

UF5

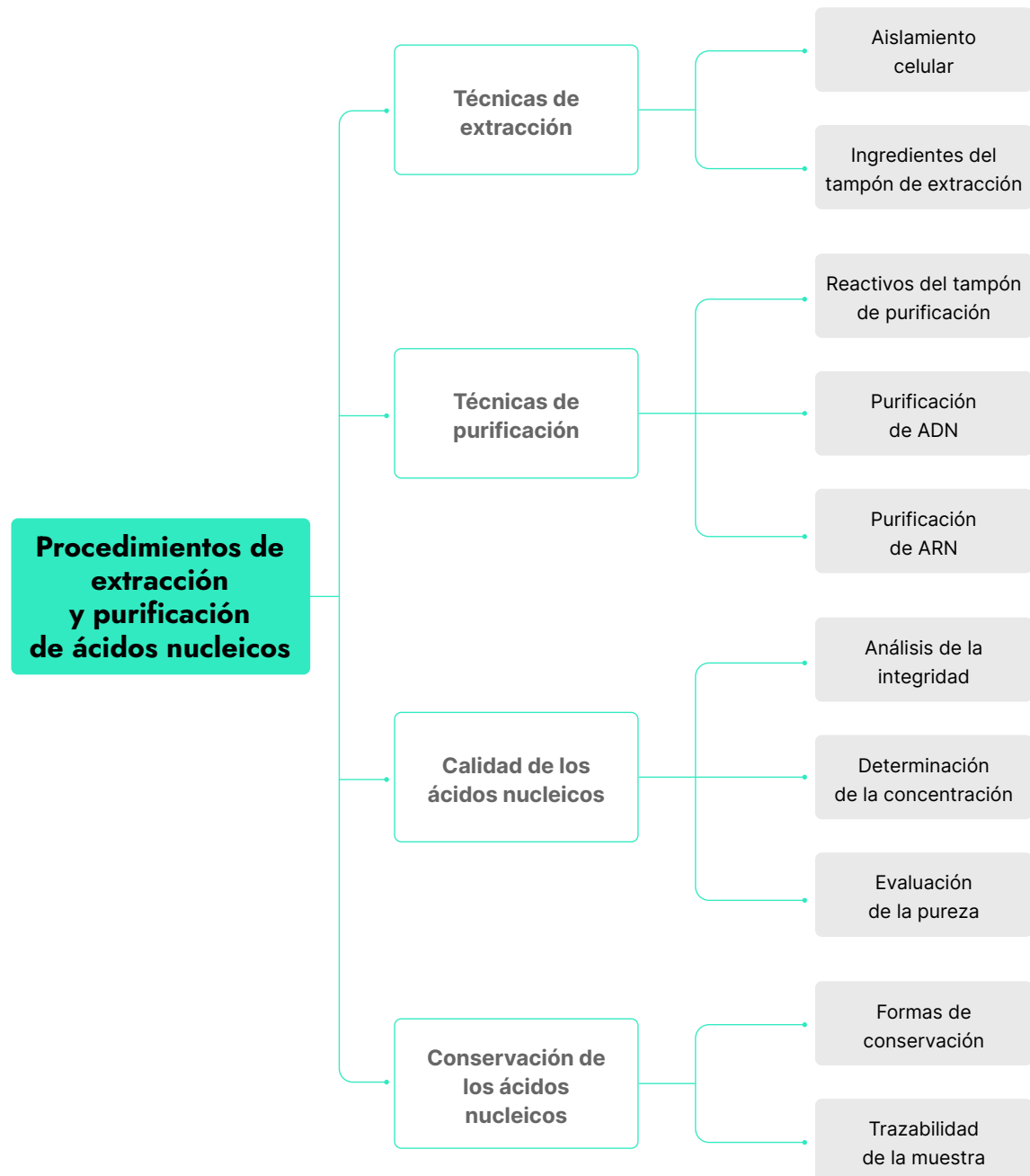
Procedimientos de extracción y purificación de ácidos nucleicos

Biología molecular y citogenética

ÍNDICE

Mapa conceptual	03
1. Técnicas de extracción de ADN y ARN.....	04
1.1. Aislamiento celular	04
1.2. Extracción	07
2. Técnicas de purificación de ADN y ARN.....	10
2.1. Purificación de ADN.....	11
2.2. Purificación de ARN.....	15
2.3. Sistemas automáticos de purificación.....	17
3. Calidad de los ácidos nucleicos y su conservación.....	19
3.1. Integridad	19
3.2. Concentración.....	20
3.3. Pureza	21
3.4. Conservación	22

Mapa conceptual



01 Técnicas de extracción de ADN y ARN

Antes de comenzar, es importante tener en cuenta que la manipulación de los ácidos nucleicos varía dependiendo del tipo de organismos o el tejido de partida del cual se quiere obtener un conjunto de **células aisladas**. Por ello, **en la extracción** es importante mantener durante todo el proceso una correcta calidad y seguridad para evitar la contaminación o degradación de las muestras, ya que estas pueden proceder de tejidos vegetales o animales, sangre, microorganismos e hisopos nasales, entre otros.

La extracción y purificación de los ácidos nucleicos sigue siempre un conjunto de etapas básicas reflejadas en la Figura 1.

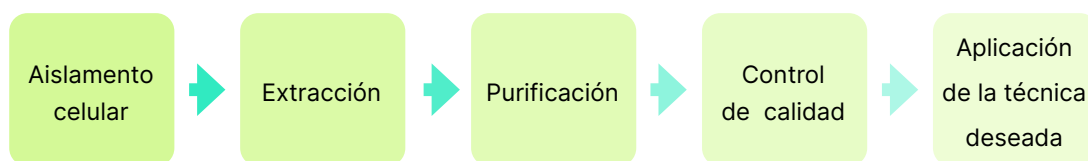


Fig. 1. Orden de las fases necesarias para una correcta extracción de las muestras.

1.1. Aislamiento celular

DEFINICIÓN

El **aislamiento celular o pretratamiento** de las muestras es el proceso de obtención de células libres en disolución a partir de un tejido u organismo. Este proceso de homogenización puede ser **químico o mecánico**.

Las **técnicas** que se llevan a cabo para la realización del aislamiento celular dependerán de la muestra de partida. Algunas muestras, como pueden ser las procedentes de organismos **procarióticos**, no necesitan este tipo de pretratamiento debido a que las células ya se encuentran **aisladas y separadas** entre ellas.

Existen algunos casos donde el pretratamiento de las muestras no se tiene en consideración, como es el ejemplo del uso de los hisopos en la extracción de ácidos nucleicos previos a la realización de cualquier técnica de biología molecular, donde el objetivo es obtener

células del epitelio nasal o bucal, mediante el raspado con **torunda o hisopo**. En cambio, cuando se trabaja con **células eucariotas** que forman parte de otros tejidos, este proceso se complica.

A continuación, se muestran tres de los **pretratamientos** más habituales en la obtención de suspensiones celulares de organismos eucarióticos:

- » Tejidos animales y vegetales.
- » Sangre.
- » Cultivos celulares.

El aislamiento de células en los **tejidos animales y vegetales** requiere de una homogenización mecánica o química previa. Se necesita separar las células por la acción de **tritadoras automáticas** o mediante el uso de **morteros** hasta conseguir una suspensión donde las células se encuentren separadas unas de otras, pero manteniendo sus membranas y **estructuras intracelulares intactas**.

Por otro lado, también se puede utilizar la acción de proteasas que favorezcan la **disgregación** celular de los tejidos, y a este proceso se lo conoce como **homogenización química**. Si las células que se desean extraer forman parte de un órgano, se debe realizar una disección del órgano previa a la fase de homogenización.

Los procesos de homogenización se suelen realizar a **temperaturas bajas** para evitar la actuación de enzimas que puedan degradar al ADN o ARN. Cabe destacar que en los laboratorios de anatomía patológica los tejidos animales se suelen conservar en parafina (**muestras FFPE**) y, si se necesitara obtener de estos ácidos nucleicos, se debería realizar un pretratamiento especial con **xilol** u otros disolventes desparafinantes.

IMPORTANTE

El proceso de **homogenización** de tejidos suele combinar las técnicas mecánicas con las químicas en el mismo tubo de reacción. Esto favorece la liberación de las células del tejido donde están embebidas y acortar los tiempos del pretratamiento.

Respecto al **pretratamiento de la sangre**, es conveniente que el proceso de aislamiento celular y extracción se realice durante las **seis primeras horas** previas a la extracción del ácido nucleico. En caso contrario, se deberá conservar a **4°C** y ser utilizada en los **cinco primeros días**. Además, la sangre debe obtenerse en tubos con **EDTA** para evitar la coagulación.

La sangre está constituida por hematíes, leucocitos y plaquetas en su composición celular y por el plasma como componente no celular. De todos los **componentes** nombrados, solo los **leucocitos** contienen ácidos nucleicos y, por ende, son los que necesitan aislarse del resto para su posterior extracción. Es importante recordar que la hemoglobina contenida en los hematíes es un potente inhibidor de la PCR, por lo que se debe eliminar durante el pretratamiento de la sangre.

Los **pasos** para obtener los leucocitos monomorfonucleares aislados son los siguientes:

1. Extracción de sangre en tubos EDTA al 10%.
2. Agregación de eritrocitos por Ficoll-Paque™.
3. Centrifugación de la sangre durante 30 minutos a 400 x g.
4. Obtención de los monomorfonucleares de la interfase.

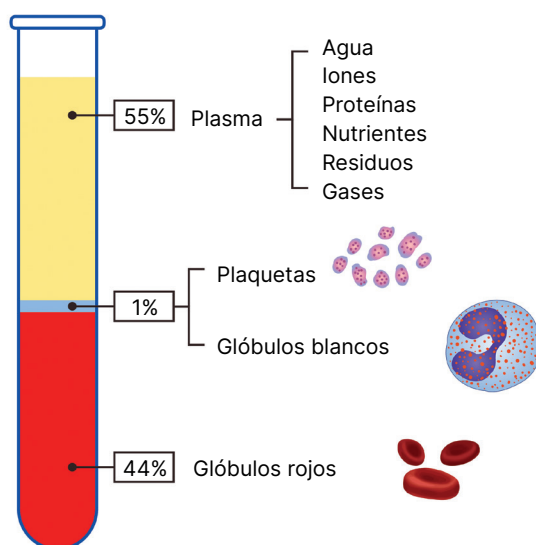


Fig. 2. Aislamiento de leucocitos monomorfonucleares en sangre total anticoagulada.

La extracción de ADN o ARN de células en **cultivos celulares** es habitual cuando se ha expuesto a las células a condiciones o estímulos controlados que generan cambios en su expresión o provocan mutaciones intencionadas en los ácidos nucleicos.

En este tipo de muestras, el aislamiento de células es más sencillo debido a que estas se encuentran creciendo de manera individual en cultivos de **monocapa** (crecimiento por adhesión a superficie) o en cultivos en **suspensión** (crecimiento libre en un medio líquido).

Para los cultivos en suspensión, únicamente hace falta centrifugar y recoger el pellet celular, mientras que en el de monocapa se necesita un **paso previo** de despegar las células adheridas al frasco de cultivo por medios mecánicos como el raspado o con productos químicos como la tripsina.

1.2. Extracción

La **extracción** es el proceso que permite liberar al medio a los ácidos nucleicos, **eliminando el resto de componentes celulares** que los mantenían protegidos. Finalmente, se obtiene una solución homogénea donde se encontrará el ADN o ARN intacto junto con el resto del lisado celular.

Cuando se quiere extraer ADN o ARN, se debe realizar siempre un proceso llamado **lisis celular**, por el cual se destruyen todos los componentes celulares menos los ácidos nucleicos. Este proceso va ligado a la **inactivación de las nucleasas**. Estas enzimas se encuentren libres en los tejidos y en el citoplasma celular, por lo que la lisis celular, sin inactivación de nucleasas, provocaría una degradación de los ácidos nucleicos. Por ello, se suelen utilizar agentes bloqueantes de la actividad de estas enzimas en la **solución de lisis o extracción**.

El **tampón de extracción** es un líquido formado por varios ingredientes que tienen como función la **lisis de los componentes celulares** y la **inactivación de las ADNasas o ARNasas**. A continuación, se muestran en la Tabla 1 los ingredientes más comunes del tampón de extracción y sus características principales.

INGREDIENTES	CARACTERÍSTICAS
Detergente	- Son sustancias tensoactivas aniónicas que permiten la degradación de las membranas lipídicas. Disuelve los lípidos que las constituyen. Ejemplo: dodecilsulfato de sodio o SDS. Este reactivo también ayuda a desnaturalizar las proteínas rompiendo sus enlaces covalentes
Proteasas	- Enzimas que eliminan otras proteínas como las nucleasas y que, además, destruyen el resto de las proteínas celulares. Ejemplo: proteinasa K. Tiene un amplio rango de acción sobre los encales peptídicos y puede hidrolizar incluso proteínas pequeñas de cuatro aminoácidos de longitud.
Agentes quelantes	- Es un agente químico que actúa como quelante de cationes divalentes, es decir, atrapa cationes que algunas proteínas, como las ADNasas, necesitan para realizar su función catalítica. Ejemplo: EDTA. Este atrapa cationes de calcio y magnesio. Se usa como inhibidor de las nucleasas.

Agentes caotrópicos

- Son sales que actúan alterando los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y sus solutos. Son capaces de desnaturalizar proteínas y de alterar la hidratación de moléculas con carga como los ácidos nucleicos.
- **Ejemplo: clorhidrato de guanidinio.** Usado como inhibidor de nucleasas (ARNasas) y deshidratante de los ácidos nucleicos en disolución acuosa.

Tabla 1. Ingredientes comunes de los tampones de extracción.

Los ingredientes detallados en la Tabla 1 serían suficientes para la extracción de ADN de células eucariotas sin pared pero, cuando se requiere eliminar células con **pared celular o membranas ricas en polisacáridos** (como bacterias, hongos o células vegetales), es necesario añadir a la solución de lisis nuevos ingredientes. La sustancia más utilizada cuando existe alto contenido de polisacáridos es el detergente **CTAB**, un tensoactivo catiónico capaz de eliminar los azúcares de las células y facilitar la extracción de los ácidos nucleicos. También se utilizan enzimas, como **lisozimas o liticasas**, que son capaces de degradar la pared celular de estos organismos.

En la extracción de ADN se suelen añadir al tampón de extracción diferentes tipos de **ARNasas** cuando se requiere eliminar el ARN de las células para evitar interacciones en la fase de purificación del ADN. No es un componente común de la extracción de ADN debido a que existen de manera natural ARNasas en el interior de las células.

En cambio, cuando se quiere **extraer únicamente ARN**, no es necesario añadir ADNasas al tampón de extracción, ya que se realiza una purificación específica para este tipo de ácido nucleico. Actualmente, la extracción de ARN está teniendo un aumento exponencial debido al alto número de técnicas, como la secuenciación de ARN y los *microarrays*, que buscan medir la expresión génica total y descubrir nuevos tipos de micro-ARN.



VÍDEOLAB

Para consultar el siguiente video sobre **ADN a simple vista**, escanea el código QR o [pulsa aquí](#).

1

CASO PRÁCTICO



INGREDIENTES DEL TAMPÓN DE EXTRACCIÓN

Como técnico de laboratorio, se te pide que realices una extracción de ADN de una hoja de tomate. Debes decidir qué ingredientes contendrá tu tampón de extracción y justificar tu elección.

SOLUCIÓN

- Solución de lisis con CTAB: elimina la membrana y la pared de las células que son ricas en polisa-cáridos.
- EDTA: evita la degradación del ADN por nucleasas.
- Proteinasa K: elimina proteínas y nucleasas.
- Etanol al 100%: facilita la precipitación de ADN.

02 Técnicas de purificación de ADN y ARN

Tras realizar el asilamiento de las células de un tejido y llevar a cabo la extracción de los ácidos nucleicos, se obtiene un lisado celular donde estarán los ácidos nucleicos intactos y rodeados de la suspensión del resto de los componentes celulares.

El siguiente paso será **separar los ácidos nucleicos** de este lisado celular por alguno de los métodos de **purificación**. Esto conllevará el uso de nuevos reactivos y de **centrifugaciones** durante cada paso del proceso de purificación.

IMPORTANTE

No confundir la extracción con la purificación de ácidos nucleicos aislados, ya que la **extracción** es la destrucción de los componentes celulares y la **purificación** es el intento de aislar los ácidos nucleicos del lisado celular.

La purificación es la separación del ADN o ARN, los lípidos, las proteínas, las sales y demás sustancias obtenidas en el proceso de extracción. Este proceso se puede realizar por distintos métodos. Los más utilizados son:

- » Purificación de ADNg por *salting-out*.
- » Purificación de ADNg por solventes orgánicos.
- » Purificación de ADNg por columnas de adsorción.
- » Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina.
- » Purificación de ARN por el método TRI-REAGENT.

Antes de analizar cada uno de los procesos de purificación, se ofrece en la Tabla 2 un resumen de los reactivos necesarios en la mayoría de los procesos de purificación.

REACTIVOS	CARACTERÍSTICAS
Acetato sódico	Es una sal utilizada en la precipitación del ADN disuelto en agua. La sal en disolución se disocia y los cationes de sodio se unen a los grupos fosfato del ADN, lo que provoca su insolubilidad en disolventes polares como el agua.
Agentes caotrópicos	Estas sales permiten que el ADN o ARN se una a una fase estacionaria, normalmente formada de sílice, ya que provoca la deshidratación de los ácidos nucleicos . Son muy utilizadas en los procesos de purificación por cromatografía en columna.
Cloroformo isoamílico	Sustancia que elimina los componentes apolares (lípidos) de la solución de lisis, lo que genera una fase orgánica fácilmente eliminable.
Etanol al 100%	Reactivo alcohólico que permite deshidratar las moléculas de ADN o ARN y facilitar su precipitación .
Etanol al 70%	Sustancia alcohólica que permite lavar el ADN durante los procesos de purificación. No llega a precipitar el ADN debido a que contiene un 30% de agua en su composición, lo que facilita el arrastre de los contaminantes.
Isopropanol	Al igual que el alcohol al 100% o el acetato sódico, esta sustancia se utiliza para facilitar la precipitación de los ácidos nucleicos en dilución.
Tampón de hidratación	Solución utilizada en la última fase de cada proceso de purificación que permite mantener o conservar el ADN hidratado. Suelen ser una solución de agua libre de nucleasas o el tampón de Tris-HCl y EDTA (tampón TE) .

Tabla 2. Principales reactivos del proceso de purificación.

2.1. Purificación de ADN

La mayoría de los procesos de purificación del ADN están divididos en cuatro fases bien diferenciadas:

1. Eliminación o precipitación de proteínas y lípidos.
2. Precipitación del ADN.
3. Lavado del ADN.
4. Hidratación y conservación del ADN.

En la purificación mediante **salting-out o precipitación con sales**, el primer paso de **eliminación de las proteínas y lípidos** se realiza añadiendo una solución salina muy concentrada que provocará la precipitación de las proteínas y lípidos tras una centrifugación. Esto genera que en el **pellet** se encuentren las sustancias de desecho y, en el sobrenadante, los ácidos nucleicos disueltos. Acto seguido, y tras la eliminación del pellet, se procede a la **precipitación y centrifugación del ADN** mediante el uso del isopropanol. Ahora el ADN se encuentra en el pellet y se elimina el sobrenadante. A continuación, **se lava el ADN** con etanol al 70% y se vuelve a centrifugar. Una vez finalizado el proceso, se le añade al pellet de ADN **la solución hidratante** para su **conservación**.

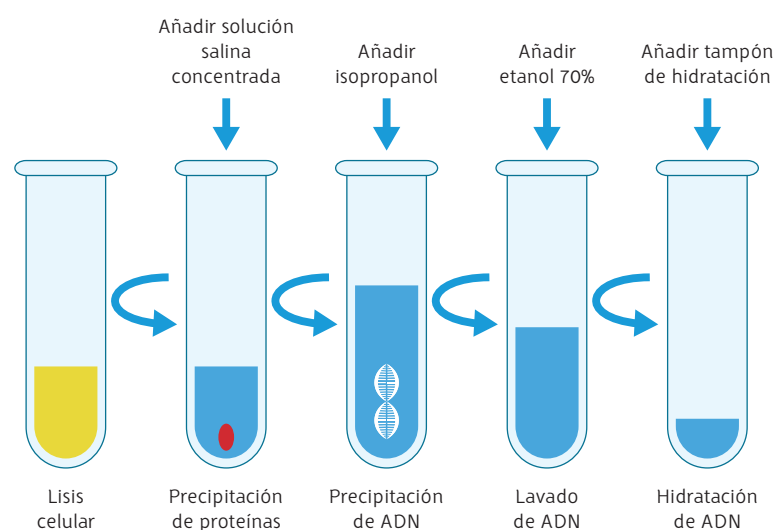


Fig. 3. Proceso de purificación del ADN por salting out. La flecha girada en cada tubo indica centrifugación.

En la purificación de ADN mediante **solventes orgánicos**:

- El primer paso es la **eliminación de las proteínas y lípidos** añadiendo una mezcla de **fenol-cloroformo isoamílico**. Tras añadirla y centrifugar, este reactivo genera una fase orgánica donde se encuentran las sustancias que eliminar y una fase acuosa donde estará disuelto el ADN.
- El segundo paso consiste en eliminar esta fase orgánica y añadir a la fase acuosa **acetato sódico y etanol al 100% para provocar la precipitación del ADN** tras una nueva centrifugación. El ADN se encontrará como pellet y el sobrenadante se eliminará.
- En tercer lugar, se resuspenderá el pellet de ADN con **etanol al 70% para lavar** el resto de las sustancias no deseadas que continúen disueltas en la solución.
- En último lugar, se añadirá el tampón de hidratación o **tampón TE para rehidratar y se conservará el ADN a -20°C**.

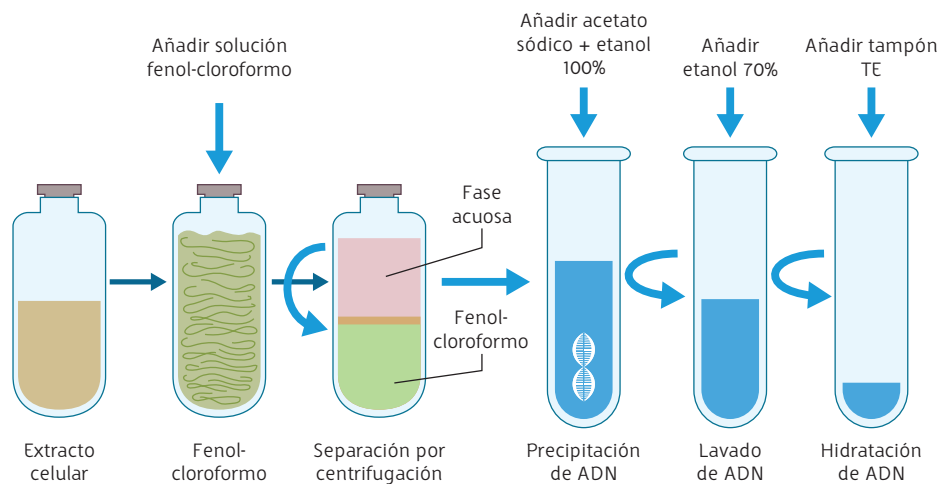


Fig. 4. Proceso de purificación del ADN por solventes orgánicos. La flecha girada en cada tubo indica centrifugación.

IMPORTANTE

El **pellet o botón celular** es la parte sólida compactada que se halla en el fondo de un tubo de reacción como consecuencia de una centrifugación.

El **sobrenadante** es la parte líquida que no precipita tras la centrifugación.

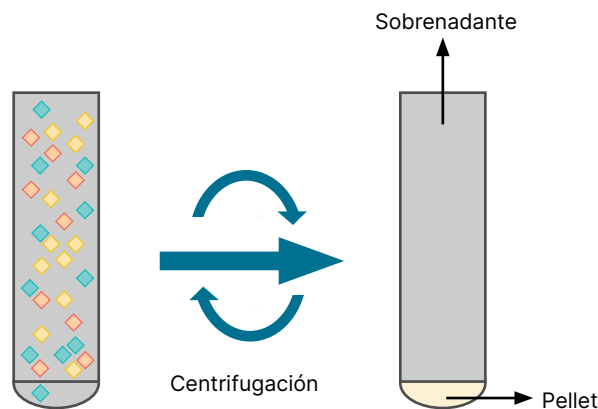


Fig. 5. Representación gráfica del pellet y el sobrenadante.

La purificación de **ADNg por columnas de adsorción** se basa en la adsorción por afinidad química de los ácidos nucleicos a la columna (la mayoría de las veces, recubierta de sílice o vidrio) en presencia de **sales caotrópicas** que generan un ambiente hidrofóbico. Este proceso de cromatografía por adsorción utiliza **membranas recubiertas de sílice o de lana de vidrio** que se localizan dentro de tubos de plásticos, los cuales se acoplan con tubos de tipo Eppendorf. Para llevar a cabo este proceso:

- Primero se cargan las columnas con el lisado y junto con el tampón que contiene las sales caotrópicas. El ADN se une a la membrana, pero los demás componentes celulares no tienen la capacidad de unirse a esta, por lo que una centrifugación permite eliminar la mayoría de los contaminantes en un tubo colector.
- Para asegurar que se eliminan todos los ingredientes del lisado, menos los ácidos nucleicos, se añade etanol al 70% y se centrifuga un par de veces.
- Por último, se elimina el tubo colector de desechos y se añade un nuevo tubo a la columna donde, en presencia de un agente hidratante, como el agua destilada o tampón TE, el ADN se hidrata y se separa de la columna, tras lo que eluye en el tubo colector.

Es importante destacar que se puede utilizar para purificar ADN o ARN.

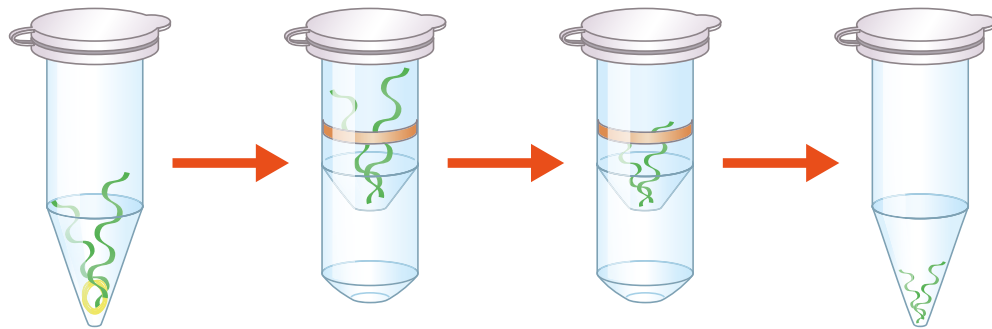


Fig. 6. Purificación por columna de adsorción.

Debido a la gran utilidad de los **plásmidos (ADN circular de pequeño tamaño presente en algunas bacterias)** en diferentes técnicas de biología molecular y a la importancia genética que tiene para algunas **bacterias** (como reservorios de información genética vital para la supervivencia en determinadas circunstancias ambientales como **resistencia a antibióticos o genes de toxicidad**), la **purificación** de este pequeño tipo de ADN bacteriano es ampliamente utilizada en los laboratorios genéticos y microbiológicos. De hecho, existen múltiples técnicas para su purificación, pero la más usada debido a su bajo coste, simplicidad y fácil reproducibilidad es la **lisis alcalina**, la cual se estructura en tres pasos: **crecimiento de las bacterias de interés, extracción del ADN y purificación del ADN plasmídico**.

La purificación del ADN plasmídico por **lisis alcalina** se basa en las diferentes propiedades de la **desnaturalización y la renaturalización** del ADN plasmídico respecto al ADN genómico bacteriano:

- En primer lugar, se **añade NaOH (pH 11) para alcalinizar el medio**, lo que genera una **desnaturalización del ADNg y el ADN plasmídico**.
- En segundo lugar, se añade una **sustancia ácida como el acetato potásico (pH 4,8)** que provoca una **neutralización rápida** del pH del medio. Este paso de neutralización se hace seguido de una centrifugación rápida, lo que generará que a las proteínas y al ADNg no les dé tiempo de renaturalizarse y que acaben precipitando en el fondo del tubo, mientras que **el plásmido**, por su tamaño reducido, **consigue renaturalizarse** y, por ello, mantenerse soluble en el sobrenadante.
- Antes de conservar el ADN plasmídico, se suele añadir la **ribonucleasa A**, un tipo de ARNasas muy eficiente en la eliminación de todo tipo de ARN.

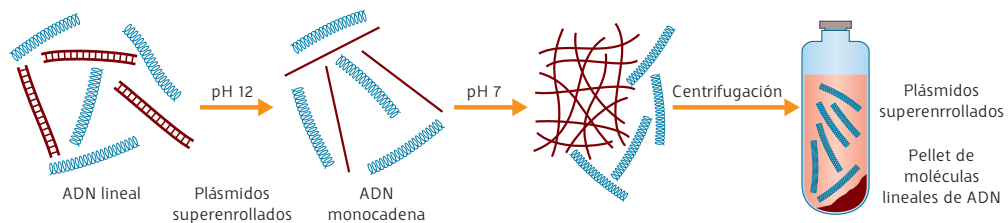


Fig. 7. Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina.

2.2. Purificación de ARN

El ARN se puede extraer de cualquier organismo como bacterias, virus y células eucariotas, pero cuando se trabaja con estas últimas se puede purificar el **ARN total** (conjunto de todos los tipos de ARN existentes en una célula) o el **ARNm** (se purifica con base en su cola poliA mediante el uso de sondas específicas). En la purificación de ARN es **imprescindible evitar la acción de las ARNasas**. Por ello, todos los protocolos tienen como principal objetivo la inactivación rápida de dichas enzimas.

En este subapartado se detallará la **purificación de ARN total por el método de TRI-REAGENT™**, pero existen otros métodos que utilizan sistemas de columnas para la purificación del ARN.

Este proceso utiliza un agente caotrópico como el **tiocinato de guanidinio y fenol**. Su uso provoca que las células se lisen y que las ARNasas se inactiven. Después, se añade cloroformo que genera una fase orgánica (lípidos y proteínas desnaturalizadas) y una fase acuosa con el ARN en suspensión, con lo que el ADN queda en la interfase de la mezcla de purificación.

La purificación de ARN total de células eucariotas **se divide en siete pasos**, según el protocolo adaptado del artículo <https://bit.ly/49XIzYU>:

- 1.** Añadir 500 µL de **TRI-REAGENT** (x2) al lisado celular e incubar 5 min a 21°C (este paso pertenece a la extracción).
- 2.** Añadir 200 µL de **cloroformo** (frío), agitar e incubar 5 min a 21°C.
- 3.** **Separar fase orgánica** de la fase acuosa por centrifugación (15 min a 12.000 g).
- 4.** Se coge la fase acuosa (donde estará el ARN) con cuidado y se pasa a un tubo limpio.
- 5.** Se añaden 500 µL de **isopropanol para la precipitación** del ARN, se incuba 10 min a 21°C y se centrifuga (15 min a 12.000 g).
- 6.** Se elimina el sobrenadante, se **lava el pellet con etanol** al 70-75% y se vuelve a centrifugar.
- 7.** Se disuelve el pellet de ARN en 70 µL de **tampón de hidratación tratado con DEPC** (pH 8). Se incuba 2 min a 60°C si el pellet no se disuelve del todo. Conservar a -70°C.

Como se ha visto durante este apartado, existen algunas diferencias y similitudes entre los reactivos utilizados en la purificación de ADN y ARN. Estos se muestran en la Tabla 3.

PROCESO		ADN	ARN
Extracción		SDS, CTAB, EDTA, proteasas y sales caotrópicas.	Tritón X, tiocianato de guanidinio y fenol.
Purificación	Eliminación de proteínas y lípidos	Solventes orgánicos y sales, cloroformo isoamílico y NaOH.	Cloroformo.
	Precipitación	Acetato sódico, etanol al 100% e isopropanol.	Isopropanol.
	Lavado	Etanol al 70%.	Etanol al 70%.
	Rehidratación	Tampón TE o tampón de hidratación.	Tampón de hidratación tratado con DEPC.
	Conservación	-20°C.	-70°C.

Tabla 3. Reactivos utilizados en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos.

2.3. Sistemas automáticos de purificación

Hoy en día existen diferentes equipamientos que permiten realizar de **manera automatizada** el aislamiento celular, la extracción y la purificación. Este proceso lo **realizan robots** que, junto con el uso de kits, pueden realizar estos procesos de manera autónoma. Estos equipos se suelen encontrar en **hospitales o centros privados** con un alto volumen de muestras biológicas que analizar.

Pese a ser un aparataje **más caro** que el usado en los procesos manuales, esta automatización presenta una serie de **ventajas**:

Más rápidos y eficientes con alto número de muestras.

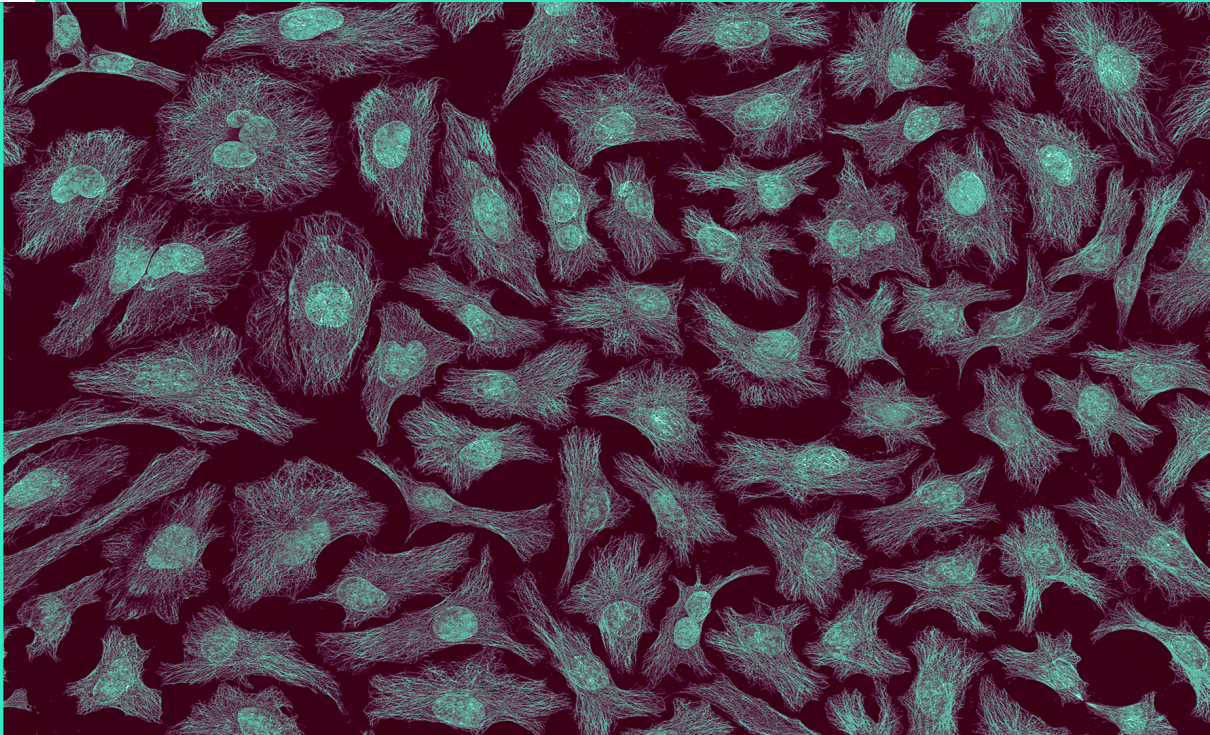
- » Mayor rendimiento y reproducibilidad de los análisis.
- » Evita la contaminación introducida por el técnico.
- » Alta calidad de purificación de los ácidos nucleicos.

IMPORTANTE

Siempre que se realiza la extracción y purificación de ADN, y aún más si se trabaja con el ARN, se debe trabajar bajo estrictas normas de **seguridad y asepsia**, como el uso de guantes durante todo el proceso, trabajar en cabina de flujo laminar, limpiar siempre las superficies con etanol y que todos los reactivos y materiales empleados, incluidas puntas de pipetas, estén certificados como libres de nucleasas.

2

CASO PRÁCTICO



PURIFICACIÓN DE ADNg

Tu supervisor del laboratorio te pide que prepares un protocolo de purificación de ADNg a partir de células HeLa en crecimiento. Para ello, debes nombrar (de manera esquemática) los pasos y los ingredientes que necesitarás en cada fase.

Nota: no hace falta indicar los volúmenes que añadir ni los tiempos de incubación.

SOLUCIÓN

1. Eliminación o precipitación de proteínas y lípidos: fenol-cloroformo isoamílico.
2. Precipitación del ADN: acetato sódico y etanol 100%.
3. Lavado del ADN: etanol 70%.
4. Hidratación y conservación del ADN: tampón TE.

03 Calidad de los ácidos nucleicos y su conservación

Una vez realizada la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, se debe analizar si la muestra **no ha sido degradada** por la acción de las nucleasas. Además, se comprobará si la **concentración** obtenida de ADN o ARN es suficiente para realizar cualquier futura técnica y se determinará si existen algunos **contaminantes**, como proteínas o carbohidratos, que puedan interferir en los próximos estudios. Para ello, se realizan pruebas, **manuales o automatizadas**, que evalúen la calidad de la muestra mediante el estudio de los siguientes parámetros:

- » Integridad.
- » Concentración.
- » Pureza.

Una vez realizadas las técnicas oportunas de evaluación de la calidad, se deberá **conservar** atendiendo a las características individuales que presenta cada tipo de ácido nucleico.

3.1. Integridad

La integridad del ADN o ARN indica **el grado de degradación** de los ácidos nucleicos. Este parámetro se analiza con técnicas **cualitativas como la electroforesis en gel de agarosa**, que permite visualizar varias muestras en único gel a la vez que se obtiene el grado de degradación del ácido nucleico.

Para la medición de la **integridad del ADN** se suelen utilizar geles de agarosa al 0,8%. Si la extracción y la purificación han ido bien, se observa en la calle o carril una única banda claramente definida en la parte superior del gel. En cambio, si existe degradación se verá una estela marcada a lo largo del carril, conocida como **smear**, que indicará, dependiendo de su intensidad, el nivel de degradación del ADN genómico.

En el estudio de la integridad **del ARN total eucariótico** se pueden utilizar geles de agarosa o poliacrilamida. Como el ARN total está compuesto por ARNr (80-85%), ARNt (10%), ARNm (2-5%) y otros tipos (<1%), para obtener **buenos resultados de integridad** se deben observar **dos o tres bandas** claramente definidas que corresponderán a los cuatro tipos de ARNr en eucariotas y a los ARNt (**banda superior → ARNr 28S, banda intermedia → 18S, banda inferior → 5,8S, 5S y ARNt**). Normalmente se observan dos bandas, la superior y la

intermedia. Además, se debe visualizar a lo largo de este carril una **smear** que representará los diferentes tamaños del **ARNm**. En caso contrario, si nuestro ARN está degradado, se observará un ligero *smear* pero sin presencia de las tres bandas del ARNr y el ARNt.



Fig. 8. Análisis de la integridad del ADNg. En el carril 1 se observa una gran cantidad de smear (ADNg muy degradado), en el carril 2 aparece el ADNg en perfectas condiciones sin degradación y en el carril 3 se visualiza un poco de smear (ADNg ligeramente degradado).

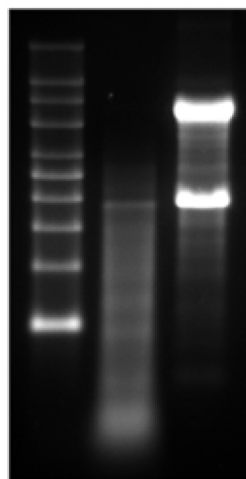


Fig. 9. Análisis de la integridad del ARN total. En el carril 1 se observa el marcador de pesos moleculares, en el carril 2 aparece el ARN degradado y en el carril 3 se visualizan claramente las dos bandas de ARNr y el smear provocado por el ARNm (ARN bien purificado).

IMPORTANTE

El **marcador de pesos moleculares** es un patrón de bandas con tamaños conocidos que permite determinar el peso o longitud de las bandas en cada carril. Suelen estar formados por plásmidos cortados con enzimas de restricción.

3.2. Concentración

Otro parámetro de calidad necesario tras la extracción de los ácidos nucleicos consiste en determinar la **concentración** de ADN o ARN mediante técnicas **cuantitativas**.

Se usa el parámetro físico de la **absorbancia**, que relaciona la concentración de una determinada molécula (ADN o ARN) en solución con la cantidad de luz absorbida por dicha molécula. Este parámetro se mide con equipos de espectrofotometría, como el **Nandrop**. Sabiendo que el pico de absorción de luz de los ácidos nucleicos es de **260 nm**, se utiliza esta longitud de onda para obtener la concentración junto con el uso de factores de conversión, que dependerá del tipo de ácido nucleico utilizado.

Para ADNg de doble cadena, se debe multiplicar la absorbancia obtenida del espectrofotómetro (A_{260}) por el **factor de conversión** (50 $\mu\text{g/mL}$) y, si se ha realizado una dilución previa, por el factor de dilución. Si fuera **ADNss**, el factor de conversión sería de 30 $\mu\text{g/mL}$. Para **ARN**, la fórmula sería igual que la anterior, pero cambiando el factor de conversión a 40 $\mu\text{g/mL}$.

Es importante añadir que se necesita analizar antes la absorbancia del medio en el que disuelve el ácido nucleico, que en la mayoría de los casos será el **tampón de hidratación, cuya absorbancia se mide en 320 nm**. Por ello, para tener medidas precisas se debe restar esta absorbancia a la de 260 nm.

En resumen, la **fórmula** final para el cálculo de la concentración será:

- » Concentración de ADNds = $(A_{260} - A_{320}) \times 50 \text{ mg/mL} \times \text{factor de dilución}$.
- » Concentración de ADNss = $(A_{260} - A_{320}) \times 30 \text{ mg/mL} \times \text{factor de dilución}$.
- » Concentración de ARN = $(A_{260} - A_{320}) \times 40 \text{ mg/mL} \times \text{factor de dilución}$.

Siempre que se analizan muestras con el espectrofotómetro, se debe medir antes la solución donde está disuelto nuestro analito. A esta medida se la conoce como el **blanco** y se debe restar siempre a la absorbancia del analito. La mayoría de los equipos modernos realizan este cálculo de manera automática. La unidad de la absorbancia es adimensional.

3.3. Pureza

El último parámetro que se considera en la calidad de los ácidos nucleicos es la determinación de la relación del ADN o ARN con proteínas y polisacáridos, y la observación de si estos contaminan la muestra.

La **pureza** es el parámetro que determina la ausencia de contaminación. Se usa la absorbancia para poder medir la presencia o ausencia de proteínas o polisacáridos en la muestra recién extraída.

Para **evaluar la pureza**, se debe medir previamente la absorbancia del ácido nucleico (260 nm) y comprobar su relación con la cantidad de luz absorbida por proteínas (280 nm) o carbohidratos (230 nm). Al igual que con la concentración, se debe restar la medición de 320 nm a cada una de las medidas. Para condensar la información de las diferentes relaciones de pureza, para el ADN y el ARN, estas se resumen en la Tabla 4.

RELACIÓN DE PUREZA		INTERPRETACIÓN
$(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$ ADN versus proteína	Valor entre 1,7 y 2	Indica que la pureza del ADN es la correcta .
	Valor <1,65	Contaminación por proteínas , así que se debe repetir la purificación o añadir proteinasas para disminuir la concentración de proteínas.
	Valor >2,1	Alta cantidad de ARN en la muestra. Se deberán añadir ARNasas.
$A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$ ARN versus proteína	Valor entre 1,8 y 2,1	Indica que la pureza del ARN es la correcta .
	Valor <1,7	Contaminación por proteínas .
	Valor >2,2	Alta concentración de ADN, repetir purificación .
$(A_{260} - A_{320}) / (A_{230} - A_{320})$ ADN o ARN versus polisacáridos	Valor entre 1,5 y 2,2	Indica que la pureza del ADN o ARN es la correcta .
	Valor <1,4	Contaminación por carbohidratos . Con varios lavados de etanol, sería suficiente para eliminar los azúcares.
	Valor >2,3	Alta cantidad de ARN o ADN , dependiendo del ácido nucleico analizado.

Tabla 4. Cocientes de relación para la evolución de la pureza en los ácidos nucleicos.

3.4. Conservación

Tras finalizar los procesos de obtención de los ácidos nucleicos y comprobar su calidad, se suele almacenar una parte (alícuota) del contenido de la muestra para estudios posteriores. El objetivo de la **conservación** del ADN y el ARN es mantener las condiciones de viabilidad e integridad de dichas moléculas y evitar posibles degradaciones durante largos periodos de tiempo. Para ello, se suelen almacenar en tubos libres de nucleasas y se disuelven en tampones de conservación (bajos en sales) junto con sustancias crioprotectoras, como algunos alcoholes.

El **ADN** se almacena a **4°C** si se usa ese mismo día o durante la semana de la obtención de este. En cambio, para tiempos a medio plazo (meses) se almacena a -20°C y para tiempos mayores (años o de forma indefinida) se aconseja guardarlos a -80°C en ultracongeladores.

Debido a su alta inestabilidad y fácil degradación, se aconseja almacenar el **ARN** directamente a **-20°C** (para cortos periodos de tiempo) o a -80°C (para largos tiempos de conservación).

Cuando se trabaja con muchas muestras, es fácil equivocarse si no existe una buena trazabilidad en el almacenamiento. Por esto se deben identificar siempre todas las muestras con etiquetas y llevar un estricto control informatizado de estas.

Existen algunos métodos ampliamente utilizados para **garantizar la trazabilidad** de las muestras:

- Rotular con tinta resistente a bajas temperaturas y a solventes orgánicos.
- Utilizar etiquetas resistentes a bajas temperaturas o grabados en códigos de barras cuando se trabaje con un alto volumen de muestras.
- Usar codificación 2D para identificar con escáneres las diferentes muestras y garantizar así la protección de los datos del paciente.

3

CASO PRÁCTICO



PUREZA DEL ADN

Tras purificar el ADN, te piden que calcules la pureza de la muestra para observar si existe contaminación por proteínas, todo ello sabiendo que la fórmula es la siguiente: $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$

Explica qué significa obtener un valor de 1,5 en la fórmula anterior. ¿Qué relación existe entre la cantidad de proteína y la cantidad de ADN en la muestra?

SOLUCIÓN

- Tener un valor de 1,5 significa que existe contaminación por proteínas.
- Se debe repetir la purificación o añadir proteinasas para disminuir la concentración de proteínas.
- La relación indica que hay un 50% más de ácido nucleico que de proteína.

X T A R T
FP SALUD