

# Trabajo Práctico de Laboratorio

## GENETICA

Lugar: FCEN, Laboratorio Boccalandro

TP n°1: Extracción y purificación de ADN a partir de sangre periférica.

### Introducción

Prácticamente todas las células del cuerpo humano (y la de todos los organismos vivos) poseen al menos una copia del genoma completo de un individuo. Por esto mismo, es posible obtener ADN a partir de muestras de tejido de cualquier tipo. Cuando se desea obtener ADN de una persona, es necesario que el método sea rápido, que asegure una buena calidad de la muestra y que no sea invasivo. En el caso, por ejemplo, de la ciencia forense es común utilizar cabello con el bulbo piloso incluido, y muestras de saliva (que contienen células epiteliales del interior de la mejilla). Otra fuente de ADN fácil de conseguir, rápida y no invasiva es sangre. La sangre se compone de varios tipos celulares. Los más importantes son los glóbulos rojos (transporte de oxígeno) y glóbulos blancos (sistema inmune). Los primeros carecen de núcleo, por lo tanto, el aislamiento de ADN genómico de sangre entera se realiza a partir de los glóbulos blancos o linfocitos. La gran mayoría de protocolos disponibles para extracción de ADN consisten en los mismos pasos:

- Lisis celular (se utilizan detergentes que rompen las membranas celulares)
- Purificación de ADN (se utilizan solventes orgánicos que separan los ácidos nucleicos de los lípidos y proteínas)
- Aislamiento del ADN (se utilizan sales que actúan como quelante y precipitan el ADN, también se utiliza etanol 100%).

En el presente trabajo práctico llevaremos a cabo una extracción de ADN de muestras de sangre de los alumnos.

### **Protocolo de Extracción de ADN.**

#### **Día 0: Extracción de sangre a alumnos voluntarios**

En este paso se realizará la extracción de 3ml de sangre periférica. A los 3ml de sangre se agregará 100ul de EDTA 0,5M (Agente anticoagulante), y se guardará la muestra a -20° C durante toda la noche (este procedimiento favorece la lisis celular y el aislamiento de linfocitos).

### **Día 1: Extracción de ADN**

- 1) Encender el baño termostático y ajustarlo a 60°C (revisar nivel de agua).
- 2) Rotular un tubo Falcon con el código correspondiente a la muestra.
- 3) A 3ml de sangre (congelada) agregar 3ml de Buffer T<sub>10</sub>E<sub>10</sub>. Agitar SUAVEMENTE por inversión durante 5 minutos (esto es volumen ideal de extracción, para volúmenes diferente, respetar la proporción 1:1)
- 4) Centrifugar durante 10 minutos a 5000 rpm. Eliminar suavemente el sobrenadante.
- 5) Repetir los pasos 3-4 hasta limpiar el pellet (debe quedar casi blanco).
- 6) Agregar 3ml de solución CTAB 2%
- 7) Agitar ENERGIAMENTE durante 5 minutos.
- 8) Incubar durante 1 hora a 60°C. Retirar la muestra cada 20 minutos y agitar en Vortex 1 minuto cada vez.

### **Purificación de ADN**

Notas:

- Hay que verificar que el pellet esté completamente disuelto.
- El Cloroformo disuelve el látex. Precaución con los guantes

Materiales:

- Tubo Falcon de 15 ml
- Solución de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1)
- Tips azules
- Pipeta P1000 (eppendorf)
- Pipeta Pasteur

Procedimiento:

- 1) Agregar a la solución de CTAB 2%, 3 ml de Cloroformo: Isoamílico. Agitar por inversión durante 5 minutos.
- 2) Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos.

- 3) Con la p1000 retirar la fase acuosa (superior) con cuidado de no arrastrar la interfase (proteínas) contaminante, y traspasarla a un tubo Falcon limpio

### **Precipitación de ADN**

Materiales:

- Tubo eppendorf de 1,5 ml.
- Etanol absoluto frío
- Tips amarillos
- Pipeta P100 (eppendorf)
- T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>

Procedimiento:

- 1) Agregar a la fase acuosa obtenida previamente (3 ml aprox.), 3 volúmenes de Etanol 100% frío (4° C).
- 2) Agitar suavemente por inversión durante 5 minutos.

### **Preparación de soluciones**

Buffer T<sub>10</sub>E<sub>10</sub>

10 mM de TrisCl

10 mM de EDTA

Para 100 ml de solución:

10 ml de TrisCl 100mM pH 8

20 ml de EDTA 50 mM pH 8 (2 ml de EDTA 500 mM)

Solución de CTAB 2%

(NaCl 1,4 M; EDTA (di sódico) 20mM; Tris 100 mM; beta-mercaptoetanol 0,2% y CTAB 2%)