

Modulo I. Extracción de ADN genómico

Objetivos

1. Extraer ADN genómico de una bacteria gram negativa desconocida utilizando técnicas moleculares.
2. Familiarizar al estudiante en el uso del Kit de Purificación de ADN (Promega) para obtener ADN genómico.
3. Determinar la calidad y el rendimiento de la extracción a través de una electroforesis de gel de agarosa.

Teoría

La biología molecular surge alrededor de los 1930's. Se centra en entender la interacción y regulación entre ADN, ARN y proteínas. Mediante esta podemos acercarnos al entendimiento de procesos biológicos que ocurren a larga escala, estudiándolos a nivel molecular. La misma une conceptos del área de biología con genética, química y bioquímica, entre otros.

La microbiología molecular nos permite entender los principios moleculares de los procesos fisiológicos de la célula prokariota y eukariota. Además, nos ayuda en la caracterización de bacterias desconocidas aisladas y de comunidades microbianas.

Este laboratorio se centra principalmente en la extracción de ADN genómico de una célula prokariota. El ADN genómico se refiere a todo el ADN presente en la célula de un organismo. Para llevar a cabo la extracción del ADN genómico utilizaremos técnicas moleculares, las cuales se pueden utilizar para caracterizar, aislar y manipular componentes celulares. Algunos ejemplos de estas técnicas moleculares son: Reacción en cadena de polimerasa (PCR), Clonación, Geles de electroforesis y Southern Blot.

Extracción de ADN genómico

En laboratorios anteriores se ha discutido que uno de los métodos que nos ayudan en la identificación y diferenciación de bacterias es la tinción gram. La misma nos permite determinar si una bacteria desconocida es gram positiva o negativa. Una bacteria gram positiva posee una pared gruesa de peptidoglicano, mientras que la gram negativa posee una pared fina de peptidoglicano seguida hacia

el exterior por una membrana externa. Esta pared y membrana protegen el interior de la célula, que es donde se encuentra el ADN genómico. Para poder extraer el mismo, debemos utilizar agentes químicos y/o físicos que debiliten la pared y membrana de la célula. Por ende, es importante conocer el tipo de gram a la hora de realizar una extracción de ADN genómico, ya que debemos determinar qué agentes utilizar para el rompimiento efectivo de la célula.

Materiales y Métodos

(Se usará el DNA Purification kit de la compañía Promega)

A. Lisis Celular (Rompimiento de la célula)

1. Resuspender las células en microtubo con 600µL de la solución de lisis (Nuclei Lysis Solution, NLS). Esta contiene amortiguadores y detergentes que ayudan a lisar la célula, sin hacerle daño al ADN.
2. Incubar a 80°C por 10 min. La temperatura alta también ayuda a desestabilizar la membrana. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Añadir 3ul de la solución de RNAsa, mezclar invirtiendo el tubo. La RNAsa es una nucleasa que cataliza la degradación del RNA en componentes más pequeños. Esto permite que nuestro producto quede limpio de ARN.
4. Incubar a 37°C (temperatura de activación de la RNAsa) por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.

B. Precipitación de Proteínas

5. Añadir 200ul de la solución de precipitación de proteína (PPS). Mezclar por vortex por 20 segundos.
6. Incubar en hielo por 5 minutos.
7. Centrifugar a 13,000rpm por 3 minutos.

C. Purificación (Se utilizará isopropanol y etanol, los cuales ayudan a purificar y/o concentrar ADN, ARN y polisacáridos de soluciones acuosas)

8. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo que ya contiene 600ul de isopropanol (A-Iso) y mezclar por inversión.
9. Centrifugar a 13,000rpm por 3 minutos, decantar sobrenadante. El sobrenadante es la parte líquida soluble de una muestra luego de centrifugación o precipitación de sólidos insolubles.
10. Añadir 600ul de etanol (ET) al 70% y mezclar por inversión.
11. Centrifugar a 13,000rpm por 3 minutos.
12. Decantar el etanol. Dejar secar los tubos por 10 minutos boca abajo sobre papel toalla.

D. Rehidratación (Poner el ADN en solución)

13. Rehidratar el pellet de DNA en 100ul de la solución de rehidratación (RS). Esta solución posee buffers que protegen el ADN.
14. Incubar a 65°C por 30 minutos.

Gel de electroforesis

Se utiliza para observar los resultados de la extracción. Se prepara un gel de **agarosa al 0.8%**, para permitir la migración del **ADN genómico**. Esta posee varias fosas en donde serán colocadas las muestras y un marcador. El marcador sirve como regla para medir cuánto pesa nuestra muestra.

Preparación de las muestras (se hará sobre parafina)

En la primera fosa se debe colocar el **marcador** 1Kb. Este se prepara de la siguiente forma:

- 6 µl Tris EDTA (TE) 1X
- 2 µl Bromophenol Blue (BB)
- 2 µl 1Kb (Kilobase)

Luego, en las siguientes fosas se colocarán las **muestras** de ADN. Estas se preparan de la siguiente forma:

- 3 µl Tris EDTA (TE) 1X
- 2 µl Bromophenol Blue (BB)*
- 5 µl ADN

La gel de electroforesis para el ADN genómico se correrá por **30 minutos a 150V**.

*En este caso utilizamos bromophenol blue (BB) ya que posee menor peso molecular que el ADN genómico.