

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Laura Patricia Alejos Velázquez,¹
María del Consuelo Aragón Martínez,^{2,3}
Amelia Cornejo Romero^{2,4}

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (Schlötterer 2004). Estos marcadores se obtienen con técnicas como la PCR (por las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) y secuenciación, que hacen posible analizar la variación en la molécula del ADN con un detalle sin precedentes (Schlötterer 2004; Hudson 2008). Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comu-

¹ Unidad de Biotecnología y Prototipos. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México C.P. 54090. Correo-e: laura_alejos@yahoo.com.mx.

² Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, México D.F., México C.P. 09340. Apartado postal 55532. Teléfono: 5804-6456. Fax: 58044688.

³ Correo-e: snopyxxi@hotmail.com.

⁴ Correo-e: ameli.cornejo@gmail.com.

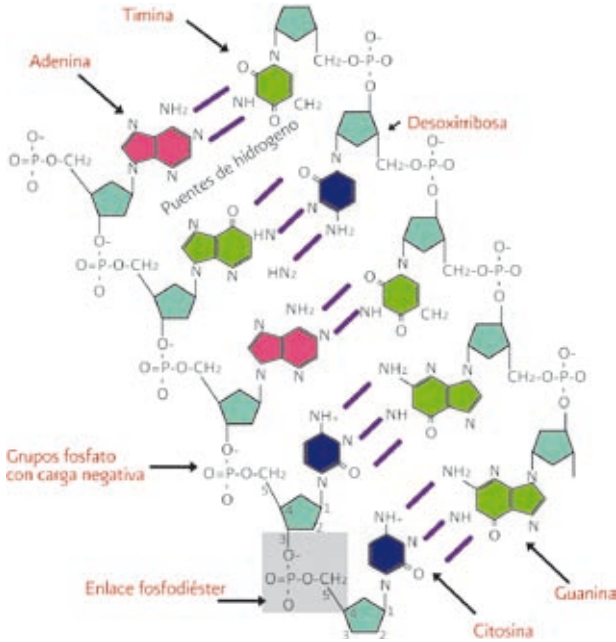
nidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros (Sunnucks 2000; Schlötterer 2004; Hudson 2008). La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro.

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Figura 1).

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (Sambrook *et al.* 1989). Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Nasón 1965, Travaglini 1973, Sambrook *et al.* 1989, Sinden 1994).

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN.

Figura 1. Estructura del ADN. En la estructura helicoidal del ADN, las cadenas se unen por puentes de hidrógeno dos entre adenina y timina, tres entre guanina y citosina. El enlace fosfodiéster que une a cada nucleótido, se forma entre el fosfato (H_3PO_4) que se encuentra en el carbono 5 y el grupo hidróxilo ($-OH$) del carbono 3 de la desoxirribosa. Los grupos fosfato son la parte hidrofílica del ADN y tienen carga negativa.

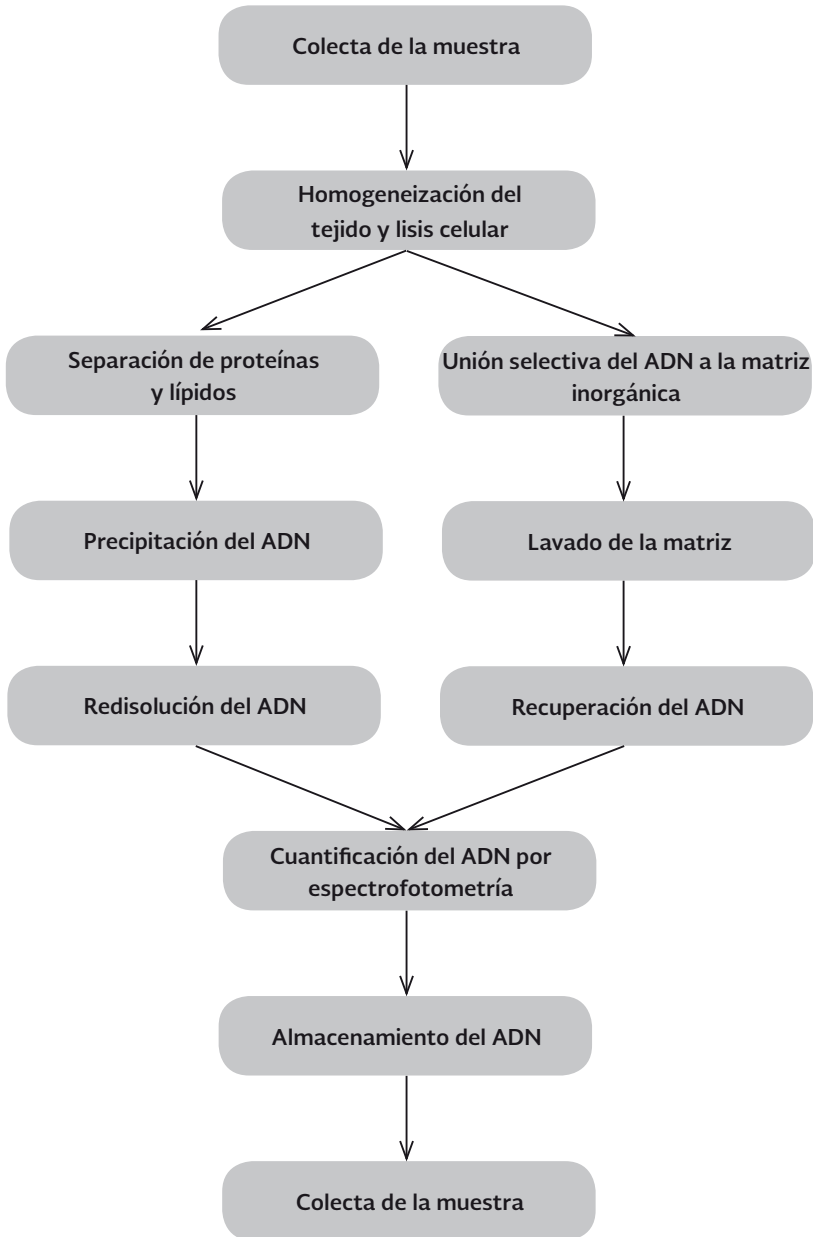


Modificada de www.eoearth.org/view/article/158858.

A partir de los años 90 se introdujeron al mercado combos o kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores. Los combos se venden en presentación de membranas de sílice o perlas magnéticas, las primeras están formadas por una resina y las segundas consisten de un centro de hierro recubierto por resina (Guinn 1966, Dundass *et al.* 2008). La membrana está insertada dentro de un microtubo de polipropileno y las microesferas se encuentran suspendidas en una solución amortiguadora.

Durante la extracción, el ADN cargado negativamente se adsorbe o une a la matriz selectiva de manera reversible y se mantiene unido a ésta durante la

Etapas de la técnica



remoción de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, posteriormente la molécula se libera de la matriz.

Los combos también incluyen soluciones de lisis, unión y lavado que no contienen fenol ni cloroformo para extraer proteínas, tampoco requieren etanol para precipitar al ADN (Qiagen 2005, Invitrogen 2005). Los kits comerciales disminuyen la extracción a unas cuantas horas porque reducen el número de pasos del procedimiento y, utilizados bajo las recomendaciones de cada proveedor, garantizan una extracción de alta pureza ya que tanto la recuperación del ADN como la eliminación de contaminantes son muy eficientes (Qiagen 2005, Invitrogen 2005).

La selección del método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de conservación, la técnica que se aplicará posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Independientemente del método seleccionado es recomendable encontrar un equilibrio entre pureza y rendimiento de acuerdo a la aplicación posterior.

Con la finalidad de que el usuario conozca las diferentes opciones y elija la más apropiada, de acuerdo con sus objetivos y recursos, en los siguientes párrafos se describen de manera general las etapas de los protocolos tradicionales y comerciales, se explican los métodos de análisis (concentración e integridad de la molécula) y almacenamiento del extracto.

PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN TRADICIONAL Y COMERCIAL

Colecta de la muestra

La colecta de la muestra y su manejo adecuados son indispensables para una extracción del ADN exitosa. En la tabla 1 se dan algunas recomendaciones importantes sobre la colecta y el manejo de tejidos vegetales y animales.

Una colecta y manejo apropiado de la muestra permite obtener ADN integro y sin contaminantes, los cuales afectan la acción de las enzimas durante la reacción de PCR. Cada tejido tiene sus consideraciones propias y siempre será necesario conocerlas o preguntar a los especialistas de cada grupo para llevar a cabo una colecta y extracción exitosas.

Tabla 1. Recomendaciones sobre la colecta y manejo de algunos tejidos de plantas y animales.

Organismo	Colecta en campo/ Transporte de la muestra	Almacenamiento de la muestra previo a la extracción
Plantas	<p>En el caso de tejido foliar, se recomienda colectar tejido joven pues contiene más células por unidad de peso que el tejido viejo y posee menos polisacáridos y polifenoles que dificultan la extracción. Una vez colectado, el tejido debe congelarse inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar la formación de cristales y que se sinteticen metabolitos secundarios después de la abscisión.^{1, 2, 3, 4} Si el tejido es obtenido de invernaderos o cultivo <i>in vitro</i>, no es necesario congelar el material, se puede hacer la extracción directamente.</p>	<p>Almacenar el tejido a -80 °C y evitar ciclos de congelación y descongelación antes de proceder con la extracción. Se recomienda congelar varios paquetes pequeños de la misma muestra con la cantidad de material que será procesada. Alternativamente, el tejido puede ser liofilizado y almacenado a temperatura ambiente entre 15 y 25 °C,⁵ aunque esta alternativa no es viable para suculentas.</p>
Animales	<p>Tejido Cortar el tejido en pedazos pequeños (aproximadamente 0.5x0.5 cm o menores) para facilitar su maceración posterior. El tejido se puede deshidratar con etanol al 70 % (aunque esta opción puede degradar el ADN o acarrear contaminantes) o bien, congelarse con nitrógeno líquido. Para transportar la muestra es recomendable utilizar un buffer especializado que inactive las endonucleasas, por ejemplo el RNAlater (Ambion®). Otra opción es homogenizar el tejido en buffer de lisis que contenga sales de guanidina o β-mercaptoetanol que inhiben DNAsas y RNAsas.⁶</p>	<p>Las muestras deben almacenarse de acuerdo al método de colecta utilizado, en etanol a 4 °C o si fue congelado con nitrógeno líquido a -80 °C</p>

Tabla 1. Continúa.

Organismo	Colecta en campo/ Transporte de la muestra	Almacenamiento de la muestra previo a la extracción
	Sangre Utilizar agujas de calibre apropiado, respetar la relación muestra/anticoagulante y homogeneizar correctamente la muestra para evitar la hemólisis* y/o coagulación**, y la contaminación bacteriana. Una vez obtenida la muestra es importante evitar movimientos bruscos durante el transporte.	Las muestras pueden mantenerse por unos días a 4 °C después de su colecta. Si se congela la muestra a -20 °C, debe descongelarse a temperatura ambiente y procesarse en su totalidad pues una vez descongelada, inicia la hemólisis, por ello es aconsejable hacer alícuotas.

* La hemólisis libera hemoglobina, un contaminante e inhibidor de las reacciones enzimáticas.

** Durante la coagulación el fibrinógeno (una proteína soluble de la sangre) se convierte en fibrina insoluble (Robbins y Cotran 2009), la cual tiene la capacidad de entrelazarse y atrapar entre sus fibras proteínas, agua y células impidiendo una lisis apropiada. La coagulación implica distintas reacciones enzimáticas que dependen del calcio. Los buffers contienen reactivos que evitan la coagulación, como el EDTA, la heparina y el citrato de sodio. El EDTA elimina el calcio de la sangre e impide la acción de las enzimas necesarias en la coagulación. Se utiliza en una proporción de 1 mg/ml de sangre (válido para todas las especies). La heparina evita que la protrombina se transforme en trombina, una proteasa que transforma el fibrinogeno en fibrina, se utiliza 0.1 ó 0.2 ml de heparina saturada por cada mililitro de sangre. El citrato de sodio actúa sobre el calcio evitando su ionización, se utiliza a una concentración de 0.106 mol/l.

¹ Blin y Stafford 1976; ² Eulgen *et al.* 1999; ³ Eulgen *et al.* 2000; ⁴ Sepúlveda-Jiménez *et al.* 2003; ⁵ Qiagen 2005; ⁶ Sambrook *et al.* 1989.

Homogeneización del tejido

La homogeneización, mecánica o química, consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético (Figura 2).

a) La homogeneización mecánica incluye el uso de:

Nitrógeno líquido

Este procedimiento consiste en macerar la muestra con nitrógeno líquido, en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo muy fino. El nitrógeno líquido, congela de inmediato la muestra y evita que se formen cristales en el interior de la célula que rompen la estructura celular e inicie el proceso de degradación. Este procedimiento, se puede utilizar en tejido fresco o congelado, por ejemplo semillas, plántulas, tejidos fibrosos o viscosos y hongos. Es importante considerar que si la muestra ya está congelada, se deberá disgregar con nitrógeno líquido para evitar la degradación del ADN por acción de las DNAsas.

Pistilos u homogeneizadores

Los pistilos disgregan la muestra mediante fricción con la pared del tubo que contiene la muestra, adicionalmente se puede utilizar algún material abrasivo como vidrio pulverizado o resinas. El proceso se realiza manualmente, con pistilos plásticos o con ayuda de dispositivos electrónicos, conocidos como homogeneizadores. Es recomendable adicionar un poco del buffer de lisis antes de iniciar, estas soluciones desnaturalizan a las proteínas y mantienen estable al ADN. Cuando se utilizan dispositivos es necesario colocar el tubo sobre una cama de hielo, lo cual evita que el ADN se fragmente por el calor que genera la fricción. El uso de pistilos u homogeneizadores se recomienda en general para muestras pequeñas y tejidos blandos, aunque también se usa para tejidos no fibrosos como hojas jóvenes o flores. No es recomendable utilizar este método con tejidos congelados, porque las células del interior del tejido se descongelan antes de entrar en contacto con la solución de lisis y el ADN se fragmenta por acción de las DNAsas. En este caso se recomienda que el tejido se disgregue en presencia de nitrógeno líquido. Alternativamente se pueden utilizar el *buffers* comerciales como RNALater® ICE (Ambion®). La muestra se sumerge en el reactivo y se mantiene a -20°C toda la noche, posteriormente se puede descongelar la muestra y macerar sin requerir nitrógeno líquido (<http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?AM7030M>, consultado en octubre del 2010).

b) Homogeneización química

En la homogeneización mediante agentes químicos, la muestra se mantiene en solución a altas temperaturas en presencia de detergentes, proteasas y agentes caotrópicos que rompen las uniones entre las células o que incluso pueden perforar la membrana celular. La disgregación química es recomendable para bacterias, muestras pequeñas de tejidos frescos o sangre. En tejidos fibrosos es recomendable cortar en fragmentos pequeños para favorece su disgregación.

Antes de iniciar la homogeneización es necesario contar con información sobre la cantidad apropiada de tejido que debe utilizarse pues una disgregación rápida y completa es esencial para asegurar la obtención de ADN y evitar su degradación. Si se excede la cantidad recomendada se puede sobresaturar el sistema, con lo que se afecta el rendimiento y aumentan las impurezas del extracto, de manera que es aconsejable realizar experimentos preliminares con distintas cantidades de material inicial para determinar cuál es la cantidad apropiada, en particular en los sistemas de extracción tradicionales. Por ejemplo, en el caso de tejido vegetal, el material liofilizado contiene mayor cantidad de células, por lo que se recomienda utilizar solo el 50% de peso fresco. Si el tejido contiene una alta cantidad de polisacáridos o polifenoles, se inicia con el 25% del peso. Sin embargo, si la especie tiene un genoma pequeño es posible incrementar la cantidad hasta un 50%. En el caso de tejido animal, aunque el peso o la cantidad inicial sea la misma el rendimiento puede variar significativamente entre tejidos. En la tabla 2 se muestra la cantidad de tejido recomendada y el rendimiento esperado cuando la extracción se lleva a cabo utilizando combos de extracción comercial.

Tabla 2. Tipo de tejido, cantidad de muestra y rendimiento esperado de ADN, usando combo de extracción comercial.

Material	Cantidad	Rendimiento de ADN (μg)
Células de <i>E. coli</i>	2×10^9	10-30
Células HeLa	5×10^6	20-40
Células 293F	5×10^6	15-30
Sangre de humano	200 μl	3-10
Cola de ratón	1 a 1.2 cm	5-25
Cerebro de ratón	25 mg	10-30

Tabla 2. Continúa.

Material	Cantidad	Rendimiento de ADN (μg)
Hígado de ratón	25 mg	10-30
Vaso de ratón	10 mg	10-40
Espinaca	100 mg	2.0 - 2.5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	100 mg	1.8 - 3.1
Alfalfa	100 mg	2.1 - 3.0
Girasol	100 mg	1.6 - 4.0
Hongo	100 mg	1.1 - 1.4
Soya	100 mg	0.3 - 2.0
Trigo	100 mg	9.2 - 14.6
Maíz	100 mg	4.4 - 6.6
Jitomate	100 mg	1.0 - 2.3

El rendimiento de ADN depende del tipo y cantidad de material inicial utilizado así como, de la capacidad de carga de la matriz empleada.

Modificado de: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf (consultado en agosto de 2010).

Lisis celular

Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen (Figura 2). Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las DNAsas (Sambrook *et al.* 1989). Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación.

Tanto la homogeneización como la lisis celular son similares en los protocolos tradicionales y comerciales. Las particularidades del resto de las etapas se explican, a continuación, independientemente para cada uno de los protocolos.

1. PROTOCOLO TRADICIONAL

Separación de proteínas y lípidos

En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación (Figura 2.1A). Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos (Sambrook *et al.* 1989). La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación lo que permite aislar al ADN. Los solventes que se usan frecuentemente son el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico (Stulnig y Amberger 1994). Estos reactivos contaminan fácilmente el ADN, por lo que se debe evitar acarrearlos en el proceso de purificación.

Precipitación del ADN

Después de que son eliminados los lípidos y las proteínas, se recupera el ADN. Para ello, se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble (Figura 2.1B). Un paso de centrifugación permite que el ADN permanezca en el fondo del tubo mientras que el etanol es desechado. Los restos de etanol se eliminan con un lavado con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación.

Redisolución del ADN

Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es hidratar el ADN para mantenerlo en solución (Figura 2.1C). En el caso de emplear agua, el pH debe ser de 7 para permitir la redisolución completa del ADN y evitar una hidrólisis ácida (<http://www.massey.ac.nz/~wwbioch/DNA/hydDNA/framset.htm>, consultado en agosto del 2010). Cuando se utiliza una solución amortiguadora, es preferible utilizar una solución de Tris-HCl a 10mM y EDTA a 0.1M a un pH de 8.0 (low TE) para almacenar el material. Cuando se está disolviendo el ADN es importante evitar el pipeteo y la agitación agresiva pues se pueden fragmentar moléculas de alto peso molecular. Una opción que evita la frag-

mentación consiste en incubar a 55 °C el ADN, 1 a 2 horas con agitación suave. En el anexo 3 se explica paso a paso el protocolo tradicional CTAB.

2. PROTOCOLO COMERCIAL

Unión del ADN a la matriz inorgánica y lavado

En el caso del kit con membrana de sílice, en algunos casos a la mezcla de lisis se le añade la solución de unión que tiene un pH específico. Antes de pasar la solución de lisis a través de la columna, se adiciona etanol a la solución, eliminando la capa hidratante del ADN y exponiendo sus grupos fosfato, facilitando con ello la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente (Figura 2.2A). Los lípidos y proteínas no son afines a la membrana y se eliminan con ayuda de la solución de lavado y un ciclo de centrifugación, mientras que el material genético permanece unido a la matriz (2B).

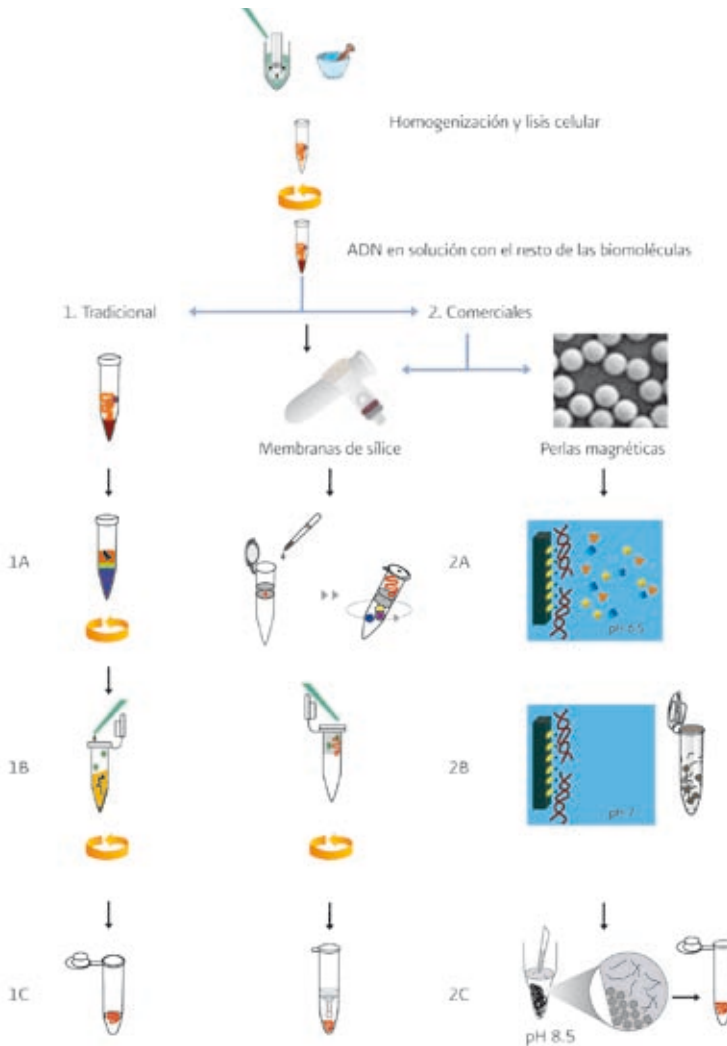
El kit con perlas magnéticas además de utilizar soluciones a pH específicos, utiliza un imán o magneto que atrae a las perlas para separarlas de las soluciones en las que se encuentran suspendidas. En este caso, se añade a la solución de lisis una solución amortiguadora a pH ácido que permite cargar positivamente a las perlas, favoreciendo la unión de ADN (Figura 2.2A). Las proteínas y lípidos tienen baja afinidad por las perlas y son eliminados con soluciones de lavado a pH fisiológico. Las perlas son retenidas en la pared del microtubo con el magneto, mientras que la solución con los contaminantes se eliminan por pipeteo (2B).

Recuperación del ADN de la matriz

En los kits es necesario liberar al ADN de la matriz,. La membrana y el ADN se deshidratan con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación, después se recomienda centrifugar nuevamente la columna para evaporar el etanol y eliminar el exceso de las soluciones. Posteriormente, se adiciona agua o solución amortiguadora al centro de la membrana, se espera a que el ADN se hidrate, se centrifuga para recuperarlo de la matriz y resuspenderlo (Figura 2.2C).

En el protocolo de perlas magnéticas se utiliza una solución básica de Tris-HCl 10 mM a pH 8.5 para neutralizar la carga de las perlas. El ADN se separa de las perlas y transfiere a otro tubo, mientras que las perlas continúan siendo retenidas por el magneto (Figura 2.2C).

Figura 2. Etapas de la extracción del ADN. La homogeneización y lisis celular son similares en ambos protocolos. Protocolo tradicional: separación de proteínas y lípidos con solventes orgánicos (1A); precipitación del ADN mediante etanol y sales (1B) y Redisolución del ADN (1C). 2. Protocolos comerciales (membrana de sílice y perlas magnéticas): unión del ADN a la matriz inorgánica (2A); separación de proteínas y lípidos mediante soluciones a pH básico (2B); recuperación del ADN de la matriz (2C). Las flechas circulares indican ciclos de centrifugación.



Modificado de Invitrogen 2005.

Es necesario saber que la mayoría de los kits tienden a ser generales a la hora de su aplicación, pero se diseñan con un propósito específico. Por ejemplo, un kit para extraer ADN de sangre total, considera la presencia de hemoglobina y eritrocitos durante el proceso. Este método será más agresivo en comparación con un kit diseñado para extraer ADN de células o tejidos animales. En los manuales proporcionados por el fabricante se detallan, además de los pasos a seguir en cada caso, la cantidad de muestra recomendada y el rendimiento esperado de acuerdo al tipo de tejido (Invitrogen 2005). Esta información debe tomarse en cuenta al momento de elegir un kit.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Cuantificación del ADN

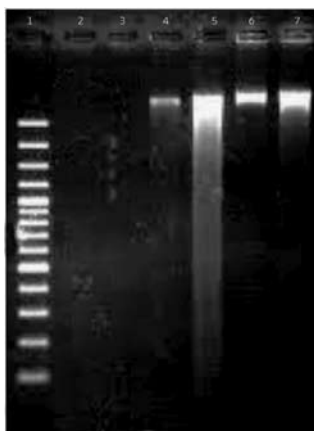
Una vez obtenido el material genético, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 ug/ml (Leninger 1975). Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/ul). En el caso de algunos equipos como el espectrofotómetro Nanodrop, no es necesario diluir la muestra y el equipo nos proporciona directamente la concentración en ng/ul. Considerando que para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng debemos obtener al menos, 5 ng/ul de ADN en cada muestra, si se recuperaron 50 ul, el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 ug. Concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas.

Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol.

Comprobación de la integridad del ADN por electroforesis

Además de conocer la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría, es importante conocer si el ADN obtenido está íntegro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa (ver capítulo de electroforesis). Si el ADN está íntegro, se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (Figura 3). El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas.

Figura 3. Gel de agarosa para visualizar la integridad del ADN. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 y 3 vacíos, carril 4 y 7 muestras con poca fragmentación, carril 5 muestra fragmentada, carril 6 muestra íntegra.



Almacenamiento del ADN

Una vez que el ADN ha sido purificado, cuantificado y analizado mediante electroforesis, una parte de la muestra se puede almacenar a 4 °C para los análisis inmediatos y el material restante a -20 °C o -80 °C, para una preservación por varios meses. En este último caso es conveniente que el ADN se conserve en

soluciones con baja concentración de sales (low TE) para inhibir la acción de DNAsas contaminantes.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN TRADICIONALES Y COMERCIALES

La obtención de ADN integro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular (Tang *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005). Una de las ventajas de utilizar métodos tradicionales es su bajo costo, así como un alto rendimiento. Sin embargo, en ocasiones el material obtenido está fragmentado. Estos métodos son susceptibles de contaminación, variación y errores por los múltiples pasos de manipulación (Störmer *et al.* 2007). El rendimiento de los kits depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, así como de la capacidad de unión de la membrana.

En los últimos años ha aumentado el uso de los métodos de extracción comerciales debido a que la matriz permite capturar selectivamente al ADN haciendo posible obtener un extracto de alta pureza con moléculas íntegras; al tiempo que se reduce el número de pasos en la extracción y se disminuye la posibilidad de contaminación con ADN o ARN exógeno (Tabla 3). Extractos con estas características aumentan la sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas moleculares, con lo que se garantiza la obtención de resultados confiables. Aunque se sacrifique el rendimiento en algunas ocasiones, las técnicas actuales de biología molecular no requieren de grandes cantidades de material genético. Independientemente del método de extracción que se utilice, lo importante es realizar cada paso con cuidado para obtener ADN integro y puro que permita llevar a cabo las técnicas posteriores.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos tradicionales y comerciales de extracción y purificación de ADN.

Condición	Métodos tradicionales	Métodos comerciales
Material inicial	Miligramos o gramos	De 50 a 250 mg como máximo
Uso de sustancias tóxicas	En la mayoría de los protocolos	Se evita utilizarlas
Tiempo de proceso	Hasta varios días debido a los numerosos pasos a desarrollar	Menor a 3 hrs.

Tabla 3. Continúa.

Condición	Métodos tradicionales	Métodos comerciales
Integridad (considerando tejido en buen estado de conservación)	Se requiere experiencia para evitar que el ADN se fragmente	Generalmente se obtienen moléculas de ADN de alto peso molecular
Rendimiento	Varios microgramos, aunque puede incluir moléculas de ADN fragmentadas	Varios nanogramos pero en su mayoría con moléculas de ADN integra
Inhibición enzimática	Los reactivos utilizados para la extracción fácilmente se acarrean con la muestra e interfieren con aplicaciones posteriores	Poco frecuente si se siguen los pasos y cantidades recomendadas por el fabricante
Automatización	Poco factible por los múltiples pasos y el uso de solventes corrosivos	Altamente recomendable
Costo	Bajo	Alto

PERSPECTIVAS

Uno de los objetivos principales de los métodos modernos de extracción es automatizar el proceso, mediante el uso de kits y extractores automáticos robotizados con la mínima intervención de operadores, que permitan mejorar la precisión, obtener resultados reproducibles y reducir el tiempo de extracción, en particular cuando se requiere procesar una gran cantidad de muestras. De esta manera se favorece que los investigadores se enfoquen en analizar e interpretar la gran cantidad de datos genómicos obtenidos (Tang *et al.* 2005, Störmer *et al.* 2007, Dundass *et al.* 2008).

La extracción de ADN íntegro y sin contaminantes es esencial para tener éxito en la obtención de datos genéticos, es el primer paso en la lista de técnicas moleculares que nos llevarán a comprender mejor y conservar la diversidad biológica a partir del conocimiento de genes y genomas que anteriormente era inaccesible para la ecología y la evolución.

BIBLIOGRAFÍA

- Aras S., A. Duran y G. Yenilmez. 2003. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis L.* Specimens. *Plant Molecular Biology* 21: 461a–461f.
- Avise J. C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, EE.UU.
- Blin N. y D. W. Stafford. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 3: 2303–2308.
- Boom R., C. J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen y N. J. Van Der. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495–503.
- Crespo A., O. Blanco, O. F. Cubero, M. C. Molina y P. Cubas. 1999. Técnicas y métodos para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones especiales para el análisis de los hongos liquenizados. *Botanica Complutensis* 23: 13–51.
- Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics* 10: 311–316.
- Doyle J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.
- Eulgen T., P. J. Rushton, E. Schmelzer, K. Hanlbrock y E. I. Somssich. 1999. Early nuclear events in plant defense: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *European Molecular Biology Organization* 18: 4689–4699.
- Eulgen T., P. G. Rushton, S. Robatzek y I. E. Somssich. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science Review* 5: 199–206.
- Fraga J., J. Rodríguez, O. Fuentes, M. Castex y A. Fernández-Calienes. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56: 208–13.
- Guinn G. 1966. Extraction of nucleic acids from lyophilized plant material. *Plant Physiology* 41: 689–695.
- Honore´-Bouakline S., J. P. Vincensini, V. Giacuzzo, P. H. Lagrange y J. L. Herrmann. 2003. Rapid diagnosis of extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and DNA extraction. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2323–2329.
- Hudson, M. E. 2008. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources* 8:3–17.

- Invitrogen. 2005. *Nucleic acid purification and quantification sourcebook*. Invitrogen Industries, EE.UU.
- Leninger A. L. 1975. *Biochemistry*. Worth Publishers, New York, EE.UU.
- Murray M. G. y W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4326.
- Nasón A. 1965. *Biología*. Ed. Limusa, México.
- Qiagen. 2005. BioSprint DNA Plant Handbook. www.qiagen.com/hb/biosprint-plantdnakit. Consultado en agosto de 2010.
- Robbins S. L. y R. S. Cotran. 2009. *Pathologic Basis of Disease*. Saunders, Philadelphia, EE.UU.
- Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers –just a matter of fashion? *Nature Reviews* 5: 63-69.
- Sepúlveda-Jiménez G., H. Porta-Ducoing y M. Rocha-Sosa. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 355-363.
- Shendure J. y Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1135-1145.
- Sinden R. R. 1994. *DNA Structure and Function*. Academic Press, EE.UU.
- Störmer M., K. Kleesiek y J. Dreier. 2007. High-Volume Extraction of Nucleic Acids by Magnetic Bead Technology for Ultrasensitive Detection of Bacteria in Blood Components. *Clinical Chemistry* 53: 104-110.
- Stulnig T. M. y A. Amberger. 1994. Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *BioTechniques* 16: 402-404.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:199-201
- Tang Y. W., S.E. Sefers, H. Li, D. J. Kohn y G.W. Procop. 2005. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 4830-4833.
- Tel-Zuri N., S. Abbo, D. Myslabodski y Y. Mizrahi. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology* 17: 249-254.
- Travaglini E. C. 1973. Methods for the extraction and purification of desoribonucleic acid from eukariote cells. En: D. M. Prescott (ed.). *Methods in cell biology*. Academic Press, EE.UU.

- Wagner D. B., G. R. Furnier, M. A. Saghay-Marooif, S. M. Williams, B. P. Dancik y R.W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84: 2097-2100.
- Wang F., Y. Zhu, Y. Huang, S. McAvoy, W. B. Johnson, T. H. Cheung, T.K.H. Chung, K.W. K. Lo, S.F. Yim, M.M.Y. Yu, H. Y. S. Ngan, Y.F. Wong y D.I. Smith. 2005. Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 24: 3875–3885.

ANEXO 1. PROTOCOLO TRADICIONAL CTAB (BROMURO DE CETIL TRIMETIL AMONIO)

Uno de los métodos que se utilizan para extraer ADN de plantas y alimentos derivados de vegetales utiliza CTAB que es la sustancia adecuada para procesar tejidos con una alta concentración de polisacáridos y polifenoles. Este protocolo fue desarrollado por Murray y Thompson en 1980 y publicado hasta 1987 por Wagner y sus colaboradores (Wagner *et al.* 1987). Se ha utilizado de manera efectiva en diversas especies de plantas (Doyle y Doyle 1987, Tel-Zuri *et al.* 1999, Aras *et al.* 2003) bacterias (Honore´-Bouakline *et al.* 2003), hongos, líquenes (Crespo *et al.* 1999) e insectos (Fraga *et al.* 2004). En la actualidad algunos laboratorios, que procesan un alto número de muestras, se sigue utilizando ya que permite obtener ADN de alta calidad eliminando los inhibidores que afectan la PCR; además de ser un método económico y fácil de estandarizar.

Miniextracción CTAB, partiendo de 100 mg de tejido

Equipo

- Baño de incubación o termoblock
- Microcentrífuga que pueda ser programada a 14,000 rpm
- Vortex
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Agitador termo-magnético
- Campana de extracción
- Ultracongelador
- Concentrador de vacío
- Espectrofotómetro
- Cámara de electroforesis

Material

- Termo o cuba para nitrógeno líquido
- Morteros y pistilos
- Espátulas
- Tijeras o bisturí
- Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml estériles

- Micropipetas de 2, 10, 200 y 1 000 uL
- Puntas para micropipeta de 10, 200 y 1 000 uL con filtro
- Gradilla para tubos de 1.5 o 2 ml
- Espátulas
- Guantes
- Hielo
- Termómetro
- Marcadores para etiquetar tubos
- Bata de laboratorio
- Toallas de papel
- Contenedores de desechos líquidos
- Contenedores de puntas utilizadas

Reactivos

- 2-β-Mercaptoethanol (CAS N° 60-24-2)
- Acetato de amonio (CAS N° 631-61-8)
- Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3)
- Ácido clorhídrico (CAS N° 7647-01-0)
- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- Agua destilada estéril libre de DNasas y RNasas
- Alcohol isoamílico (CAS N° 123-51-3)
- Cloroformo (CAS N° 67-66-3)
- Cloruro de sodio (CAS N° 7647-14-5)
- CTAB, Bromuro de hexadecil trimetil amonio (CAS N° 57-09-0)
- EDTA Ácido etileno diamino tetracético di sódico (CAS N° 6381-92-6)
- Etanol grado biología molecular (CAS N° 64-17-5)
- Fenol (CAS N° 108-95-2)
- Marcador de peso molecular de 1 Kb
- Nitrógeno líquido (CAS N° 7727-37-9)
- Proteinasa K (CAS N° 39450-01-6)
- RNAsa A (CAS N° 9001-99-4)
- TBE (Tris base, EDTA, ácido bórico)
- Tris base (CAS N° 77-86-1)
- Tris-Hidrochloride (CAS N° 1185-53-1)

Soluciones requeridas

Antes de empezar

Preparar con anticipación todas las soluciones que se utilizarán y mantenerlas a la temperatura solicitada.

Esterilizar morteros y pistilos, tubos para microcentrífuga y puntas para micropipetas.

Rotular los tubos y tener a la mano marcadores de punto fino indelebles.

En lo posible, utilice agua libre de DNasas y RNasas para preparar las soluciones.

Encender el o los termobaños para que se encuentren a la temperatura requerida.

Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8

Dentro de la campana de extracción, disolver en 65 ml de agua desionizada 0.605 g de Tris-HCl. Agregar HCl al 0.1 N, agitando constantemente hasta ajustar el pH a 8. Aforar a un volumen de 100 ml con agua desionizada. Mantener a temperatura ambiente.

Buffer de extracción CTAB 2X

1.4 M de NaCl (8.181 g) 20 mM de EDTA (0.744 g), 2 % P/V de CTAB (2 g).

Disolver lo anterior en 75 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8 en un agitador termomagnético hasta que las sustancias se disuelvan completamente. Agregar 300 μ l de 2- β -mercaptoetanol en la campana de extracción ya que este compuesto es muy volátil y tóxico. Finalmente, aforar a un volumen de 100 ml con la solución de Tris-HCl previamente utilizada. Mantener a temperatura ambiente y antes de iniciar el proceso caliente a 55 °C.

Solución Fenol: Cloroformo: isoamílico 25:24:1

Mezclar en la campana de extracción 50 ml de fenol, 48 ml de cloroformo y 2 ml de alcohol isoamílico. Mantener almacenado a -20°C.

Acetato de amonio 10 M

Disolver en 5 ml de agua desionizada, 7.71 g de acetato de amonio y aforar a 10 ml con agua desionizada. Mantener a temperatura ambiente.

Etanol al 70 %

Por cada 70 ml de etanol absoluto, agregar 30 ml de agua desionizada y mezclar. Mantener la solución a -20°C.

Método

Protocolo CTAB

1. Mezclar 100 mg de tejido previamente pulverizado con nitrógeno líquido con 1 ml de CTAB 2X, precalentado a 55 °C, en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Mezclar por inversión e incubar 5 min. a temperatura ambiente.
3. Incubar 5 min. en hielo.
4. Agregar 20 µl de RNasa A, mezclar por inversión e incubar por 20 min. a 37 °C. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces.
5. Agregar 10 µl de proteinasa K, mezclar por inversión e incubar a 60 °C por 20 min. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces.
6. Incubar 5 min en hielo.
7. Agregar 600 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y agitar por inversión.
8. Centrifugar a 10,000 rpm a 8 °C, por 12 min.
9. Recuperar con cuidado 200 µl del sobrenadante y ponerlo en un tubo para microcentrífuga nuevo de 1.5 ml. Nota: Si el sobrenadante se encuentra turbio, será necesario repetir los pasos del siete al nueve.
10. Agregar 50 µl de acetato de amonio 10 M y mezclar por inversión varias veces.
11. Agregar 500 µl de isopropanol frío (a -20 °C) y mezclar por inversión varias veces.
12. Mantener la mezcla a -20°C durante 2 hrs, para favorecer la precipitación de ADN.
13. Centrifugar a 10,500 rpm a 8 °C, por 5 min.

14. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
15. Agregar 1 ml de etanol al 70 % frío (a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).
16. Mezclar por inversión hasta observar que el botón se desprende del microtubo.
17. Dejar reposar 5 min. a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a 10,000 rpm a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 5 min.
19. Eliminar el sobrenadante cuidando no desprender el botón de ADN.
20. Colocar los tubos para microcentrífuga de 1.5 ml en el concentrador de vacío a 500 atm a 55°C por 10 min para secar el ADN. Si no se cuenta con un concentrador de vacío se pueden dejar los tubos abiertos hasta que se evapore el etanol; cubrirlos con una toalla de papel para que no se contaminen.
21. Revisar que el botón de ADN se encuentra completamente seco; en caso de no estarlo repetir el paso 20 durante el tiempo que sea necesario
22. Rehidratar el ADN en $200\text{ }\mu\text{l}$ de buffer TE 1X o agua inyectable. Si el botón de ADN es pequeño se puede hidratar con 50 o $100\text{ }\mu\text{l}$.

