

EXTRACCIÓN ADN BACTERIANO

Ref. ADN BACT (25 extracciones)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir los principios de la extracción de ADN cromosómico a partir de células bacterianas de *E.coli*.

Los estudiantes aprenderán la estructura y función de los ácidos nucleicos que contiene una bacteria.

2. INTRODUCCION

Toda la información genética esencial para la vida de la bacteria está contenida en una única molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena y circular, cerrado por enlace covalente. Dicha molécula se denomina cromosoma bacteriano. Muchas bacterias poseen además ADN extracromosómico, también circular y cerrado, denominado ADN plasmídico por estar contenido en los plásmidos. Éstos, portan información génica para muchas funciones que no son esenciales para la célula en condiciones normales de crecimiento.



En términos bioquímicos la composición y estructura de los ácidos nucleicos bacterianos es la misma que para cualquier célula. Conviene recordar brevemente que los ácidos nucleicos son macromoléculas compuestas de nucleótidos unidos de forma covalente, por medio de enlaces fosfodiéster entre los carbonos de las posiciones 3' y 5' de dos residuos de azúcares adyacentes. Esta estructura forma un esqueleto de azúcares y fosfatos constante en toda la macromolécula.

La variación entre los nucleótidos que constituyen la cadena de ácido nucleico, está dada por sus bases nitrogenadas; para el ADN son: adenina (A), timina (T), citocina (C)

y guanina (G) y para el ácido ribonucleico (ARN) son en lugar de timina, el uracilo (U). La A y G se denominan bases púricas o purinas, mientras que T, U, y C se denominan bases pirimidínicas o pirimidinas. Así, una cadena o hebra de ácido nucleico, tendrá una estructura primaria determinada por la secuencia de las bases que la componen. El ADN, como macromolécula, está compuesto por dos cadenas nucleotídicas o hebras antiparalelas que se enlazan entre sí formando una doble hélice. Los enlaces entre ambas hebras de ADN están determinados por puentes de hidrógeno entre las purinas de una cadena, con las pirimidinas de la otra. Entonces, la A forma dos puentes de hidrógeno con la T, mientras que la C forma tres puentes de hidrógeno con la G. Dicho fenómeno se conoce como complementariedad de bases, es decir que la A es complementaria a la T y la C lo es para la G. Estos enlaces mantienen estable la estructura de doble hélice de ADN.

En esta estructura de doble hélice de ADN se pueden distinguir pares de nucleótidos o pares de bases (pb). Estas pb pueden usarse como unidad de tamaño o longitud para las moléculas de ADN, de esta manera podemos decir por ejemplo que el ADN cromosómico de *Escherichia coli* tiene un tamaño de 4,2 millones de pb o lo que es lo mismo de 4.200 kilobases (Kb)

Todas las células deben enfrentarse al problema de cómo lograr contener en su estructura moléculas tan grandes como el ADN. Volviendo al ejemplo de *E.coli*, los 4.200 Kb de su genoma implican una longitud de 1,3 mm es decir unas mil veces la longitud de la célula. Las bacterias no poseen histonas asociadas a su genoma y en consecuencia no tienen la posibilidad de compactar su ADN en estructuras tipo nucleosomas como las células eucariotas. Por lo tanto, deben compactar su ADN de otra manera. Esto se logra porque el ADN circular cerrado es capaz de adoptar una estructura terciaria denominada superenrollamiento, que implica el enrollamiento del eje de la doble hélice sobre sí mismo. Este superenrollamiento se dice que tiene sentido negativo porque tiene el sentido contrario al enrollamiento de una hebra de ADN sobre la otra.

Esta estructura de superenrollamiento también supone para la bacteria una fuente de almacenamiento de energía para ser usada en muchos procesos fisiológicos que la requieren, por ejemplo la separación de las dos hebras de ADN necesaria para la replicación y la transcripción. El cromosoma bacteriano es suficientemente largo como para formar muchos lazos circulares, que como tales pueden superenrollarse formando una serie de dominios topológicos independientes. Esta organización en dominios colabora a la compactación general del genoma bacteriano e impide que, con la ruptura de una hebra (en cualquier sitio del cromosoma) se pierda el superenrollamiento total, manteniendo la energía almacenada.

3. COMPONENTES

Pellets bacterianos <i>E.coli</i>	25 unidades
Solución de Lisis	20 ml
Solución Precipitación de Proteínas	10 ml
Solución de Hidratación	20 ml

Componentes necesarios y NO suministrados

- Microcentrifuga.
- Microtubos y micropipetas.
- Baño de Incubación.
- Etanol 70% y Isopropanol.
- Sistema de electroforesis básico (aparatos y reactivos).
- Sistema de detección de ácidos nucleicos.

4. PRÁCTICA

Esta práctica permite aislar el ADN cromosómico de células bacterianas de *E.coli*, estas bacterias son Gram (-) así que no se necesita el tratamiento con lisozima que si necesitan las bacterias Gram (+) que son más difíciles de lisar y necesitan para ellos enzimas líticos.

4.1 Protocolo rápido

Este protocolo permite una rápida extracción del ADN cromosómico de forma que se puede realizar de una forma rápida en una clase práctica con alumnos. Las células bacterianas se han obtenido por centrifugación de 1.5 ml de un cultivo “overnight” de células de *E.coli* y se suministran en forma de pellet bacteriano.

El primer paso es la incubación del pellet bacteriano con una solución de lisis que romperá las membranas celulares y liberará los ácidos nucleicos. Luego se eliminarán las proteínas y restos celulares con la adición de una solución de precipitación de proteínas. Después de una centrifugación nos quedaremos con el sobrenadante y haremos precipitar los ácidos nucleicos con isopropanol, seguido de un lavado con etanol 70% y finalmente la hidratación del ADN.

Lisis celular

1. Añadir 1.5 ml de un cultivo overnight a un tubo de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 14.000 x g durante 30 segundos. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir **600 µl** de **Solución de Lisis** al pellet celular y pipetear para resuspender y lisar las células.
4. Incubar las muestras a 80°C durante 5-10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.

Precipitación de proteínas

1. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
2. Añadir **300 µl** de **Solución de precipitación de proteínas**.
3. Vórtex vigorosamente durante 20-30 segundos.
4. Centrifugar a **14.000 x g** durante **5** minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

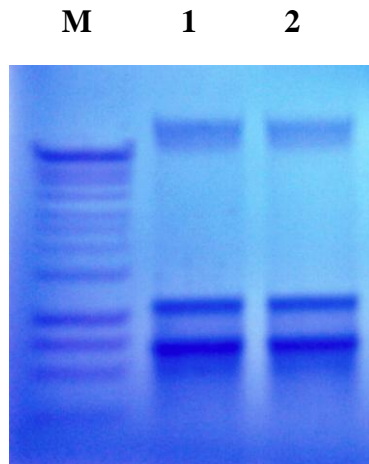
Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de **1.5 ml** que contenga **600µl de isopropanol** Mezclar por inversión varias veces.
2. Centrifugar a **14.000 x g** durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante. Añadir **600 µl de etanol 70%** e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
4. Centrifugar a **14.000 x g** durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN
5. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.

Hidratación del ADN

1. Añadir **500-750 µl de Solución de Hidratación del ADN**. Resuspender mediante micropipeta el pellet blanco. La incubación a **55°C** con periódicas agitaciones con vortex ayudará a la disolución del ADN.

5. RESULTADOS



M: Marcador peso molecular.

1. Pellet bacteriano E.coli.
2. Pellet bacteriano E.coli.

Tinción realizada con nuestro sistema NO TÓXICO DANABLUE-FLASHBLUE.

Se puede observar 2 bandas por encima de la última del marcador de peso molecular que corresponden al **ADN cromosómico**. En este método rápido no se utiliza el uso del enzima RNasa que eliminaría el **ARN degradado** que podemos observar como una o dos bandas en la parte inferior del gel de agarosa.