

# 37. Purificación de ácidos nucleicos

**M<sup>a</sup> José Prieto Álamo, Juan López Barea, Carmen Pueyo de la Cuesta**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,  
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

## RESUMEN

La purificación de DNA es un paso clave en la experimentación en Biología Molecular. Los métodos de purificación de DNA se clasifican en dos grandes categorías, según pretendan purificar DNA cromosómico o DNA plasmídico. La purificación de DNA plasmídico es la base de cualquier experimento de clonación molecular. El problema principal que hay que resolver es la separación del DNA plasmídico y DNA cromosómico. En esta práctica hemos elegido el método de “lisis alcalina”, por su simplicidad, bajo coste y reproducibilidad. La purificación de RNA es otro paso clave en la experimentación en Biología Molecular. Cuando se trabaja con células de mamífero existen dos posibilidades: purificar RNA total o mRNA (en base a la cola de poliA). La purificación de RNA es la base de la cuantificación de transcritos en estudios de expresión génica. En esta práctica purificaremos RNA mediante el método “TRI-REAGENT™”. El DNA plasmídico se purificará a partir de bacterias portadoras y el RNA a partir de células humanas cultivadas en el laboratorio. Los ácidos nucleicos se separarán por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa y se visualizarán por irradiación con luz UV en presencia de bromuro de etidio.

*Palabras claves:* plásmido, RNA, lisis alcalina, bacterias, células eucariotas, electroforesis.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Introducción

#### 1.1.1 Purificación de DNA plasmídico

El genoma bacteriano se organiza en un único cromosoma circular con un sólo origen de replicación. Las bacterias pueden contener información genética adicional en forma de plásmidos. Los plásmidos son moléculas circulares de DNA extracromosómico que se replican de forma autónoma, a partir de su propio origen de replicación. La información genética que portan los plásmidos no es generalmente vital para la supervivencia celular. No obstante, dicha información puede resultar imprescindible en determinadas circunstancias ambientales, e.g. plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos. Las bacterias pueden llegar a tener un gran número de copias de un mismo plásmido (plásmidos multicopia), facilitando enormemente su purificación.

Hay distintos procedimientos para la purificación de DNA plasmídico, aunque todos incluyen los tres pasos siguientes: (i) Crecimiento de las bacterias en un medio selectivo de aquellas que llevan el plásmido. (ii) Lisis de las bacterias para la liberación del plásmido. (iii) Purificación del DNA plasmídico.

El problema principal que hay que resolver es la separación del DNA plasmídico y DNA cromosómico. En esta práctica hemos elegido el método de "lisis alcalina", por su simplicidad, bajo coste y reproducibilidad.

*Lisis alcalina:* Este método explota las diferencias en las propiedades de desnaturalización y renaturalización entre el DNA plasmídico (pequeños círculos de DNA cerrados covalentemente) y el DNA cromosómico (fragmentado). La alcalinización con NaOH en presencia de un detergente fuertemente aniónico (SDS), provoca la lisis celular, la desnaturalización del DNA cromosómico y de las proteínas, y la liberación de los plásmidos. Los plásmidos se ven menos afectados por su pequeño tamaño y estructura superenrollada. La neutralización del medio en presencia de una concentración alta de sal (acetato potásico), provoca la precipitación de las proteínas (por el tratamiento con el detergente y la insolubilidad de la sal potásica del dodecil sulfato) y la del DNA cromosómico (por reasociaciones aleatorias intracatenarias). Los agregados insolubles de proteínas y DNA cromosómico se separan por centrifugación del DNA plasmídico que queda en el sobrenadante y conserva mayoritariamente su estructura nativa.

### **1.1.2 Purificación de RNA**

La clave de la purificación de RNA radica en evitar su degradación por acción de las ribonucleasas. De manera que todos los protocolos existentes se basan en la rápida inactivación de dichas enzimas. En esta práctica hemos elegido el método "TRI-REAGENT™" (Sigma) que optimiza el método de paso único (single-step method), desarrollado por Chomczynski & Sacchi en 1987. Dicho método purifica RNA total: rRNAs (~80-85%), tRNAs (~10%) y mRNAs (~1-5%).

*TRI-REAGENT™:* Este producto es una mezcla de tiocianato de guanidinio (potente agente caotrópico, desnaturalizante) y fenol. En su presencia, las células se lisan rápidamente, se solubilizan sus componentes y se inactivan las ribonucleasas. La adición posterior de cloroformo genera una fase acuosa (con el RNA) y una fase orgánica (con proteínas desnaturalizadas); el DNA queda en la interfase.

### **1.1.3 Electroforesis en gel de agarosa**

La calidad de las purificaciones de ácidos nucleicos se comprueba rutinariamente mediante electroforesis en geles de agarosa.

Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución de moléculas, éstas se separan de acuerdo con su tamaño y carga neta. Los ácidos nucleicos son polianiones que se mueven hacia el polo positivo. Las moléculas y fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos se separan de acuerdo con su tamaño y conformación, mediante electroforesis en geles de agarosa. La agarosa es un

polímero de residuos alternos de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glicosídicos, que forma geles con poros de gran tamaño.

Los ácidos nucleicos que emigran a mayor velocidad en los geles de agarosa son los que encuentran menos resistencia en su avance (los de menor tamaño y de conformación más compacta).

Al gel de agarosa se le añade bromuro de etidio, un compuesto que se une a los ácidos nucleicos y que fluoresce cuando se ilumina con luz UV

## **1.2. Objetivos**

Familiarizarse con protocolos de purificación de distintos tipos de ácidos nucleicos: DNA plasmídico a partir de bacterias portadoras y RNA a partir de células humanas cultivadas en el laboratorio. Separación por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa y visualización por irradiación con luz UV en presencia de bromuro de etidio.

## **1.3. Instrucciones**

Los alumnos se organizarán en 6 grupos. Los alumnos de los grupos 1, 2, 3 y 4 aislarán DNA plasmídico y los alumnos de los grupos 5 y 6 RNA. A cada grupo se le suministrará el material adecuado al tipo de ácido nucleico que vaya a purificar. Dicho material se devolverá al término de la práctica. Se hará una discusión conjunta de los dos tipos de purificación.

## **2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO**

*Todo el material fungible para la purificación de RNA se esteriliza dos veces.*

Incubador orbital.  
Micropipetas automáticas.  
Microfuga.  
Microfuga refrigerada.  
Cubetas de electroforesis horizontal.  
Fuente de alimentación.  
Baño termostatzado.  
Agitador vortex.  
Transiluminador UV.  
Tubos de ensayo estériles.  
Tubos Eppendorf de 1,5 ml.  
Hielo picado.  
Guantes.  
Rotuladores permanentes.

## **3. PROTOCOLO A REALIZAR**

### **3.1. Purificación de DNA plasmídico**

### Recolección de las bacterias

1. Se cogen 1,5 mL (2 x 750 µl) de un cultivo estacionario de una bacteria portadora de un plásmido con un gen de resistencia a un antibiótico. Este cultivo se creció durante toda la noche a 37°C en medio con el antibiótico.
2. Se dispensan en un tubo eppendorf (previamente marcado) y se centrifuga a temperatura ambiente, durante 3 min a 12.000 g.
3. Se retira el sobrenadante (2 x 750 µl) con mucho cuidado (punta azul dentro de punta amarilla) y SE TIRA.
4. Se da un pulso de centrifuga, se retira cuidadosamente el sobrenadante que aún quede (punta amarilla dentro de punta blanca) y se tira. Nos quedamos con el precipitado de las bacterias.

### Lisis alcalina

5. Se resuspende (agitando vigorosamente) el sedimento de bacterias en 100 µl de una solución isotónica (GTE: Glucosa, Tris y EDTA) a 4°C. Se deja a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Se añaden al mismo tubo, 200 µl de la solución de lisis (NaOH, SDS) que está a temperatura ambiente y recién preparada. Se agita suavemente con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces). Se incuba 5 min a 4°C.

### Neutralización

7. Se añaden al mismo tubo, 150 µl de la solución de neutralización (acetato potásico 3M, pH 4,8). Se agita con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces). Se incuba 5 min a 4°C.

### Aislamiento de los plásmidos

8. Los agregados macromoleculares se precipitan por centrifugación (15 min a 12.000 g y 4°C), formándose un sedimento blanco de aspecto lechoso. El tubo se traslada con cuidado a la mesa de trabajo.
9. Se retira (2 x 200 µl) con cuidado el sobrenadante con el DNA plasmídico y se dispensa en un tubo limpio (previamente marcado).
10. Se añade 1 ml de etanol absoluto (4°C) al tubo en el que hemos puesto la solución con el DNA plasmídico. Se mezcla con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces). Se incuba 15 min a 4°C.
11. Se precipitan los plásmidos por centrifugación (15 min a 12.000 g y 4°C), se retira (2 x 750 µl) cuidadosamente el sobrenadante (punta azul dentro de punta amarilla) y se tira.
12. Se añaden al mismo tubo, 900 µl de etanol al 70% (4°C). Se mezcla suavemente con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces).
13. Se vuelven a precipitar los plásmidos por centrifugación (10 min a 12.000 g y 4°C), se retira cuidadosamente el sobrenadante (punta azul dentro de punta amarilla) y se tira.
14. Se da un pulso de centrifuga, se retira cuidadosamente el sobrenadante que aún quede (punta amarilla dentro de punta blanca) y se tira. Nos quedamos con el precipitado de los plásmidos.
15. Se disuelve el precipitado de los plásmidos (aspirando y soltando el líquido varias veces con ayuda de la micropipeta) en 50 µl de tampón TE (pH 8,0), con ribonucleasa A.
16. Se incuba a temperatura ambiente 5 min. Mantener la muestra a 4°C

### 3.2. Purificación de RNA

1. Se homogeniza la muestra (~5 millones de células humanas) en 500 µl de TRI-REAGENT, aspirando y soltando el líquido varias veces con ayuda de la micropipeta. Se añaden 500 µl más de TRI-REAGENT y se vuelve a mezclar todo con ayuda de la micropipeta. Se incuba 5 min a temperatura ambiente.
2. Se añaden 200 µl de cloroformo (frío). Se cierra bien el tubo y se agita vigorosamente a mano su contenido (~30 s). Se incuba 5 min a temperatura ambiente.
3. Se separan las dos fases por centrifugación (15 min a 12.000 g y 4°C).
4. Se retira (3 x 175 µl) con sumo cuidado (sin tocar la interfase) la **fase superior acuosa** (incolora) y se dispensa **en un tubo eppendorf** limpio (previamente marcado).
5. Se añaden al mismo tubo, 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA y se agita vigorosamente a mano su contenido (~30 s). Se incuba 10 min a temperatura ambiente. Se centrifuga (15 min a 12.000 g y 4°C).
6. Se retira el **sobrenadante** (punta azul dentro de punta amarilla) con sumo cuidado, evitando tocar el precipitado, y **se tira**.
7. Se da un pulso de centrífuga, se retira cuidadosamente el **sobrenadante** que aún quede (punta amarilla dentro de punta blanca) y **se tira**.
8. Se disuelve el precipitado con el RNA en 75 µl de agua, aspirando y soltando el líquido varias veces con ayuda de la micropipeta. Se calienta 10 min a 55-60°C, se enfría rápidamente y se da un pulso de centrífuga. Mantener la muestra a 4°C.

### 3.3. Electroforesis en gel de agarosa

#### Preparación de las muestras de DNA (grupos 1-4):

1. En un tubo eppendorf, se dispensan 10 µl de la muestra de DNA plasmídico y 1 µl del tampón de carga (glicerol y naranja G).

#### Preparación de las muestras de RNA (grupos 5-6):

1. En un tubo eppendorf, se dispensan 4 µl de la muestra de RNA y 6 µl del tampón de carga (sacarosa, formamida y azul de bromofenol). La formamida dificulta las reasociaciones intracatenarias del RNA que dan lugar a agregados que emigran anómalamente. Se calienta la muestra 3 min a 55-60°C. A continuación se enfría rápidamente y se da un pulso de centrífuga.

#### Electroforesis

2. Se cargan las muestra de DNA y RNA en geles de agarosa al 1% preparados con anterioridad.
3. Se cargará también una muestra de referencia.
4. Se tapa la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación (rojo para el polo positivo).
5. Se programa la fuente a 70 voltios y se deja funcionar la electroforesis durante ~ 45 min.

### Visualización de los ácidos nucleicos

6. Acabada la electroforesis, se pone el gel en un transiluminador y se irradia con luz UV. Los alumnos harán un esquema de la imagen resultante, indicando el grosor aproximado de las bandas que aparezcan con mayor nitidez y su posición en el gel.

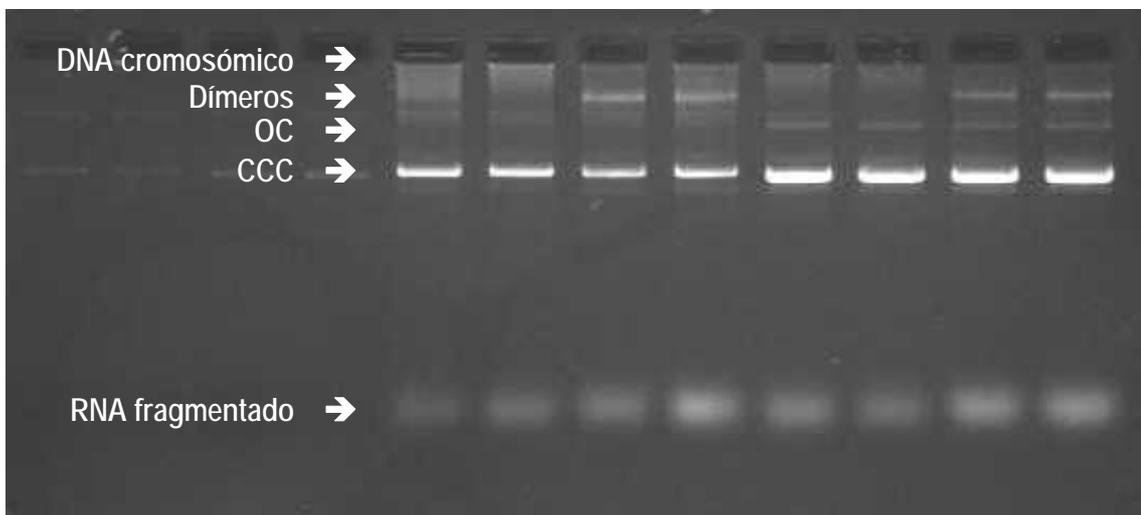
### **ADVERTENCIAS:**

- (a) Se usarán guantes durante toda la práctica para evitar el contacto con productos tóxicos y la degradación de las muestras.
- (b) Cada punta de micropipeta se usará una sola vez, para evitar la contaminación de las muestras.
- (c) Los alumnos que purifiquen RNA utilizarán un material especialmente tratado para evitar la presencia de ribonucleasas.
- (d) El TRI-REAGENT™, el cloroformo y el bromuro de etidio son compuestos muy tóxicos que bajo ningún concepto se deben tocar y/o inhalar.
- (e) La luz UV puede dañar los ojos. Antes de conectar la lámpara de luz UV hay que poner una pantalla protectora.

En caso de dudas, antes de actuar, preguntar a los profesores

## **4. RESULTADOS ESPERADOS**

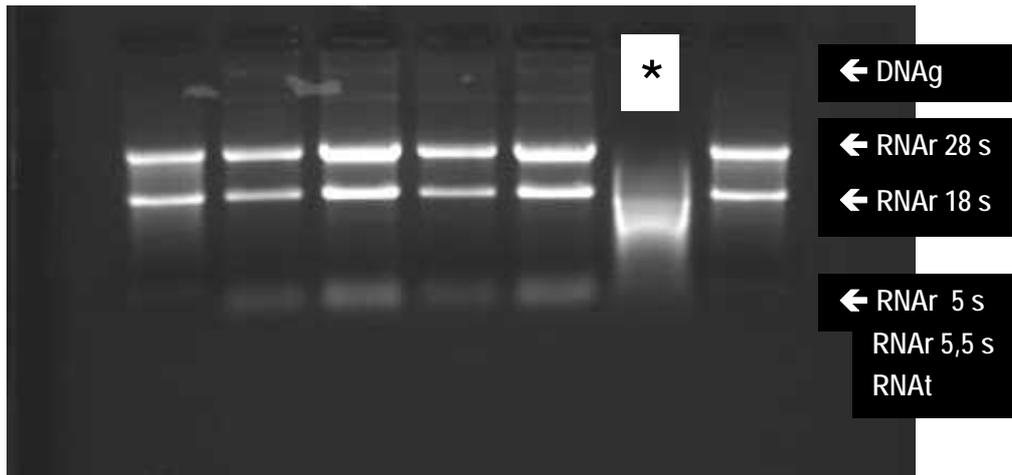
### **Purificación de DNA plasmídico**



OC: plásmidos en estructura relajada (Open Circular plasmids)

CCC: plásmidos en estructura nativa (Covalently Closed Circular plasmids)

## Purificación de RNA



## 5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Los resultados obtenidos por los distintos grupos se discuten conjuntamente, interpretándose las distintas bandas que se visualicen en los geles y ofreciendo una explicación de las posibles incidencias.

## 6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523. Artículo original que describe el método de "lisis alcalina".

TRI-REAGENT (1999) Technical Bulletin MB-205. SIGMA. Boletín técnico de la casa comercial que describe el método TRI-REAGENT para la purificación de RNA total.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-9. Artículo original que describe el método de "paso único (single-step)" en el que se basa el TRI-REAGENT.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la ayuda técnica de Beatriz Espejo Reyes en la puesta a punto de esta práctica.

## PREGUNTAS

1. ¿Qué finalidad tiene la neutralización en el método de "lisis alcalina"?
2. ¿Por qué la alcalinización en presencia de SDS afecta menos a los plásmidos que al DNA cromosómico?
3. ¿Qué finalidad tiene el paso de incubación con ribonucleasa A en la purificación de DNA plasmídico?

4. ¿Qué tipo(s) de RNA se purifica(n) mediante el método "TRI-REAGENT"?
5. ¿Por qué el protocolo de purificación de RNA tiene al final un paso de calentamiento seguido por un enfriamiento rápido?
6. ¿Es indiferente que los pocillos en los que se han cargado las muestras se sitúen próximos al polo positivo o al polo negativo?
7. ¿Qué papel juega el naranja de acridina en el tampón de carga de la muestra de DNA plasmídico?
8. ¿Qué papel juega la formamida en el tampón de carga de la muestra de RNA?
9. ¿Migra con idéntica velocidad un plásmido con estructura nativa superenrollada que un plásmido con roturas?
10. ¿Por qué se irradian los geles con luz UV?

## **ANEXO 1: LISTADO DE MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO**

Medio LB:

10 g Bactotripton, 5 g extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 L de agua.  
Disolver y autoclavar.

Ampicilina 50 mg/mL.

EMEM suplementado con suero fetal bobino 10%, glutamina 2 mM, y NEA.

Solución isotónica GTE:

Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0.

Solución de lisis:

0,2 N NaOH, 1% SDS, preparar fresca antes de cada extracción de DNA plasmídico.

Solución de neutralización:

Acetato potásico 3M, pH 4,8.

Etanol absoluto

Etanol 70%

TE pH 8,0 con Ribonucleasa A:

Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0, Ribonucleasa A 0,5 µg/µL.

TRI-REAGENT

Cloroformo

Isopropanol

Agua tratada con dietilpirocarbonato.

TAE:

Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

Tampón de carga DNA:

Glicerol 30%, Naranja G 0,35%, TAE 10x.

Tampón de carga RNA:

Sacarosa 10%, formamida desionizada 90%, azul de bromofenol 0,05%.

Material biológico:

Bacterias DH5α/pC7 y células HepG2.