

## MARCADORES MOLECULARES Y LA EXTRACCIÓN DE ADN

### MOLECULAR MARKERS AND THE DNA EXTRACTION

REINALDO VELASCO MOSQUERA<sup>1</sup>

#### **PALABRAS CLAVE:**

Marcadores moleculares, extracción de ADN, biología molecular, diversidad genética.

#### **KEY WORDS:**

Molecular markers, ADN extraction, PCR, molecular biology, genetic diversity.

#### **RESUMEN**

*En el presente artículo se hace una breve descripción de los marcadores moleculares y de las categorías y técnicas basadas en hibridación y en la reacción en cadena de la polimerasa PCR. A continuación se hace una explicación detallada del método de extracción de ADN empleado en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, para los estudios de diversidad genética, enfatizando en las reacciones que ocurren a lo largo del proceso de extracción.*

#### **ABSTRACT**

*In the present article a brief description of molecular markers, the categories and techniques based on hybridizing and the chain reaction of polymerase PCR is done. Next it is explained thorough of the ADN extraction method for the genetic diversity studies employed in the molecular biological laboratory of the National University, headquarters Palmira, emphasizing in the reactions that occurs throughout the extraction process.*

#### **INTRODUCCIÓN**

Los marcadores moleculares o marcadores ADN revelan sitios de variación naturales a nivel de secuencia de ADN. A diferencia de los

marcadores controlados por genes asociados a caracteres morfológicos (fenotipos de fácil identificación visual), las variaciones en los marcadores de ADN no se muestran por sí mismas en el fenotipo,

---

Recibido para evaluación: Diciembre 10 de 2004. Aprobado para publicación: Febrero 10 de 2005.

1 M. Sc. Especialista en Biotecnología, Grupo de Investigación ASUBAGROIN FCA Unicauca.

Correspondencia: biotecnologia@unicauca.edu.co

porque pueden ser diferencias en un solo nucleótido del gen o en un pedazo de ADN repetitivo.

Los marcadores moleculares relacionados a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar individuos que contengan esa característica y diferenciarlos de los que no la posean, es decir que dan información sobre la diversidad genética. Esto es un aspecto esencial en el campo de la biología tanto aplicada como fundamental: Ecología, Biología de la Evolución, Taxonomía, Agronomía, Biotecnología, Microbiología, Genética, etc (1).

Un gran número de técnicas moleculares puede ser utilizado para obtener marcadores de diversidad mediante la detección de polimorfismo a nivel de ADN (2).

La mayoría de los marcadores moleculares se clasifican en dos categorías de técnicas que se basan en la hibridación o en la Reacción en Cadena de la Polimerasa. PCR:

#### **Marcadores detectados por hibridación.**

Dentro de estos se agrupan las técnicas que emplean sondas para la detección de los marcadores. Las sondas son fragmentos de ADN o ARN que contienen el código complementario para una secuencia específica del genoma. Las técnicas más usuales son: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Número variable de repeticiones en tandem (VNTR) y ADN-Ships (Oligonucleotide arrays) (1).

#### **Marcadores basados en la PCR.**

Los marcadores identificados por amplificación del ADN están basados en la reacción en cadena de la polimerasa. La introducción de esta tecnología permitió nuevas posibilidades para la detección del polimorfismo genético (3). El polimorfismo se observa debido a que la variación en la secuencia del genoma altera los sitios de reconocimiento del "primer". Permite la generación de grandes números de marcadores, su utilización no es técnicamente difícil y solo utiliza mínimas cantidades de material genético. Las técnicas basadas en la PCR difieren entre sí en la longitud y secuencia de los primers empleados, condiciones de la PCR y en el método de separación y detección de los fragmentos. Los marcadores de PCR emplean primers de secuencia arbitraria, semiarbitraria o específica.

La selección de la técnica depende del objetivo trazado. Las técnicas moleculares brindan información a diferentes niveles. Todas tienen sus limitaciones y su aplicación se determina en gran medida por la disponibilidad de los recursos necesarios para ejecutar un sistema de marcadores moleculares. Entre los factores más importantes a considerar están el contenido de información y el radio múltiple que cada técnica puede brindar. El contenido de información es el número de alelos que pueden ser detectados por el marcador en un grupo de individuos. El radio múltiple es el número de marcadores que pueden ser generados en una simple reacción (1).

#### **EXTRACCION DE ADN**

La aplicación de las diferentes técnicas empleadas en biología molecular para el análisis del genoma, depende en gran medida de la habilidad para extraer el ADN. Para lo cual se utilizan diversos métodos de extracción, dependiendo del tipo de tejido a emplear. En el presente trabajo se describirá el método de extracción de ADN de robles colombianos Dellaporta (4) modificado, el cual ha dado buenos resultados en los trabajos con plantas adelantados en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional sede Palmira (5).

Uno de los problemas al trabajar con plantas es la composición de la pared celular, la cual dificulta el acceso al interior para la extracción de todo su contenido, incluyendo el ADN. Dicha pared se debe romper por acción mecánica, pulverizando el tejido con hielo seco o con nitrógeno líquido (6).

En seguida, se deben destruir las membranas celulares de manera que el ADN, acompañado de otros compuestos (proteínas, enzimas, carbohidratos), quede disponible.

La mezcla de tejido así obtenida se agrega a una solución buffer o tampón de extracción, en presencia de agentes quelantes, de soluciones de baja o alta fuerza iónica (para que sea soluble el ADN) (7) y de altas concentraciones de NaCl. Los agentes quelantes (como el EDTA) se emplean para proteger el ADN de la acción de enzimas nucleasas; ellos capturan los iones magnesio y no permiten que actúen como cofactores de las nucleasas. Las altas concentraciones (5 M) de NaCl se emplean para prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos que afectan la pureza del ADN, pudiendo inhibir la actividad de algunas enzimas como

polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción; la base para la separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos, es su solubilidad diferencial en presencia de las altas concentraciones de NaCl los polisacáridos precipitan bajo la acción de fuerzas centrifugas. A la mezcla anterior se agrega un detergente aniónico como el SDS (sodio dedecil sulfato), que solubiliza proteínas, tejidos y membranas, evitando que una cantidad significativa de ADN quede atrapada en los desechos o restos celulares. Para prevenir que el ADN extraído presente coloración gris o parda, la cual se debe a la actividad de polifenoloxidasas presentes en algunos tejidos, se incluye en el buffer de extracción P.V.P (polivinil pirrolidona)(6).

Para separar las proteínas, se lleva la mezcla de tejido con el tampón a incubación a 65°C con lo cual se desnaturizan las proteínas. Para retirar las proteínas denaturadas y la mayoría de los polisacáridos, se agrega una sal como el acetato de potasio frío. Por centrifugación se separan tejidos, membranas, polisacáridos y proteínas de los ácidos nucleicos, los cuales quedan en el sobrenadante.

Finalmente hay que separar el ADN de la fase acuosa, para lo cual se debe precipitar el mismo, usando un alcohol como el isopropanol, el cual es selectivo en la precipitación del ADN en presencia de ARN. Después de precipitado el ADN se disuelve en una solución tampón (TE de pH 8.0) o en agua bidestilada. El ARN se remueve adicionando enzima RNAasa a la solución.

A continuación se detallan los pasos que se siguieron en la extracción de ADN de Heliconias, en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional sede Palmira.

#### Preparación de Soluciones Madre

Se indica para qué se utiliza cada reactivo y la forma de prepararlo.

**TRIS** (Hidroximetil amino metano). Es un tampón biológico, cuya función es mantener el pH de la solución constante (pH 7.0 – pH 8.0). Se prepara a pH 8.0. El peso molecular del TRIS es 121.14 gr. / grmol. Se van a preparar 100 ml de solución madre de tris de concentración 1M

Cálculos:  $100 \text{ ml} \times 121.14 \text{ gr. / mol} \times 1 \text{ mol/1000 ml} = 12.114 \text{ gr. de TRIS}$

Se pesan 12.114 gr. de TRIS y se agregan poco a poco a 70 ml de agua bidestilada, previamente colocados en un frasco de autoclavado limpio. Se coloca la solución en el pHmetro y se ajusta el pH a 8.0 con HCl. Luego se completa el volumen a 100 ml. Se autoclava la solución y se guarda a 4°C.

**EDTA** (Ácido etilen diamino tetra acético). Es un agente quelante de iones metálicos como  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Inhibe la acción de las nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad y así protege al ADN. Se prepara a pH 8.0. El peso molecular del EDTA es 372.24 gr. / grmol. Se van a preparar 100 ml de solución madre de EDTA de concentración 0.5 M

Cálculos:  $100 \text{ ml} \times 372.24 \text{ gr. / mol} \times 0.5 \text{ mol/1000 ml} = 18.612 \text{ gr. de EDTA}$

Se pesan 18.612 gr. de EDTA y se agregan poco a poco a 70 ml de agua bidestilada, previamente colocados en un frasco autoclavado limpio. Se coloca la solución en el pHmetro y se ajusta el pH a 8.0 con perlas de Hidróxido de sodio. Si se pasa el pH se agrega HCl en la cámara de extracción de gases. Luego se completa el volumen a 100 ml. Se autoclava la solución y se guarda a 4°C.

**NaCl** (Cloruro de sodio). Las sales aumentan el poder iónico de la solución y ocasionan la precipitación del ADN. El peso molecular del NaCl es 58.44 gr. / mol. Se van a preparar 100 ml de solución madre de NaCl de concentración 5 M.

Cálculos:  $100 \text{ ml} \times 58.44 \text{ gr. /mol} \times 5 \text{ mol/1000 ml} = 29.22 \text{ gr. de NaCl}$

Se pesan 18.612 gr. de NaCl y se agregan poco a poco a 70 ml de agua bidestilada, previamente colocados en un frasco de autoclavado limpio. Luego se completa el volumen a 100 ml. Se autoclava la solución y se guarda a 4°C

**MERCAPTOETANOL** Es un antioxidante, escinde enlaces disulfuro y forma disulfuros. Se usa para ayudar en la desnaturalización de estructuras ricas en GC. Es generalmente usado en caso de que la plantilla tenga largas secuencias de G y C. Es generalmente usado como un agente anti-oxidante / reductor y estabiliza las enzimas.

**SDS** (Dodecil sulfato de sodio) Es un detergente aniónico que actúa como agente solubilizante de proteínas y de componentes de tejidos y membranas

**ACETATO DE POTASIO** ( $C_2H_3KO_2$ ). Precipita proteínas. El peso molecular es 98 gr. / grmol. Se van a preparar 100 ml de concentración 5 M

#### Preparación del buffer de extracción.

El buffer de extracción de heliconias tiene la siguiente composición:

TRIS	100 mM
EDTA	50 mM
NaCl	500 mM
PVP	1% (p/v)
?-mercapto etanol	2% (v/v)

Se preparan 50 ml de buffer de extracción a partir de las soluciones madre. Mezclar las siguientes cantidades para obtener las concentraciones deseadas:

TRIS	5 ml
EDTA	5 ml
NaCl	5 ml

Cálculos: Para hallar el volumen de solución madre que se debe tomar para preparar 50 ml de buffer de extracción se parte de la ecuación:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \implies V_2 = V_1 C_1 / C_2$$

Para 50 ml TRIS 100 mM	$V_2$
$= 50 \text{ ml} \cdot 100 \text{ mM} / 1000 \text{ mM} =$	5 ml
Para 50 ml EDTA 50 mM	$V_2$
$= 50 \text{ ml} \cdot 50 \text{ mM} / 500 \text{ mM} =$	5 ml
Para 50 ml NaCl 500 mM	$V_2$
$= 50 \text{ ml} \cdot 500 \text{ mM} / 5000 \text{ mM} =$	5 ml

Se ajusta el volumen a 50 ml con agua destilada. Se agregan 0.5 gr. (1% (p/v)) de PVP (Polivinil Pirrolidona) agitando la solución con el agitador magnético. En seguida se agregan 2 ml de ?mercaptoetanol. De esta solución se utilizan 800 ?l por cada muestra de ADN. Si se preparan 30 ml de cada una de las soluciones madre para los reactivos: Tris HCl 1M, EDTA 0.5 M y NaCl 5 M, se pueden realizar 375 extracciones de ADN.

Todas las soluciones se guardan en el refrigerador hasta su posterior utilización.

#### Obtención de muestras

Se coleccionaron muestras de hojas de plantas del orden zingiberales, de brotes recientes provenientes de la reserva natural NIRVANA y de la colección que se posee en el Invernadero de la Universidad Nacional sede Palmira

#### Extracción

La extracción de ADN se basó en la metodología estandarizada para la extracción de ADN de robles colombianos DELLAPORTA modificado:

1. Preparar un baño a 65°C y colocar el buffer de extracción
2. Marcar los tubos ependorf de 1.5 ml (dos juegos iguales)
3. Macerar de 20 a 30 mg de tejido foliar joven pero maduro en Nitrógeno Líquido
4. Transferir el tejido a un tubo de 1.5 ml usando una espátula limpia y bañada en etanol
5. Adicionar 800 ?l de buffer de extracción y 55 ?l de SDS al 20%
6. Mezclar bien el tejido con el buffer usando vortex o una punta limpia
7. Incubar a 65°C por 20 minutos, invirtiendo los tubos periódicamente
8. Adicionar 250 ?l de acetato de potasio 5 M frío y mezclar
9. Incubar en hielo 20 min. en agitación
10. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos
11. Transferir 800 ?l del sobrenadante a un tubo nuevo marcado
12. Adicionar 640 ?l de isopropanol frío y mezclar 8-10 veces
13. Incubar a -20 °C por 2 horas
14. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos
15. Remover el isopropanol y secar las gotas con toalla
16. Adicionar 500 ?l de  $T_{10}E_1$  e incubar a 65°C por 15 minutos, mezclar
17. Adicionar 400 ?l de isopropanol y mezclar 8-10 veces
18. Incubar a -20°C por 2 horas
19. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos
20. Remover el isopropanol
21. Dejar secar 1 hora sobre una toalla. Secar las gotas con toalla
22. Resuspender en 80 ?l de  $T_{10}E_1$  (Tris 10 mM, EDTA 1 mM)
23. Adicionar 1 ?l de RNAsa (10 mg/ml), hacer un corto spin 12000 rpm 1 minuto
24. Guardar a 4 °C

**REFERENCIAS**

- (1) Cornide M.T., DIVERSIDAD GENETICA Y MARCADORES MOLECULARES. CNIC, La Habana, 2000
- (2) Tautz D., HYPERVARIABILITY OF SIMPLE SEQUENCES AS A GENERAL SOURCE FOR POLYMORPHIC DNA MARKERS. Nucleic Acids Research 17, 6463-6471. 1989
- (3) Mullis K.B., THE POLYMERASE CHAIN REACTION, Birkhauser, Boston 1994
- (4) Dellaporta S.L., Wood J. And Hicks J.B., A PLANT DNA MINIPREPARATION: VERSION II. Plant Molecular Biology Reprter 1(14):19-21, 1983
- (5) Velasco Mosquera R, PRINCIPIOS DE LAS TECNICAS MOLECULARES BASADAS EN PCR, Universidad Nacional Sede Palmira. 2004
- (6) Rogers S.O., Bendish A.J., EXTRACCION OF DNA FROM PLANT TISSUES. Plant Molecular Biology Manual. A6:1-10. Kluwer Academic Publishers, Belgium, 1988
- (7) Howell S.H., THE ISOLATION AND ANALYSIS OF DNA FROM EUKARYOTIC CELLS. In Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology, Chrispeels M.J., Ed. Wiley-Interscience Publication, NY p 127-130., 1973