

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	1 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

1. **Título: Extracción de DNA humano**
2. **Objetivo:** Estudiar y aplicar los principios básicos necesarios para la extracción y purificación de DNA a partir de leucocitos humanos.

3. Marco teórico

En los cursos teóricos, los estudiantes discuten los conceptos de gen, su substrato material, características biológicas, biofísicas y bioquímicas. Con base en los grandes desarrollos realizados por la Biología Molecular y su repercusión en el nuevo enfoque que ha generado en áreas como la Medicina, obliga a los profesionales en esta área a entender los procesos a este nivel para su adecuada interpretación y manejo. Adicionalmente, los avances han revolucionado las tecnologías de estudio y diagnóstico preventivo y curativo de las enfermedades. Con base en lo anterior, se hace necesario reforzar el trabajo de docencia teórico, aplicando algunas propiedades tanto químicas como físicas, en este caso de los ácidos nucleicos, para lograr una mejor conceptualización.

Dentro de algunos conceptos que pueden ser reforzados mediante la realización de este laboratorio, tenemos:

- El hecho de que el DNA se encuentra localizado en el núcleo de las células eucarióticas y por lo tanto solo puede ser obtenido de células nucleadas.

- Las células de un organismo eucariótico multicelular no presentan diferencias de tamaño ni secuencia de su DNA, las diferencias se presentan es a nivel de expresión genética, por lo tanto, si se quiere conocer o estudiar el DNA de un individuo lo podemos hacer a partir de cualquiera de sus células nucleadas.

- La sangre tiene un componente particulado compuesto por células, en su mayoría son eritrocitos, los cuales durante su desarrollo pierden el núcleo. Además de los eritrocitos en la sangre tenemos glóbulos blancos, células con núcleo y que por lo tanto nos pueden servir para obtener DNA.

- Debido a la expresión genética diferencial en los diferentes tipos de células, estas presentan diferencias en su estructura, propiedades biológicas y propiedades físicas y químicas, con base en esto, se sabe que las células sanguíneas presentan diferencias de densidad y características de membrana y que estas diferencias se pueden utilizar para separarlas mediante técnicas de centrifugación y hacer lisis diferencial de dichas células.

- Conocer la naturaleza química y tipo de interacciones entre los componentes de las macromoléculas que constituyen las células permite la aplicación de técnicas para su separación.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	2 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

La materia presenta diferencias en densidad. Utilizando técnicas como la centrifugación podemos aprovechar las diferencias en densidad y separar componentes. En la sangre podemos separar los componentes particulados (células) del no particulado (plasma). Adicionalmente, por diferencias en densidad podemos separar los glóbulos rojos de los blancos.

Teniendo los glóbulos blancos medianamente separados de los rojos se aprovecha las diferencias en los componentes de la membrana y capacidad entre estas células. Por dicha diferencia, los glóbulos rojos son más sensibles a un ambiente hipotónico. Al colocar los glóbulos blancos y rojos en una solución hipotónica, los segundos se lisan mientras los primeros permanecen intactos.

Una vez se tienen los glóbulos blancos completamente purificados de los rojos, se procede a separar las diferentes macromoléculas de estas células. Se utilizan las diferencias de polaridad. Por la presencia de grupos fosfato los ácidos nucleicos son altamente polares y por lo tanto solubles en soluciones acuosas. Los lípidos son apolares y por lo tanto solubles en solventes no polares como fenol y cloroformo e insolubles en soluciones acuosas. Las proteínas son polímeros de aminoácidos, algunos polares y otros no polares. Las proteínas se mantienen solubles en soluciones acuosas cuando por su estructura terciaria los aminoácidos no polares se colocan hacia el interior de la molécula mientras los polares hacia el exterior, interactuando con el solvente. Modificaciones en la estructura terciaria (desnaturalización) de las proteínas que hagan que sus aminoácidos no polares se coloquen hacia el exterior de la molécula impide que las proteínas se mantengan solubles en soluciones acuosas y se precipitan. Por estas diferencias en la polaridad de las macromoléculas podemos separar los lípidos solubilizándolos en solventes no polares, precipitar las proteínas y obtener los ácidos nucleicos en soluciones acuosas.

Separados los ácidos nucleicos utilizando sus propiedades de polaridad se pueden precipitar y concentrar para posteriormente ser utilizados en exámenes diagnósticos. Además, por la presencia de los anillos de purina y pirimidina que absorben luz ultravioleta se pueden cuantificar y establecer su grado de pureza.

4. Materiales equipos e insumos

- Centrífuga refrigerada y serológica.
- Espectrofotómetro de luz ultravioleta con celdas de cuarzo.
- Micropipetas P1000 y P200

- Puntas para micropipeta azules y amarillas
- 5 agujas para vacutainer
- Caperuzas para toma de muestra con vacutainer
- Tubos con anticoagulante EDTA.

5. Reactivos

- Alcohol, torniquete y algodón; para tomar muestras de sangre.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	3 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

- Agua desionizada
- Tris-HCl 1 M
- NaCl 4 M
- Fenol (grado ácido nucleico)
- Cloroformo
- Etanol absoluto
- MgCl₂ 0.2 M

6. Procedimiento

Se toma una muestra de sangre por grupo.

Los estudiantes deben consultar en libros y en manuales de laboratorio los fundamentos de las técnicas utilizadas para la extracción de DNA.

La práctica será realizada en dos sesiones; en la primera, se hace la extracción del DNA humano; en la segunda, se hace electroforesis para visualizar el DNA humano.

1. Constituir grupos de 5 personas.
2. Tomar una muestra de sangre de 5 mL. Una muestra por grupo. Utilizar anticoagulante.
3. Centrifugar la muestra de sangre al 90 % de la velocidad máxima en una centrífuga serológica, durante 10 minutos.
4. Descartar la fase superior, tomar la fase intermedia (capa blanca delgada) y agregar 4 mL de una solución (A): 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 5 mM de Mg Cl₂ y 10 mM de NaCl. Mezclar bien.
5. Centrifugar 10 minutos al 90 % de la velocidad máxima de una centrífuga serológica.
6. Remover el sobrenadante y agregar 2 mL de solución A. Mezclar bien.
7. Centrifugar 10 minutos al 90 % de la velocidad máxima de una centrífuga serológica.
8. Preparar solución A más SDS hasta una concentración final del 0.5 %.
9. Remover el sobrenadante y agregar 1 mL de solución A con SDS. Mezclar bien hasta que haya desintegración de las células.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	4 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

10. Pasar 1 mL de la solución a un tubo eppendorf de 2 mL.
11. Agregar 1 mL de una solución 1:1 de fenol:cloroformo. Mezclar bien.
12. Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm en una centrífuga para eppendorf.
13. Tomar el sobrenadante (0.4 mL aproximadamente) y agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 (40 µL) y 1.2 mL de etanol absoluto (pre-enfriado a – 20 °C).
14. Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm en centrífuga eppendorf refrigerada (4 °C), descartar el sobrenadante.
15. Lavar el precipitado agregando 50 µL de Etanol al 70 % pre-enfriado. Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm en centrífuga eppendorf refrigerada (4 °C), descartar el sobrenadante.
16. Secar el pellet colocando el tubo en un horno, en un baño serológico o en el termociclador a 45 °C durante 10 minutos. Agregar al tubo 50 µL de TE o agua desionizada.
17. Si se dispone de espectrofotómetro ultravioleta hacer cuantificación del DNA a 260 nm y compararlo con la cuantificación del método de dots.
18. Hacer electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1 %.

7. Bibliografía

- J. Sambrook; E.F. Fritsch, T. Maniatis, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** CSHL press 2001
- Fred M. Ausubel; Roger Brent; Robert E. Kingston; David D. Moore; J.G. Seidman; John A. Smith; Kevin Struhl **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley and Sons, Inc, 1998
- Contreras J, Pinilla G, Beltrán R, Wasserman M, Rojas M O **Manual de Técnicas Básicas. Primer Curso Institucional sobre Biología Molecular** ISBN 958-13-0083-X .1 ed. Bogotá : Instituto Nacional de Salud, 1991, v.1. p.30.
- Concepción Puerta y Claudia Urueña. **Prácticas de Biología Molecular**. Editorial Pontificia Universidad Javeriana, 2005