



# Estudia un día en la UMH

Asignatura: BIOLOGIA

Práctica: Extracción de ADN

# Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) es el primer paso para poder utilizar un marcador molecular.

Cada persona realizará **1 o 2 extracciones**, siguiendo los siguientes pasos:

- a) Introducir una hojita pequeña de tomate en cada tubo. Si es demasiado grande se coge un trozo.
- b) Añadir 250  $\mu$ l de tampón de extracción (Tris 100 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8 y NaCl 500 mM).
- c) Triturar con un "palito azul" hasta que no queden restos de hoja.
- d) Añadir 250  $\mu$ l de tampón de extracción.
- e) Añadir 35  $\mu$ l de SDS. Agitar suavemente para no formar demasiada espuma.
- f) Incubar los tubos a 65 °C durante 5 minutos.
- g) Añadir 130  $\mu$ l de acetato de potasio 5 M.
- h) Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- i) Centrifugar los tubos a 13.000 rpm durante 10 minutos.
- j) Pasar el sobrenadante (500  $\mu$ l) a otro tubo limpio, rotulado convenientemente. Procurar no arrastrar restos.
- k) Añadir 500  $\mu$ l de isopropanol y 60  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M.
- l) Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- m) Centrifugar los tubos a 13.000 rpm durante 10 minutos.
- n) Eliminar la mayor cantidad posible del líquido sobrenadante, sin arrastrar el precipitado.
- o) Añadir 300  $\mu$ l de etanol al 70 %. Golpear el tubo para que el precipitado se desprenda del fondo.
- p) Centrifugar los tubos a 13.000 rpm durante 5 minutos.
- q) Eliminar la mayor cantidad posible de alcohol. Si queda, dejar los tubos abiertos para que se evapore.
- r) Una vez que esté completamente seco se resuspende, añadiendo una pequeña cantidad de agua estéril (30 a 100  $\mu$ l).

Se conserva en la nevera a 4 °C durante meses.

Para comprobar la calidad de la extracción se puede realizar una electroforesis, junto con extracciones ya comprobadas.

## Electroforesis en geles de agarosa

El método de separación de moléculas de ADN de uso más frecuente es la electroforesis en geles de agarosa (un polisacárido cuyas propiedades son similares a las del agar) teñidos con un colorante específico. Hasta hace unos años, el colorante más utilizado fue el bromuro de etidio. El bromuro de etidio es un agente intercalante, que emite fluorescencia cuando es expuesto a la luz ultravioleta (312 nm), lo que posibilita la visualización de las moléculas de ADN en el gel. Se utilizará como electrolito TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA). El bromuro de etidio es un poderoso mutágeno, por lo que se debe manipular el gel con sumo cuidado, empleando guantes en todo momento, recogiendo los residuos por separado, etc..

**Actualmente utilizamos un colorante no cancerígeno, con nombre comercial GELRED™ (Biotium), cuya composición desconocemos.**

## Preparación de un gel de agarosa

Para evitar que los alumnos manipulen bromuro de etidio, los geles de agarosa se prepararán antes de empezar la práctica.

La preparación de un gel de agarosa en TAE 1x comprende las siguientes etapas:

- a) Tomar el volumen necesario del tampón de electroforesis y verterlo en un matraz de volumen adecuado.
- b) Pesar la correspondiente cantidad de agarosa y depositarla en el matraz.
- c) Disolver la agarosa mediante calentamiento en un microondas. Debe interrumpirse el calentamiento siempre que la disolución entre en ebullición. Comprobar que la agarosa se ha disuelto completamente en el tampón y que no se han formado burbujas y dejar enfriar.
- d) Mientras tanto, sellar el portageles con cinta adhesiva y colocar el peine sobre el portageles.
- e) Agitar suavemente la disolución y verterla en el portageles, donde polimerizará al enfriarse.
- f) Una vez que se observe que la agarosa ha solidificado retirar el peine y la cinta adhesiva. Si no va a utilizarse inmediatamente, el gel puede conservarse a 4°C en el frigorífico, envolviéndolo con una lámina de plástico transparente, para evitar su deshidratación.

## Electroforesis

Los pocillos de los extremos del gel se emplearán para cargar una muestra del marcador de peso molecular, un conjunto de varias moléculas de ADN cuyos tamaños se conocen. Las bandas del marcador de peso molecular se usarán como referencia para inferir los tamaños de las restantes moléculas del gel.

A cada muestra hay que añadirle tampón de carga, cuya función es triple:

- Incrementar la densidad de la muestra, para que ésta permanezca en el fondo del pocillo, lo que se consigue con la sacarosa.
- Dar color a la muestra, para facilitar la carga y controlar el tiempo de la electroforesis. En este caso se utiliza el Orange G (Sigma).
- Un colorante específico de los ácidos nucleicos, que permita su visualización. En este caso utilizaremos GELRED™ (Biotium) contiene dos colorantes muy visibles (azul de bromofenol y xilencianol) que migran a velocidades distintas y permiten tener una estimación del desplazamiento del ADN a lo largo del gel.

Cada persona preparará **1 carga para cada extracción**, mezclando 5 µl de H<sub>2</sub>O estéril, 2,5 µl de tampón de carga 5x y 5 µl de la extracción de ADN.

Conectar los electrodos a la fuente de alimentación, colocando el de color rojo en el extremo opuesto a aquél en el que se cargó el ADN. Poner en marcha la fuente de alimentación, regulándola a un voltaje constante y dejar transcurrir la electroforesis el tiempo necesario.

El ADN, cargado negativamente, migra hacia el polo positivo del campo eléctrico generado por la fuente de alimentación, con una velocidad que depende de varios parámetros: el tamaño y la conformación de la molécula, la concentración de agarosa en el gel y el voltaje aplicado.

Una vez terminada la electroforesis se visualizará el gel. Para ello se colocará el gel en el transiluminador UV, y con las protecciones oportunas se hará una foto al gel.

### Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN

