

**PRIMERA PRÁCTICA BIOQUÍMICA
AISLAMIENTO DE DNA DE ARQUEAS HALOFÍLICAS.
ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.**

Descripción resumida de la actividad propuesta

A partir de células procariotas se llevará a cabo el aislamiento de ácidos nucleicos mediante un método muy sencillo, en el cual se llevará a cabo la lisis celular, seguida de un fraccionamiento con disolventes orgánicos y precipitación con etanol. Por último, los ácidos nucleicos se disolverán en agua y se visualizarán mediante la realización de una electroforesis en gel de agarosa.

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es la molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos, excepto en algunos tipos de virus. Está formado por dos cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. Los cuatro nucleótidos que forman el DNA contienen las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) (Figura 1). El modo en que funciona una célula depende de su DNA, que actúa como un plano o como un conjunto de instrucciones, y es el encargado de codificar todo lo que nosotros somos, desde el color del pelo hasta las proteínas que tenemos en nuestra sangre. El conjunto completo del DNA de un organismo se denomina genoma.

Los ácidos nucleicos, debido a su carácter macromolecular, resultan bastante difíciles de separar de las proteínas y polisacáridos por métodos suaves, y los tratamientos drásticos alteran profundamente su estructura y sus características. Las células procedentes de archaeas halofílicas necesitan concentraciones salinas elevadas para mantener su integridad celular; este hecho se ha utilizado para aislar su DNA ya que pueden ser fácilmente lisadas si se tratan con agua. Las células son resuspendidas en

agua, y el lisado se extrae con fenol. El fenol y el agua son inmiscibles, las proteínas se extraen en la fase fenólica y se separan de los ácidos nucleicos que se quedan en la fase acuosa. Adicionando dos volúmenes de etanol a la fase acuosa, los ácidos nucleicos de alto peso molecular precipitan como un material fibroso blanco. Si la precipitación se produce como un material gelatinoso incoloro indica que todavía hay proteína unida a los ácidos nucleicos.

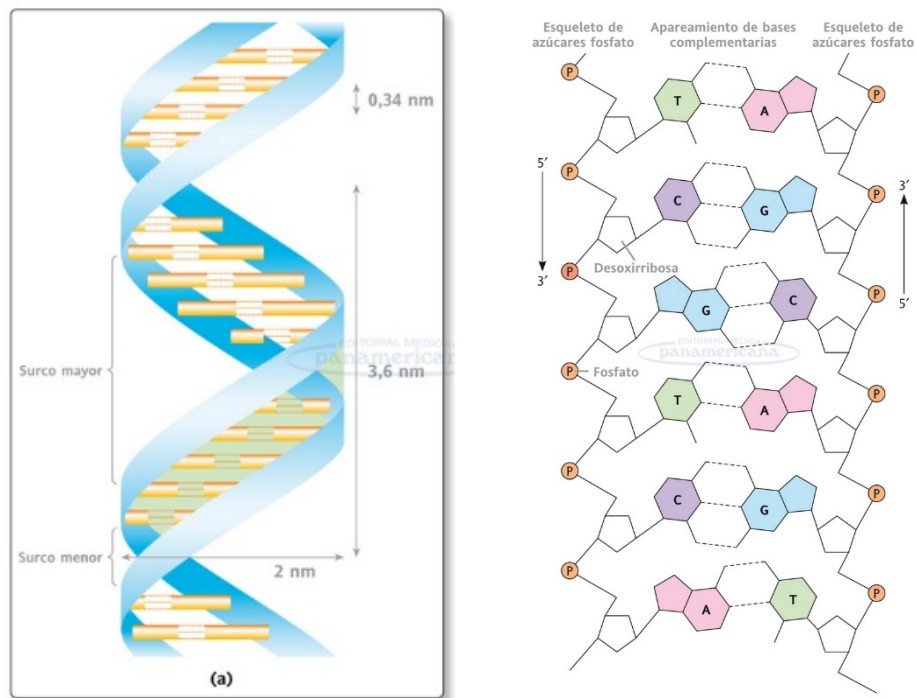


Figura 1: Estructura de la doble hélice de DNA propuesta por Watson y Crick (Feduchi y col., 2011).

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. En concreto, la electroforesis en gel de agarosa es una de las técnicas más utilizadas en Biología Molecular, ya que permite separar, identificar y purificar fragmentos de DNA de una forma sencilla. Los gels de agarosa se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas de DNA en función de su tamaño. Además, si en dicha electroforesis se utilizan marcadores de peso molecular (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA objeto de estudio.

Objetivos

Los objetivos de esta práctica son:

- Aislamiento de ácidos nucleicos a partir de arqueas halófilas extremas.
- Determinación de la calidad de los ácidos nucleicos aislados mediante electroforesis en gel de agarosa.

Procedimiento experimental

▪ Aislamiento de ácidos nucleicos

Células procedentes de un cultivo reciente de *Haloferax mediterranei* se cosecharán en primer lugar para eliminar todo el medio de cultivo. Para ello, adicionar en un eppendorf 1,5ml de cultivo con una pipeta Pasteur de plástico y centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, eliminar el sobrenadante. Una vez que tenemos el precipitado de células "seco", se lisan adicionando 500 μ L de agua ultrapura. Agitar vigorosamente para provocar la lisis celular (se puede utilizar el vortex). Añadir 500 μ L de fenol, agitar suavemente unos segundos e incubar 10 min a temperatura a 60°C. Centrifugar 13.000 rpm durante 5 minutos. Recoger la fase acuosa superior y depositarla en un eppendorf limpio. Adicionar 1 ml de etanol absoluto a la fase acuosa y agitar suavemente para conseguir que el material genético precipite. El material genético debería ser visible en esta etapa. Si no se observa el DNA precipitado, centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos y eliminar después el sobrenadante. El material genético estará en la base del eppendorf como precipitado. Dejar secar al aire durante 5 min., añadir 50 μ l de agua ultrapura e incubar a 37°C durante 5-10 min.

▪ Electroforesis en gel de agarosa

Preparación del gel de agarosa. Se pesan 0.40 g en un erlenmeyer de 200 ml, se añaden 40 ml de tampón 1 x TAE. Se calienta en el microondas hasta que la agarosa esté disuelta. Cuando la agarosa se haya enfriado, sin llegar a solidificar, se añade 1 μ l de Red Safe. Se coloca la agarosa en el molde, se sitúa el peine para fabricar las calles y se deja gelificar.

Realización de la electroforesis. Se rellena el tanque de electroforesis con tampón 1 x TAE; se coloca el gel en el tanque de forma que esté cubierto con tampón al menos 1 cm. Para preparar las muestras de DNA a cargar en el gel se pipetea 10 μ l de DNA y 2 μ l de tampón de carga 6x. Se cargan las muestras en las calles del gel; en una de las calles se pueden poner marcadores de peso molecular conocido. Se realiza la electroforesis aplicando 90V. Transcurrida la electroforesis, el DNA puede visualizarse mediante luz ultravioleta, CON LAS GAFAS DE PROTECCIÓN, gracias al Red Safe que lleva el gel.

Tratamiento de residuos

La gestión de residuos peligrosos en la Universidad de Alicante está gestionada por la Oficina EcoCampus de Gestión Ambiental, que depende directamente del Vicerrectorado de Infraestructuras, Espacios y Medio Ambiente. Esta Unidad es la encargada de elaborar los procedimientos e instrucciones técnicas necesarias para la recogida de residuos peligrosos en los diferentes laboratorios de investigación y docencia de la Universidad, coordinando las empresas Hermanos Gil Gestión de Residuos S.L. y FCC Ámbito S.A. para gestionar los residuos químicos y sanitarios respectivamente.

En esta práctica los residuos de Red Safe generados serán etiquetados con el número 15 (productos tóxicos) y el material biológico en un envase con el número 16 (riesgo biológico).

Cuestiones

1. ¿Cómo se lisan las células de *Haloferox mediterranei*?
2. ¿Cuál es la función del alcohol en el aislamiento de ácidos nucleicos?
3. ¿El DNA que visualizamos a través del tubo de ensayo es una única doble hélice?
4. ¿Para qué realizamos la electroforesis en agarosa después de aislar el DNA?
5. ¿Cómo actúa el Red Safe sobre la molécula de DNA?

Referencias

- Feduchi, E.; Blasco, I.; Romero, C.; Yáñez, E. (2011) Bioquímica. Conceptos esenciales. Editorial Panamericana. 1ª edición.