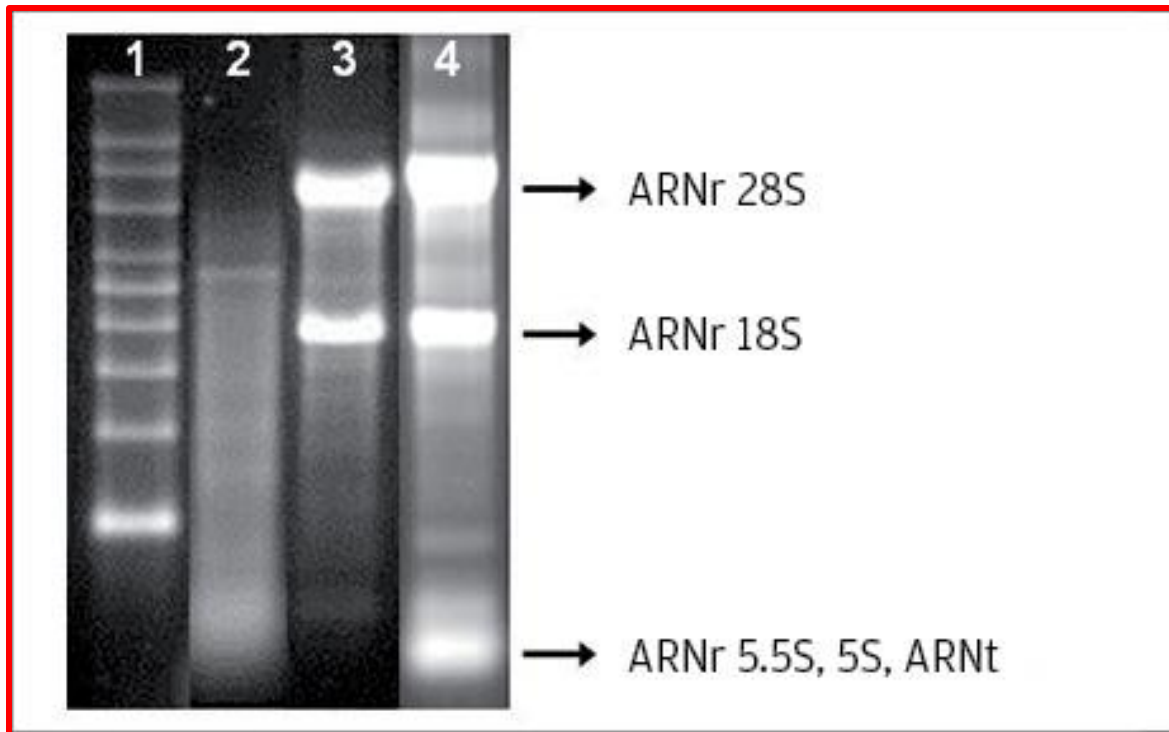


Si el ADN se fragmenta o se degrada aparecerá una estela fluorescente o ***smear***.

ADN plasmídico



→ Dímeros
→ Estructura relajada
→ Estructura nativa



- 1) Marcador de tamaños.
- 2) Muestra degradada.
- 3) y 4) Muestras bien purificadas.

CALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS PURIFICADOS

PUREZA

Es el **parámetro que determina la ausencia de posibles contaminantes.**

La medida del grado de pureza se basa en una de las propiedades de los ácidos nucleicos: **su máxima absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.**

Cociente A260/A280

- El parámetro que más se utiliza para valorar la pureza es el cociente entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}).
- Esto es debido a que los principales contaminantes de los ácidos nucleicos (proteínas y derivados fenólicos) tienen un máximo de absorbancia a 280 nm.
- En consecuencia, la relación entre ambas absorbancias da una idea del grado de contaminación de la muestra.
- En general, se recomienda que esta medida esté **comprendida entre 0,1 y 1,0.**

CALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS PURIFICADOS

PUREZA

Valores del cociente A_{260}/A_{280} en el ADN

- Se considera que tiene un **grado de pureza adecuado** cuando A_{260}/A_{280} tiene un **valor entre 1,7 y 2**.
- **Valores de 1,6 e inferiores** indican **contaminación** de la muestra por proteínas o fenoles.
- **Valores superiores a 2,0** indican una **concentración elevada de ARN**, ya que la absorbancia del ARN a 260 nm es mayor que la del ADN.

Valores del cociente A_{260}/A_{280} en el ARN

- Se considera que tiene un **grado de pureza adecuado** cuando A_{260}/A_{280} tiene un **valor entre 1,8 y 2,1**.

Cociente A_{260}/A_{230}

- Es un parámetro adicional para valorar la calidad de un ácido nucleico, ya que a 230 nm se detecta la máxima absorbancia de contaminantes menores, como carbohidratos y sales.
- **Se considera que el ácido nucleico es puro cuando el cociente A_{260}/A_{230} se encuentra entre 1,5 y 2,2**.
- Un **valor inferior a 1,5** puede indicar **presencia de contaminantes**,

Absorbancia a 320 nm → mide la turbidez de la solución

CALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS PURIFICADOS

CONCENTRACIÓN

Es la **cantidad de ácido nucleico por unidad de volumen de solución final**.

Los métodos más utilizados para medir la concentración de una solución de ácidos nucleicos son: absorbancia a 260 nm y la fluorescencia (empleo de colorantes específicos que emiten fluorescencia cuando se combinan con el ADN).

FUNCIONALIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS PURIFICADOS

- **La obtención de unos buenos parámetros de calidad en un ácido nucleico purificado serán indicadores de su buena funcionalidad.**
- Se puede comprobar la funcionalidad de los ácidos nucleicos purificados sin tener que determinar los parámetros de calidad, a partir de la realización de una PCR o una RT-PCR de control.
- El hecho de que **una polimerasa pueda utilizar el ácido nucleico purificado como molde será indicativo de una buena funcionalidad de este.**

ALMACENAMIENTO DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

El sistema de almacenamiento debe cumplir con dos objetivos fundamentales respecto de las muestras:

- Garantizar su integridad.
- Asegurar su completa trazabilidad.

Condiciones para la integridad de las muestras

Hay que evitar o reducir al mínimo su degradación en el tiempo. Para esto:

- Se deben usar **tubos tipo eppendorf o criotubos con cierre hermético** y libres de nucleasas (ADNasas y ARNasas).
- Las **muestras de ADN** (se conservan en frío):
 - Si se van a utilizar en 4-5 días → en nevera a 4 °C.
 - Para tiempos mayores → congelación a -20 °C o preferiblemente a -80 °C.
- Las **muestras de ARN** siempre en congelación,
 - A -20 °C para tiempos cortos
 - A -80 °C para tiempos largos.

TRAZABILIDAD DE LAS MUESTRAS

La trazabilidad requiere un sistema de identificación adecuado de cada muestra.

Hay varias opciones de complejidad creciente:

- **Rotulación directa de los tubos**
- **Uso de etiquetas con codificación alfanumérica**
- **Uso de etiquetas con código de barras (1D) o de puntos (2D)**
- **Uso de tubos con codificación 2D grabada en el propio tubo.**

Estos sistemas permiten la identificación directa en las cajas o racks de 96 tubos con escáneres de lectura y software específico de descodificación.

- Las cajas o racks para guardar los tubos también deben estar correctamente identificadas con código de barras o puntos, mediante etiquetas o grabados.

Se deben utilizar:

- Tintas indelebles
- Tintas/etiquetas resistentes a solventes orgánicos
- Tintas/etiquetas resistentes a bajas temperaturas