

AISLAMIENTO DE ADN

OBJETIVOS

- Aislar e identificar DNA de diversas muestras
- Comprender la actuación de las sustancias empleados para la obtención de DNA
- Diferenciar el DNA de otros componentes celulares mediante una reacción de coloración.
- Comparar los resultados obtenidos en los diferentes tipos de muestras

FUNDAMENTO TEÓRICO-PRÁCTICO

El ADN (Ácido Desoxirribonucleico), conocido también como la molécula de la vida o la molécula de la herencia, es la molécula que contiene toda la información (genes) necesaria para que se desarrolle un ser vivo y para que funcione como tal. Pero el ADN no es un mero almacén de información, sino que también, y gracias al proceso de replicación, es capaz de transmitirla de una generación a la siguiente en el proceso de la división celular.

Fue aislado por primera vez en el invierno de 1869 por Johann Friedrich Miescher, médico suizo que estudiaba la composición química de los glóbulos blancos que obtenía del pus de vendajes quirúrgicos.

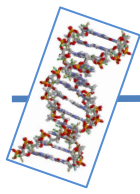


Friedrich Miescher

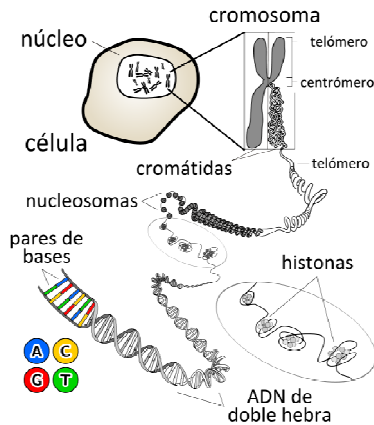
Leucocito Polimorfonuclear
Neutrófilo

En uno de sus experimentos, al utilizar los núcleos aislados de los leucocitos, aisló un precipitado con propiedades que no correspondían a sustancias lipídicas y que no era destruido por proteasas (enzimas que degradan las proteínas). Esto le indujo a pensar que se trataba de otro tipo de sustancia, de composición desconocida hasta la fecha, y la llamó nucleína. Posteriormente, demostró que la nucleína tenía carácter ácido y aisló la misma sustancia en otras células y en espermatozoides de salmón. Esta nucleína aislada corresponde al ADN y a las proteínas histónicas sobre las que se enrolla.

Fueron necesarios 70 años más para que se dilucidara la composición química exacta y la estructura del ADN.



"Investigando los genes"

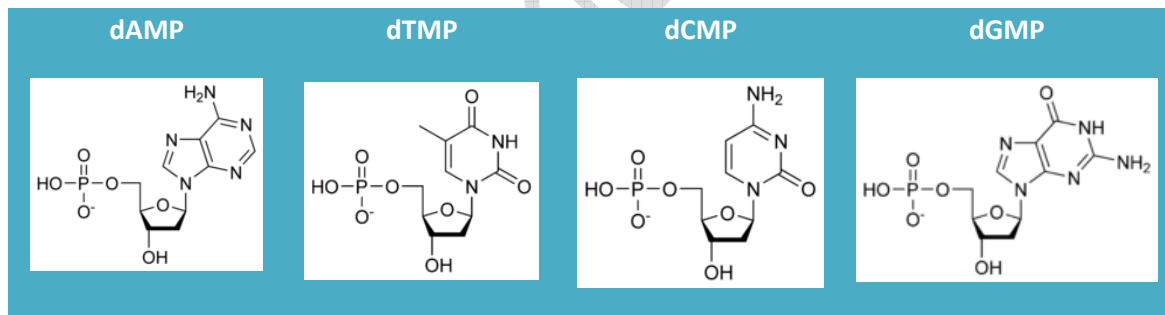
¿Dónde se encuentra el ADN en los seres vivos?

El ADN se encuentra en las células. En el caso de las células procariontas, como las bacterias, está en el citoplasma en forma de molécula circular. En las células eucariotas podemos diferenciar dos tipos de ADN según su localización: el ADN del núcleo formado por varias moléculas lineales (dependiendo de la especie), y el ADN mitocondrial, formado por algunos miles de copias de ADN circular.

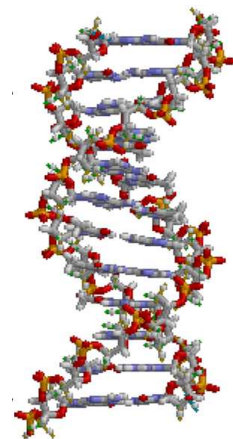
Composición química

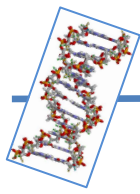
Desde el punto de vista químico, el ADN es un polinucleótido, es decir, un polímero de unidades llamadas nucleótidos que se unen las unas a las otras mediante un enlace químico fosfodiéster llamado enlace nucleotídico. Cada nucleótido está formado por una molécula de ácido fosfórico, una base nitrogenada (A, T, C y G) y la pentosa desoxirribosa. Las siguientes imágenes muestran los cuatro nucleótidos que componen el ADN.

Los grupos fosfatos en disolución, que es como se encuentran en la célula, presentan carga negativa, por lo que el ADN es una molécula con carga negativa.

**Estructura**

La estructura secundaria del ADN fue propuesta en 1952 por Watson y Crick basándose en estudios previos realizados por otros científicos como Erwin Chargaff, Maurice Wilkins y Rosalind Franklin. El modelo propuesto recibe el nombre de doble hélice de ADN. Lo forman dos cadenas de polinucleótidos antiparalelas y complementarias. Las bases nitrogenadas están situadas hacia el interior de la doble hélice, enfrentadas y unidas por puentes de hidrógeno y con los grupos fosfatos hacia el exterior, lo que confiere a la molécula carga negativa. La doble hélice tiene un diámetro de 2nm.





"Investigando los genes"

Ahora vamos a proceder a la extracción de ADN de diversas muestras.

Antes de comenzar debemos:

- Conectar el baño maría a 60°C.
- Preparar 50 ml de la disolución de ablandador de carne (proteasa) al 1%.
- Pesar 3 gr de NaCl en el vidrio de reloj (para cebolla y guisantes).
- Pesar 6 gr de NaCl o sal de mesa para las huevas de lumpo.



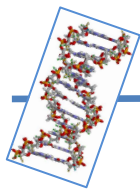
Cebolla

MATERIALES Y EQUIPO

150 g Cebolla (parte más interna)	2 vasos de precipitado (250 cm ³)
Detergente líquido lavavajillas (no concentrado)	Reloj
3 g NaCl	Tubos de ensayo
Agua destilada	Gradilla
2-3 gotas de ablandador de carne al 1%	Probeta graduada
Etanol a temperatura de un congelador	Varilla de vidrio o de madera
Cuchillo y tabla para cortar	Balanza electrónica
Filtros para café	Embudo
Batidora	Vidrio de reloj
Cuentagotas	Agitador de vidrio
Baño maría a 60°C	Guantes desechables
Espátula	Tubo eppendorf
Baño de agua helada	

PROCEDIMIENTO

1. Lee todo el proceso de obtención de ADN antes de comenzar.
2. No sobrepases ninguno de los tiempos señalados.
3. Coge uno de los vasos de precipitado, añade 3 gr de sal y 10 cm³ de detergente lavavajillas, y completa hasta 100 cm³ con agua destilada.
4. Corta la parte interna de la cebolla en trozos pequeños (aproximadamente de 1 cm²).
5. Pon la cebolla troceada en el vaso de precipitados con la sal y el detergente y remueve.
6. Coloca el vaso de precipitado en el baño maría a 60 °C durante exactamente 15 minutos. Remueve de vez en cuando.



"Investigando los genes"

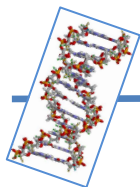
7. Enfría la mezcla en un baño de hielo durante 5 minutos removiendo con frecuencia.
8. Pon la mezcla en la batidora y bate durante 3 segundos. La mezcla debe quedar opaca. Si al final el ADN no se ve como delgadas hebras, es porque se ha roto excesivamente durante este proceso.
9. Filtra la mezcla, utilizando los filtros para café, en el otro vaso de precipitados. Asegúrate de que la espuma flotante no cae en el filtro.
10. Con una pipeta y aspirador, pasa 10 cm³ de este filtrado a un tubo de ensayo.
11. Añade 2 o 3 gotas de la solución de proteasa (ablandador de carne).
12. Agita muy suavemente para mezclar.
13. Deja caer lentamente 10 cm³ de etanol, recién sacado del congelador, por las paredes del tubo de ensayo inclinando éste para formar una capa encima del filtrado. Deja reposar el tubo de ensayo en la gradilla durante unos minutos sin moverlo.
14. Observa los cambios que se producen en la interfase alcohol-filtrado.
15. Introduce la varilla de vidrio o la de madera en el tubo de ensayo atravesando la capa de alcohol, extrae el DNA del alcohol moviendo la varilla hacia delante y hacia atrás.
16. Pon el ADN extraído en un tubo eppendorf con un poco de alcohol.



Huevas de lumpo (*Cyclopterus lumpus*) y capelán (*Mallotus villosus*)

MATERIALES Y EQUIPO

20 o 30 gr de huevas de lumpo y capelán (mejor anaranjado)	Mortero
Detergente lavavajillas	Tubo de ensayo
6 g de NaCl o sal de mesa	Filtro de café
2 ml de etanol	Cuentagotas o pipetas Pasteur desechables
3-4 gotas de proteasa (ablandador de carne)	Pipeta Pasteur con gancho (se hace calentando a la llama)
2 vasos de precipitado (250 cm ³)	Tubo eppendorf
Embudo	Balanza electrónica
Varilla de vidrio	



"Investigando los genes"

PROCEDIMIENTO

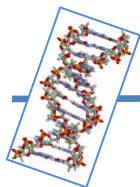
1. Lee todo el proceso de obtención del ADN y resuelve, antes de comenzar, las dudas que te puedan surgir.
2. Prepara en un vaso de precipitado una solución de lavavajillas poniendo 15 cm³ de Fairy y completa con agua destilada hasta 100 cm³.
3. Añade la sal y el caviar al mortero y aplasta enérgicamente los huevos con la mano del mortero (ya que se deben romper las cubiertas del huevo).
4. Cubre totalmente los huevos añadiendo la solución de detergente lavavajillas al mortero.
5. Coloca el vaso de precipitado en el baño maría a 60 °C durante exactamente 15 minutos. Remueve de vez en cuando.
6. Enfría la mezcla en un baño de hielo durante 5 minutos removiendo con frecuencia.
7. Añade 3 o 4 gotas de ablandador de carne y agita vigorosamente con la mano del mortero.
8. Filtra la mezcla al otro vaso de precipitado utilizando el filtro de café.
9. Con la jeringa, pasa 10 cm³ de este filtrado a un tubo de ensayo.
10. Deja caer lentamente 2 ml de etanol, recién sacado del congelador, por las paredes del tubo de ensayo inclinando éste para formar una capa encima del filtrado, o bien deposítalo en el fondo del tubo con una pipeta Pasteur desechable.
11. Deja reposar el tubo de ensayo en la gradilla durante unos minutos.
12. Observa los cambios que se producen en la interfase alcohol-filtrado. El ADN precipitará en forma de largos hilos.
13. Recoge el ADN con la pipeta Pasteur con gancho.
14. Deposítalo en el tubo eppendorf.



Guisantes

MATERIALES Y EQUIPO

50 gr de guisantes sin la cubierta de la semilla.	2 vasos de precipitado
10 cm ³ de detergente lavavajillas	2-3 gotas de proteasa
3 gr de NaCl o sal de mesa	Filtro de café
90 cm ³ de agua destilada	Baño de hielo
10 cm ³ de etanol muy frío	Cuentagotas o pipeta Pasteur desechables
Tubo de ensayo	Mortero
Embudo grande	Baño maría a 60°C
Varilla de vidrio	



"Investigando los genes"

PROCEDIMIENTO

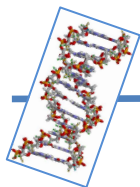
1. Lee todo el proceso de obtención de ADN y resuelve, antes de comenzar, todas las dudas que te puedan surgir.
2. Disuelve los 3 g de NaCl en uno de los vasos de precipitado con 90 cm³ de agua destilada.
3. Añade los 10 cm³ de detergente y vuelve a remover suavemente.
4. En el mortero, pon los guisantes (pueden ser congelados, pero los tienes que descongelar previamente) y aplástalos con la mano del mortero.
5. Añade los guisantes al vaso de precipitados con la sal y el detergente, y ponlo al baño maría a 60°C durante 15 minutos. Remueve de vez en cuando.
6. Pon el vaso de precipitados en el baño de hielo durante 5 minutos y remueve con frecuencia.
7. Pon la mezcla en la batidora y acciónala durante un máximo de 5 segundos.
8. Filtra la mezcla obtenida en el otro vaso de precipitados utilizando el embudo y el papel de filtro para el café. Asegúrate de que la espuma flotante no cae en el filtro.
9. Pon 10 cm³ del filtrado en un tubo de ensayo y agrega 2 o 3 gotas de proteasa. Agita suavemente el tubo de ensayo para mezclar.
10. Deja caer lentamente 10 cm³ de etanol, recién sacado del congelador, por las paredes del tubo de ensayo inclinando éste para formar una capa encima del filtrado.
11. Deja reposar la mezcla durante unos minutos. El ADN precipitará en el alcohol en forma de largos hilos.
12. Recoge el ADN con la pipeta Pasteur con gancho.
13. Deposítalo en el tubo eppendorf.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Resuelve las siguientes cuestiones:

- 1.- Teniendo en cuenta que el método de obtención es casi el mismo para todas las muestras utilizadas, explica con cuál de ellas se obtienen mejores resultados en cuanto a cantidad y aspecto del ADN.

Respuesta



"Investigando los genes"

2.- ¿Por qué es necesario triturar la muestra?

Respuesta

3.- ¿Para qué calentamos a 60°C?

Respuesta

4.- ¿Por qué enfriamos después la mezcla rápidamente?

Respuesta

5.- Explica para qué añadimos las siguientes sustancias:

NaCl

Detergente

Ablandador de carne

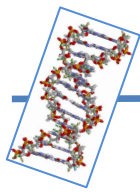
Alcohol

6.- ¿Es solo ADN lo que hemos obtenido?

Respuesta

7.- ¿Cómo podríamos determinar que lo que hemos obtenido es ácido nucleico?

Respuesta



"Investigando los genes"

Fuentes

BIOLOGY. Leaving Certificate Ordinary Level and Higher Level. SUPPORT MATERIALS. Laboratory Handbook for Teachers.

National Council for Curriculum and Assessment and Department of Education and Science
2003 Government of Ireland

Dahm, Ralf (2008), «[Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research.](#)», *Human Genetics* **122**(6): 565–81, Ene 2008, [doi:10.1007/s00439-007-0433-0](#), [PMID:17901982](#)

Meyer Friedman y Gerald W. Friedland. **Los diez mayores descubrimientos de la medicina.**1999. Paidós

<http://www.dnaftb.org/15/bio.html>

<http://learn.genetics.utah.edu/es/units/activities/extraction/>

http://www.bioscience-explained.org/ENvol1_1/pdf/CaviarEN.pdf

<http://www.scienceinschool.org/print/2298>

<http://www.britishcouncil.org/dna-darwin-not-aware-teacher.pdf>

<http://www.ncbe.reading.ac.uk>