

## EXTRACCIÓN DE ADN Y OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO



### OBJETIVOS:

1. El objetivo fundamental de esta práctica es utilizar una sencillas técnicas (extracción, filtración, precipitación y tinción) para poder extraer el ADN de un tejido animal y por el aspecto que presenta, confirmar su estructura fibrilar.
2. A partir de la longitud enorme de las fibras también se confirma que en el núcleo el ADN se encuentra superenrollado o replegado.
- 3.

### MATERIALES

- 20g de gónada de mejillones o de timo o, en su defecto, de hígado de ternera o de pollo. Un cuchillo o una tijera.

- 1 homogenizador (batidora de cocina o, en su defecto, un mortero de laboratorio con arena lavada)
- 1 Varilla de vidrio
- 1 Mortero
- Vasos de precipitados de 250 cm<sup>3</sup>
- 1 Pipeta de 200 cm<sup>3</sup>
- Alcohol etílico de 96°
- Cloruro sódico 2M
- 1 embudo
- Gasas cuadrangulares (10 x 10 cm) o trocito de tela para filtrar
- SDS (dodecil sulfato sódico) o, en su defecto, detergente I
- 1 microscopio
- portaobjetos y cubreobjetos
- Orceína acética (1%) o hematoxilina

### PROTOCOLO.

1.- Durante los meses de enero y febrero el material más recomendable es el **mejillón** (*Durante esos meses, la gónada es muy voluminosa e invade el manto, por lo que separando las masas que quedan adheridas a las conchas al abrirlo, se puede obtener fácilmente unos 10 g de gónadas. Se deben utilizar individuos de color rosado, que son las hembras, y no los de color blanquecido, que son los machos, ya que el ADN del núcleo de los espermatozoides, está muy fuertemente unido a las protaminas, por lo que es más difícil de separar*). En su defecto pueden utilizarse unos 20 g de **timo de ternera** (*las células del timo son muy apropiadas porque el núcleo ocupa más de la mitad de la célula*).

2.- Cortar el material elegido, mediante una tijera, en trocitos pequeños, introducirlos en la batidora o, en su defecto, en un mortero de laboratorio que contenga arena lavada, añadir 100

cm<sup>3</sup> de agua y triturar el material hasta que quede una masa homogénea y semilíquida. FIGURA

3.- Esperar unos minutos a que sedimenten las partículas más grandes y luego filtrar el sobrenadante a través de dos gasas juntas. Recogerlo en el vaso de precipitados. Repetir el filtrado hasta que el sobrenadante no contenga partículas sólidas (fibras conjuntivas, células musculares, vasos sanguíneos, etc.) FIGURA

4.- Añadir a la probeta un volumen igual de NaCl 2M con el fin de producir un medio hipertónico que provoque la ruptura de las envolturas nucleares. Su contenido (Fibras de cromatina) quedará liberado en el medio. FIGURA

5.- Añadir SDS, dodecil sulfato sódico (CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-OSO<sub>3</sub>Na), al 10%, hasta que el conjunto alcance un 2% en SDS. Se debe hacer un tanteo para deducir cuál es la proporción más adecuada. Agitar la mezcla suavemente con una varilla de vidrio, y dejar reposar cinco minutos. El detergente provoca la separación entre el ADN y las proteínas al formar un complejo con estas últimas. Anotar lo que sucede. FIGURA (Si NO se dispone de este producto puede sustituirse por un detergente de vajillas; tipo Mistol o similar)

6.- Añadir lentamente resbalando por las paredes del vaso, mediante una pipeta, 60cm<sup>3</sup> de metanol o de alcohol etílico de 96° frío, de manera que se formen dos capas. Introducir con cuidado una varilla de vidrio, y hacerla rotar suavemente y en la misma dirección. Se podrá observar la formación de unos filamentos blancos de ADN en la interfase, que se van enganchando y enrollando a la varilla. FIGURA

7.- Con la misma varilla depositar algunos de estos filamentos sobre un portaobjetos, añadir unas gotas de orceína acética o de hematoxilina, y dejar que se tiñan durante unos cinco o diez minutos. A continuación, lavar la preparación con agua destilada, cuidando de no arrastrar las fibras de ADN, secar los bordes, añadir una gota de glicerina, poner un cubre y observar al microscopio. FIGURA

8.- Las fibras de ADN presentan una coloración morada, mientras que el resto del material es de color marrón. FIGURA

Ester Alonso 28/01/03