

Obtención rápida de ADN del bacteriófago lambda

ALEJANDRO SILVA

Centro de Investigaciones Biológicas
Apartado postal 6996,
La Habana, Cuba

La molécula de ADN del bacteriófago lambda ha sido una de las más utilizadas y estudiadas en la genética molecular.

Esto ha sido posible por toda una serie de métodos que permiten obtener el ADN de este virus bacteriano con relativa facilidad. Estos métodos incluyen tanto los procedimientos con fines analíticos como las técnicas cuyo propósito es obtener suficiente material para posteriores manipulaciones genéticas (fines preparativos).

Nuestro laboratorio ha introducido algunas modificaciones que permiten obtener minipreparaciones de ADN del bacteriófago lambda de forma rápida con la suficiente pureza para ser empaquetado y digerido por enzimas de restricción sin mayores dificultades.

El procedimiento parte de un lisado que debe tener como mínimo 5×10^9 partículas virales por mililitro y consiste en:

1. Tome 400 μ l del lisado y deposítelos en un tubo eppendorf de 1.5 ml de capacidad.
2. Añada desoxirribonucleasa y ribonucleasa a una concentración final de 1 μ g/ml cada una e incube por 30 min a 37°C.
3. Añada 50 μ l de una solución de tris 2M pH = 8.5, EDTA 0.2M. Mezcle invirtiendo el tubo.
4. Añada 10 μ l de SDS al 10 por ciento, mezcle invirtiendo el tubo.
5. Incube por 5 min. a 70°C.
6. Añada 50 μ l de acetato de potasio 3M. Mezcle invirtiendo el tubo.
7. Incube por una hora en hielo.
8. Centrifugue por 15 min. a 4°C.
9. Tome el sobrenadante teniendo cuidado de no coger nada del pellet y traspáselo a un nuevo tubo eppendorf.
10. Añada 0.1 volúmenes de buffer TES (10X), (100mM Tris HCl pH=8, 100 mM NaCl, 10mM EDTA).
11. Adicione igual volumen de fenol saturado con el buffer TES 1X. Mezcle invirtiendo el tubo suavemente para lo cual puede utilizar un equipo que garantice el cambio de posición del mismo y de esta forma una mezcla efectiva del contenido durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Evite movimientos bruscos durante este procedimiento.

12. Centrifugue por 2 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente.
13. Tome la fase superior (acuosa) sin coger nada de la fase orgánica y traspásela a un nuevo tubo. Añada igual volumen de una mezcla de fenol-cloroformo (50:50) y mezcle repitiendo las mismas condiciones que en el paso 11.
14. Centrifugue 2 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente.
15. Tome la fase superior como en el paso 13 y traspásela a un nuevo tubo. Añada igual volumen de cloroformo, mezcle repitiendo las mismas condiciones del paso 11.
16. Centrifugue por 2 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente.
17. Tome la fase superior como en el paso 13 y traspásela a un nuevo tubo. Añada etanol absoluto a temperatura ambiente hasta llenar el tubo. Invierta para mezclar. El ADN precipitará inmediatamente.
18. Centrifugue por 5 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente.
19. Retire el etanol y añada al pellet 500 μ l de etanol al 70 por ciento a -20°C , agite por 1 minuto sin temor a desprender el pellet de las paredes del tubo.
20. Centrifugue por 5 minutos a temperatura ambiente.
21. Retire el sobrenadante. Tenga cuidado no llevarse el pellet pues en ocasiones no queda firme.
22. Añada el pellet 500 μ l de etanol a 70 por ciento a una temperatura de -20°C , agite por 1 minuto sin temor a desprender el pellet de las paredes del tubo.
23. Repita los pasos 20 y 21.
24. Seque al vacío por 3 minutos.
25. Disuelva el pellet en 50 μ l de buffer TE (Tris, 10mM, pH=8, EDTA 0.2mM) tome 2 μ l y aplique en un gel de agarosa 0.8 por ciento, efectúe la electroforesis a 80 volts. Use buffer tris- acetato.

COMENTARIOS

- a) Según el título del lisado el rendimiento debe ser de 500 ng a 1 μ g. Cantidades entre 500 ng y 1 μ g permiten, utilizando minigeles, realizar análisis de restricción del ADN que se obtenga, incluso minisouthern.
- b) El SDS al 10 por ciento y el acetato de potasio no son esterilizables. Las demás soluciones pueden ser esterilizadas y guardadas a 4°C por largo tiempo.
- c) No seque excesivamente los pellet de ADN de lambda pues éste no se disolverá con facilidad.
- d) Al retirar los sobrenadantes etanólicos (pasos 19, 21 y 23) asegúrese de sacarlo todo pues con ésto garantiza que quede la menor cantidad de sales, y restos fenólicos posibles que más adelante inhibirán las enzimas de restricción.
- e) Cuando añada el buffer TE (paso 25), no agite fuerte para disolver, incube el ADN en hielo y agite suavemente de forma intermitente. Este paso puede durar 30 minutos a 1 hora. Así evita la ruptura de la molécula de ADN de alto peso molecular.
- f) No congele nunca el ADN de lambda. Puede ser guardado en buffer TE a $+4^{\circ}\text{C}$, durante largos períodos de tiempo.
- g) Este procedimiento permite la obtención de varias muestras de ADN a la vez. Por ejemplo 24 obtenciones han sido procesadas en un total de 6 horas; lo que indica la rapidez y sencillez de la metodología.