

Trabajo Práctico

Extracción de ADN y condensación alcohólica.

B101

Biología General

INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

Muchas de las técnicas de biología molecular incluyen algún tipo de manipulación del material genético. Actualmente, podemos obtener suficiente ADN y de buena calidad de manera sencilla y en poco tiempo.

Algunas preguntas para pensar acerca del trabajo práctico:

- Una manera de purificar una molécula es deshacerse de todas las moléculas, excepto la de interés. Si queremos extraer ADN de una fruta como kiwi ¿de qué moléculas piensa que deberíamos deshacernos?
- ¿Qué sustancias son necesarias para lograr purificar ADN de acuerdo a sus propiedades químicas y la de las demás moléculas?

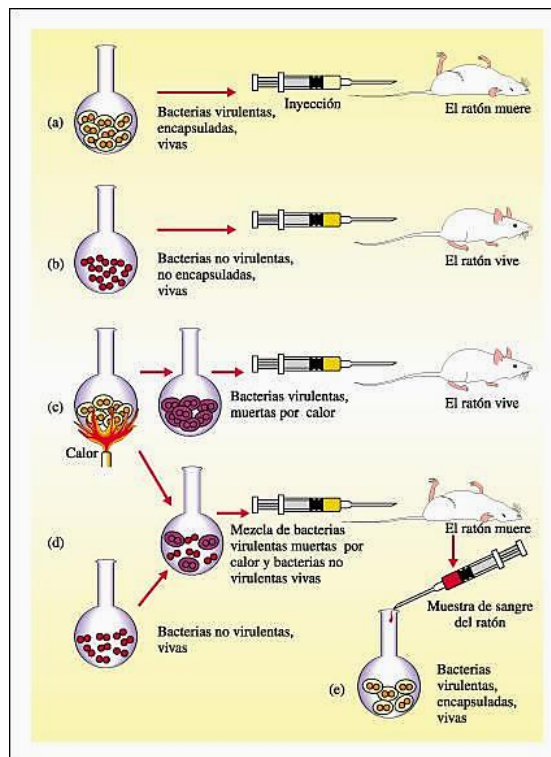
HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO DEL ADN

El ADN fue aislado por primera vez en 1869, por el médico suizo Friedrich Miescher. Este médico realizaba experimentos acerca de la composición química del pus de vendas quirúrgicas desechadas, cuando notó un precipitado de una sustancia desconocida la cual caracterizó químicamente más tarde y la llamó *nucleína*, debido a que la había extraído a partir de núcleos celulares. Se necesitaron casi 70 años de investigación para poder identificar los componentes y la estructura de los ácidos nucleicos.

En 1930 Levene y su maestro Albrecht Kossel probaron que la nucleína de Miescher era un **ácido desoxirribonucleico (ADN)** formado por **cuatro bases nitrogenadas, el azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato**, y que, en su estructura básica, el nucleótido está

compuesto por un azúcar unido a la base y al fosfato. Sin embargo, Levene pensaba que la cadena era corta y que las bases se repetían en un orden fijo.

La función biológica del ADN comenzó a dilucidarse en 1928, con una serie de experimentos realizados por Frederick Griffith, quien estaba trabajando con cepas "lisas" (S) o "rugosas" (R) de la bacteria *Pneumococcus* (causante de la neumonía). Cepas lisas o rugosas se refiere a la presencia (S) o no (R) de una cápsula azucarada, que es la que confiere virulencia. La inyección de neumococos S vivos en ratones produce la muerte de éstos. Por otro lado, cuando Griffith inyectaba ratones con neumococos R vivos o con neumococos S muertos por calor, los ratones no morían. Sin embargo, si inyectaba a la vez neumococos R vivos y neumococos S muertos, los ratones morían, y en su sangre se podían aislar neumococos S vivos. Como las bacterias muertas no pudieron haberse multiplicado dentro del ratón, Griffith razonó que debía producirse algún tipo de cambio o transformación de un tipo bacteriano a otro por medio de una transferencia de alguna sustancia activa, que denominó *principio transformante*. Esta sustancia proporcionaba la capacidad a los neumococos R de producir una cápsula azucarada y transformarse así en virulentas.



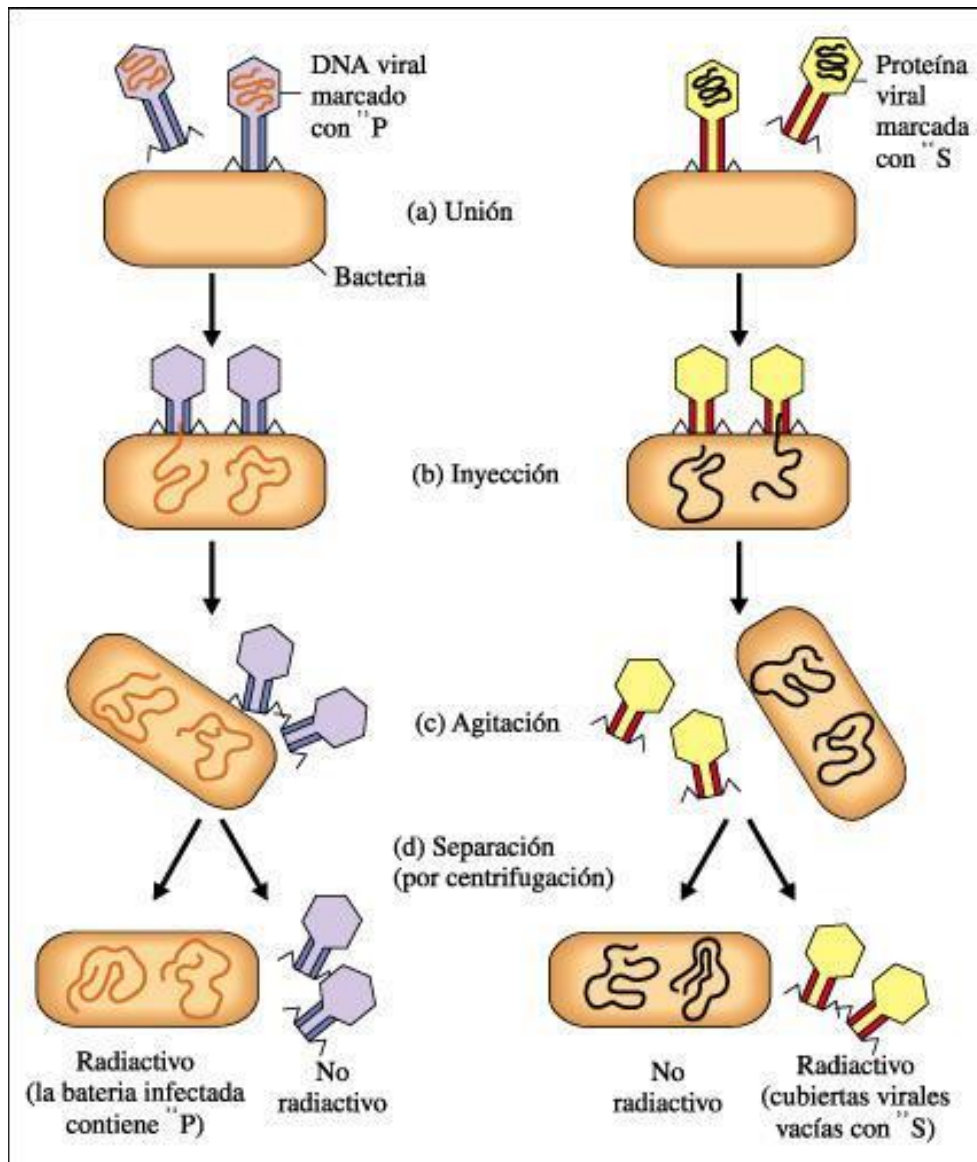
La búsqueda del «factor transformante» que era capaz de hacer virulentas a cepas que inicialmente no lo eran continuó hasta 1944, año en el cual Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty extrajeron la fracción activa (el factor transformante) y, mediante análisis químicos, enzimáticos y serológicos, observaron que no contenía proteínas, ni lípidos, ni polisacáridos activos, sino que estaba constituido principalmente por "una forma viscosa de ácido desoxirribonucleico altamente polimerizado", es decir, ADN.

Finalmente, el papel exclusivo del ADN en la heredabilidad fue confirmado en 1952 mediante los experimentos de Alfred Hershey y Martha Chase, en los cuales comprobaron que el fago T2 (virus que infecta bacterias) transmitía su información genética en su ADN, y no en su proteína.

El fago consiste únicamente de una cubierta proteica o cápside que encierra su material genético. En el proceso de infección, el fago se adhiere a la membrana externa de la bacteria para inyectar su material genético, y deja acoplada su cápside. Como consecuencia, el sistema genético de la bacteria reproduce el virus.

En un primer experimento, estos científicos marcaron el ADN de los fagos con el isótopo radiactivo fósforo-32 (P-32). El ADN contiene fósforo, a diferencia de los 20 aminoácidos que forman las proteínas. Dejaron que los fagos del cultivo infectaran a las bacterias *Escherichia coli* y posteriormente retiraron las cubiertas proteicas de las células infectadas mediante una licuadora y una centrífuga. Hallaron que el indicador radiactivo era visible sólo en las células bacterianas, y no en las cubiertas proteicas. En un segundo experimento, marcaron otro grupo de fagos con el isótopo azufre-35 (S-35). Los aminoácidos cisteína y metionina contienen azufre, mientras que el azufre no está presente en la molécula de ADN. Tras la separación, se halló que el indicador estaba en las cubiertas proteicas, pero no en las bacterias infectadas, de esta manera se confirmó que es el material genético lo que ingresa a las bacterias.

Así, Hershey y Chase encontraron que el S-35 quedaba fuera de la célula, mientras que el P-32 se lo encontraba en el interior, indicando que el ADN era el soporte físico del material hereditario.



Curtis H & Barnes NS (2001) *Biología*. (6ª edición). Ed. Médica Panamericana

En cuanto a la caracterización química de la molécula, en 1940 Chargaff realizó algunos experimentos que le sirvieron para establecer las proporciones de las bases nitrogenadas en el ADN. Descubrió que las proporciones de purinas eran idénticas a las de pirimidinas, esto es llamado "equimolecularidad" de las bases ($[A]=[T]$, $[G]=[C]$). La cantidad de G+C en una determinada molécula de ADN no siempre es igual a la cantidad de A+T, esta puede variar desde el 36 hasta el 70 por ciento del contenido total. Con toda esta información y junto con los datos de difracción de rayos X proporcionados por Rosalind Franklin, James

Watson y Francis Crick propusieron en 1953 el modelo de la doble hélice de ADN para representar la estructura tridimensional del polímero.

ESTRUCTURA DEL ADN.

Cada molécula de ADN está formada por dos polímeros extremadamente largos sostenidos entre sí por enlaces puente de hidrógeno y enrollados en lo que se conoce como doble hélice. Cada uno de los dos polímeros está formado por numerosas subunidades llamadas nucleótidos, enlazadas covalentemente formando las cadenas. Cada nucleótido está compuesto por tres partes: un compuesto de fósforo llamado fosfato, un azúcar de 5 carbonos simples (la desoxirribosa) y una base nitrogenada (puede ser adenina→A, timina→T, citosina→C o guanina→G). Debido a la estructura química que presentan, la Adenina presente en una cadena siempre se aparea con Timina; y Citocina con Guanina. Adenina se une a Timina mediante 2 puentes de hidrógeno, y Citocina se une a Guanina mediante 3 puentes de hidrógeno. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena (el ordenamiento de los cuatro tipos de nucleótidos) es lo que codifica la información genética.

Las secuencias de ADN que constituyen la unidad fundamental, física y funcional de la herencia se denominan genes. Cada gen contiene un promotor que es una región de ADN que controla la iniciación de la transcripción o sea, promueve la transcripción de un **gen**: ADN→ARN. La información contenida en los genes se emplea para generar ARN (transcripción) y proteínas (traducción). Dentro de las células, el ADN está organizado en estructuras llamadas cromosomas que, durante el ciclo celular, se duplican antes de que la célula se divida. Los organismos eucariotas almacenan la mayor parte de su ADN dentro del núcleo celular y una mínima parte en mitocondrias, y en los plastos en caso de tenerlos. Los organismos procariotas (bacterias y arqueas) lo almacenan en el citoplasma de la célula, y, por último, los virus ADN lo hacen en el interior de su cápside de naturaleza proteica. Existen multitud de proteínas que se unen al ADN, como por ejemplo las histonas y los factores de transcripción, dotándolo de una estructura tridimensional determinada o regulando su expresión, respectivamente. El material genético completo de una dotación cromosómica se denomina genoma y, con pequeñas variaciones, es característico de cada especie.

FUNDAMENTO DEL PRÁCTICO

La extracción de ADN desde una célula requiere una serie de etapas básicas. En primer lugar se debe romper la pared celular (en caso de que la presenten), luego la membrana plasmática, para finalmente acceder al núcleo celular. A continuación, también se debe fragmentar la membrana nuclear para liberar al ADN, protegerlo de enzimas que puedan degradarlo, y aislarlo por precipitación en alcohol.

En nuestro trabajo práctico de laboratorio, la extracción de ADN comenzará por lisar mecánicamente la pared de las células vegetales mediante el uso de una licuadora, posteriormente se agregará un detergente que romperá a la membrana celular y nuclear, liberando el contenido molecular hacia el agua, en ese momento, el agua tendrá disuelto ADN y todo un surtido de restos moleculares tales como: ARN, carbohidratos, proteínas y otras sustancias en menor proporción. El agregado de los iones salinos (NaCl) será atraído por las cargas negativas del ADN, permitiendo una mejor disolución de esta macromolécula. Las proteínas asociadas al ADN, como también aquellas que puedan degradarlo serán destruidas por proteasas presentes en el jugo de kiwi. Sólo queda extraer el ADN de esa mezcla acuosa para lo cual se utilizará alcohol.

Actividad de Laboratorio

Parte Práctica:

Objetivo

Extraer ADN a partir vegetales.

Materiales

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Hojas de acelga | <input type="checkbox"/> Sal |
| <input type="checkbox"/> Agua fría | <input type="checkbox"/> Detergente líquido |
| <input type="checkbox"/> Licuadora | <input type="checkbox"/> Jugo de kiwi o ananá |
| <input type="checkbox"/> Vaso de precipitado | <input type="checkbox"/> 2 tubos de ensayo |
| <input type="checkbox"/> Cuchara | <input type="checkbox"/> Colador |
| <input type="checkbox"/> Alcohol | |

Protocolo

- 1) Se coloca medio vaso de hojas de acelga fresca, un vaso de agua fría y una pizca de sal en la licuadora.
- 2) Licuar 15 segundos a máxima velocidad.
- 3) Colar y pasar el contenido de la jarra a un vaso limpio.
- 4) Agregar 2 cucharadas de detergente, mezclar bien sin hacer espuma y dejar reposar 10 minutos.
- 5) Colocar 1-2 ml de mezcla en cada tubo de ensayo.
- 6) Agregar unas gotas de jugo de kiwi o ananá en uno de los tubos y mezclar bien pero sin hacer espuma. Dejar reposar 2 minutos.

7) Inclinar el tubo y agregar un volumen de alcohol lentamente por el borde hasta que se vea una capa sobre la mezcla.

8) Dejar reposar unos minutos hasta que el ADN se visualice en la interfase.

Nota: Pensar que controles pueden realizarse.

Glosario

- **Bacteriófagos o fagos:** Virus que infecta a bacterias. Son empleados por los ingenieros genéticos para introducir genes en células bacterianas.
- **Clon:** Copia genéticamente idéntica de un gen, una célula o un organismo.
- **Cromatina:** Es el conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas que se encuentran en el núcleo de las células eucariotas y que constituye el cromosoma eucariótico.
- **Cromosoma:** Cada uno de los pequeños cuerpos en forma de bastoncillos en que se organiza la cromatina del núcleo celular durante las divisiones celulares (mitosis y meiosis).
- **Código genético:** Conjunto de tripletes o codones que codifican a los distintos aminoácidos que forman las proteínas. Existen 64 tripletes o codones para codificar los veinte aminoácidos, por lo que un aminoácido está codificado en la mayoría de los casos por varios tripletes o codones, por eso decimos que el código genético es un código degenerado.
- **Factor de transcripción:** es una proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN, pero que no forma parte de la ARN polimerasa.
- **Gen:** Unidad física de la herencia, formada por una secuencia de nucleótidos en una determinada localización de un cromosoma específico. Puede definirse también como un fragmento de ADN que lleva la información para la síntesis de una proteína (o enzima).
- **Genoma:** Todos los genes incluidos en un conjunto completo de cromosomas.
- **Histonas:** Proteínas básicas de baja masa molecular muy conservadas evolutivamente entre los eucariotas y en algunos procariotas. Las histonas unidas al ADN forman la cromatina.
- **Isótopos:** Diferentes tipos de átomos de un mismo elemento cuyos núcleos difieren en su número de neutrones.
- **Radioisótopo:** isótopo de algún elemento capaz de emitir radioactividad.
- **Radiactividad:** fenómeno físico natural, por el cual algunos cuerpos o elementos químicos llamados radiactivos, emiten radiaciones que tienen la propiedad de impresionar placas fotográficas, ionizar gases, producir fluorescencia, atravesar cuerpos opacos a la luz ordinaria, etc.
- **Virulencia:** Grado de patogenia (capacidad de un microorganismo) para producir una enfermedad y su poder de multiplicación en el organismo afectado.

Bibliografía

- CAMPBELL N, “Biología”, Séptima edición. Editorial Panamericana. Madrid, España, 2007.
- CURTIS H, BARNES S, “Biología” Séptima edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires, 2008.
- *es.wikipedia.org*