

## EXTRACCIÓN DE ADN

Este protocolo ha sido elaborado durante el desarrollo del Proyecto de Innovación, "La fina hebra que nos une", en el I.E.S Juan Carlos I y coordinado por José María Espinosa Bernal. La financiación corrió a cargo del Centro de Profesores y Recursos, C.P.R. de la Consejería de Educación y Cultura de Murcia.

This protocol has been designed during the development of our Innovation Project "The fine thread that connects us" in our Secondary School, Juan Carlos I. Funding was provided by the Center for Teachers and Resources of the Ministry of Education and Culture of Murcia.



El contenido está disponible bajo la Licencia Internacional Reconocimiento-No Comercial-Sin Derivados de Creative Commons. Contacta con ([josemaria.espinosa@murciaeduca.es](mailto:josemaria.espinosa@murciaeduca.es)) si quieres realizar adaptaciones para su distribución fuera del aula.

Content is made available under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives International License. Contact ([josemaria.espinosa@murciaeduca.es](mailto:josemaria.espinosa@murciaeduca.es)) if you would like to make adaptations for distribution beyond the classroom.

### Fundamento

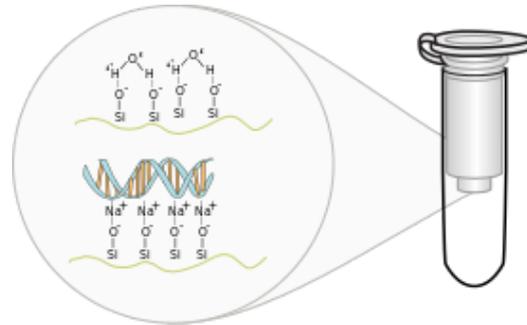
#### Extracción con suspensión de sílice

Puesto que los ácidos nucleicos tienen un tamaño y una naturaleza química muy diferente al resto de las biomoléculas, son en general fáciles de separar del resto de componentes celulares.

Lo primero que tenemos que hacer en cualquier proceso, es disgregar las células para que el ADN esté disponible. En estas condiciones el ADN está rodeado de una capa hidratante. Al agregar a esa dispersión una sustancia caotrópica, como la **guanidina** se destruye esta estructura de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del DNA. Ahora, las moléculas de ADN son capaces de unirse a una membrana de sílice, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros

contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminadas de la muestra durante los pasos de lavado.

Este procedimiento se utiliza en numerosos kits comerciales, y es lo que vamos a suprimir utilizando una suspensión de sílice, obtenida de **óxido de sílice** como reactivo comercial. En lugar de quedar el ADN retenido en una columna, por la que pasaremos los sucesivos tampones de lavado, nuestro ADN estará pegado a los trocitos de sílice y en cada centrifugación (lisis, limpieza, etc), eliminaremos el sobrenadante. Al final añadiremos un tampón con muy bajo contenido en sales y al centrifugar, el ADN estará disponible en el sobrenadante.



La **Proteinasa K**, que se añade junto a la guanidina, va a degradar las proteínas y por tanto nos ayuda a clarificar la disolución y separar mejor el ADN.

### *¿Qué ocurre en cada paso de la purificación?*

Una vez que añadimos estos dos ingredientes, calentamos a 56 ° C en un baño o bloque termostático. Después de una centrifugación, donde eliminamos las proteínas y todos los restos celulares, en el sobrenadante del punto 6, tendremos todo el ADN. En esas condiciones, al agregar la suspensión de sílice e incubar, dicho ADN quedará unido a las partículas de la suspensión. Por esa razón, al centrifugar ahora (punto 9), lo que tenemos que eliminar es el sobrenadante. En el precipitado tendremos el ADN junto a la sílice.

El siguiente paso es el lavado (del 10 al 14). Utilizamos para ello una disolución que contiene etanol y NaCl, que nos asegura que el ADN va a seguir unido a la sílice. Repetimos el paso dos veces. Puesto que el etanol puede interferir en la PCR y la secuenciación, antes de agregar el tampón TE, vamos a dejar que los restos de etanol se evaporen.

Una vez que tenemos el precipitado seco, agregamos tampón TE. Este tampón tiene un contenido muy bajo en sales, por lo que el ADN recupera su capa de hidratación y se separa de la matriz de sílice. Al centrifugar, obtendremos el ADN purificado en el sobrenadante.

La pregunta que podemos hacernos ahora sería ¿No estamos analizando ADNmt? ¿En qué momento lo hemos separado del resto del ADN? En realidad, no necesitamos extraer específicamente el ADNmt. Al final del proceso de purificación, lo que vamos a obtener es todo el ADN de la muestra. Será en el siguiente paso, donde, al utilizar oligos específicos, amplifiquemos exclusivamente el fragmento de ADNmt de nuestro interés.



## Extracción con Instagene

El reactivo Instagene es un reactivo comercial, y una muy buena opción para extraer ADN de una forma sencilla y barata. Contiene una resina al 6% , denominada Chelex, y se añade a una muestra de nuestras células. Basta con calentar a 100 °C unos minutos de manera que las células se rompen. La resina se une a los productos de lisis que inhiben la PCR, por lo que al centrifugar tenemos en el sobrenadante nuestra muestra de ADN lista para utilizar. Es decir, en este caso el reactivo que agregamos no se une al ADN, si no que actúa absorbiendo todo lo demás.

## Equipamiento

Este es el listado del equipamiento necesario. Ofrecemos en algunos casos, la alternativa DIYBio. Comprueba si lo tienes todo.

<b>NOMBRE</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<input checked="" type="checkbox"/>
Bloque termostático convencional	Mantener los microtubos a una temperatura determinada	<input type="checkbox"/>
Bloque termostático DIYBio. Runer de cocina.	Mantener los microtubos a una temperatura determinada	<input type="checkbox"/>
Centrífuga para microtubos convencional	Centrifugar los microtubos a velocidades de hasta 14.000 r.p.m	<input type="checkbox"/>
DremelFuge	Centrifugar los microtubos a velocidades de hasta 14.000 r.p.m	<input type="checkbox"/>
Vortex	Mezclar el contenido de un microtubo	<input type="checkbox"/>
Micropipetas de diferentes volúmenes.		<input type="checkbox"/>



## Reactivos

Para la extracción con suspensión de sílice.

<b>NOMBRE</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>PREPARACIÓN</b>	
<b>Suero salino (NaCl al 0,9 %)</b>	Solución isotónica para resuspender las células de nuestra boca.	Comercial.	
<b>Proteinasa K</b>	Va a degradar las proteínas y por tanto nos ayuda a clarificar la disolución y separar mejor el ADN.	Comercial	
<b>Disolución guanidina HCl 6 M, 100 mL ( a T<sup>a</sup> amb.,6 meses)</b>	Disolución caotrópica que fuerza al ADN a unirse a las partículas de sílice.	Disolver 57.32 g de guanidina (m.w. = 95.53) en 50 m de agua desionizada. Añadir agua hasta un volumen de 100 mL	
<b>Suspensión de sílice, 50 mL (conservar a 4 ° c)</b>	Suspensión de partículas de sílice a la que se va a unir nuestro ADN	Disolver 25 g de dióxido de silicio en 35 mL de agua desionizada. Añadir agua hasta un volumen de 50 ml	
<b>Tampón de lavado, 500 mL (conservar a -20°C indefinidamente)</b>	Tampón para lavar las partículas de sílice, eliminando así contaminantes y permitiendo que el ADN quede unido	Agua destilada 234 mL. 10 mL de Tris 1 M pH 7.4. 5 mL NaCl 5 M. 1 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0. 100% Ethanol, 250 mL.	
<b>Tampón TE (Tris 10 mM /EDTA 1mM) 100 mL (temperatura ambiente indefinidamente)</b>	Tampón de bajo contenido en sales que nos va a permitir recuperar nuestro ADN	1 mL de Tris 1 M pH 8,0. 200 µL de EDTA 0,5 M. Mezclar bien y enrasar.	



Disoluciones y reactivos necesarios para preparar los anteriores.

<b>NOMBRE</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>PREPARACIÓN</b>	
<b>EDTA 0.5 M, pH 8,0, 100 mL (temperatura ambiente indefinidamente)</b>	Necesario para preparar el tampón de lavado y el T.E.	Agregar 18,8 g de EDTA (sal disódica dihidratada, M.m 372,24) a 80 mL de agua desionizada. Ajustar el pH añadiendo 2,2 g aproximadamente de NOH controlando el pH con el pHmetro, hasta que la disolución llegue a pH 8,0. Agitar con un agitador magnético. Añadir agua hasta un volumen de 100 mL. Autoclavar durante 15 minutos a 121 °C. Enfriar la disolución.	
<b>Cloruro de sodio 5 M, 100 mL, (temperatura ambiente indefinidamente)</b>	Necesario para preparar el tampón de lavado y el T.E.	Disolver 29,22 gramos de NaCl (M.m: 58,44) en unos 60 mL de agua destilada, en un vaso de precipitados. Pasar a un matraz de 100 mL y enrasar	
<b>Tris-HCl 1 M, pH 8, 100 mL, (temperatura ambiente indefinidamente)</b>	Necesario para preparar el tampón de lavado y el T.E.	Disolver 12,1 gramos de Tris base (M.m: 121,10) en unos 70 mL de agua destilada, en un vaso de precipitados. Ajustar el pH añadiendo con cuidado HCl concentrado. Monitorizar el pH con un pHmetro. Pasar a un matraz y añadir agua hasta 100 mL. Autoclavar 15 minutos a 121 °C. Dejar enfriar	



Para la extracción con Instagene

<b>NOMBRE</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>PREPARACIÓN</b>	
<b>Suero salino (NaCl al 0,9 %)</b>	Solución isotónica para resuspender las células de nuestra boca.	Comercial.	
<b>Instagene</b>	Atrapar los productos de lisis celular que inhiben la PCR	Comercial	

**Material de plástico.**

<b>MATERIAL</b>	
Hisopos estériles.	
Microtubos de 2, 1,5, y 0,5 mL.	
Gradillas para microtubos	
Puntas de 1000, 100, 20 y 10 microL	



## Procedimiento.

Con suspensión de sílice

1. Raspar el interior de la mejilla con un hisopo varias veces, para garantizar que arrastramos células del interior.
2. Enjuagar el hisopo en un microtubo que contenga 300  $\mu$ L de suero salino.
3. Añadir 300  $\mu$ L de disolución de guanidina y 20  $\mu$ L de Proteinasa K.
4. Incubar a 56 °C durante 10 minutos, agitando ocasionalmente con el vortex, hasta que las células estén lisadas.
5. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.
6. Transferir 150  $\mu$ L a un tubo limpio.
7. Añadir 30  $\mu$ L de suspensión de sílice y mezclar bien.
8. Incubar 5 minutos a 56° C.
9. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
10. Añadir 500  $\mu$ L de tampón de lavado frío y resuspender el precipitado.
11. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
12. Añadir otros 500  $\mu$ L de tampón de lavado frío y resuspender el precipitado.
13. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
14. Centrifugar de nuevo 1 minuto a máxima velocidad y eliminar el resto del sobrenadante con una micropipeta. Antes de pasar al siguiente paso, dejar que el etanol se evapore.
15. Añadir 50  $\mu$ L de tampón T.E, mezclar bien e incubar 5 minutos a 56 °C.
16. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.
17. Transferir 25  $\mu$ L de sobrenadante a otro tubo limpio y congelar hasta su uso.



## Con Instagene

- 1. Raspar el interior de la mejilla con un hisopo varias veces, para garantizar que arrastremos células del interior.
- 2. Enjuagar el hisopo en un microtubo que contenga 300  $\mu$ L de suero salino.
- 3 Centrifugamos la muestra durante 5 minutos a 8.000 r.p.m.
- 4. Decantamos el sobrenadante, evitando que se distorsione el precipitado celular.
- 5. Transferimos 70  $\mu$ L de Instagene al microtubo.
- 6. Resuspendemos las células con la micropipeta hasta que no queden grumos.
- 7. Incubamos la muestra a 100 °C durante 10 minutos.
- 8. Dejamos enfriar dos minutos a temperatura ambiente.
- 9. Centrifugamos 30 segundos a 13.000 r.p.m.
- 10. Transferimos cuidadosamente 10  $\mu$ L de sobrenadante a un microtubo.
- 11. Guardamos la muestra en hielo o en el congelador hasta el siguiente paso.