Técnicas

Elución de fragmentos de ADN en geles de agarosa

LIC. SERGIO PEREZ TALAVERA
Centro de Investigaciones Biológicas
Apartado 6996, Ciudad de La Habana, Cuba

Es nuestro interés presentarles algunas observaciones basadas en nuestra experiencia en el laboratorio, relacionadas con este paso fundamental en el trabajo rutinario de Ingeniería Genética.

En el laboratorio hemos ensayado, en el transcurso de cuatro años, diferentes técnicas reportadas para la elución de ADN de geles de agarosa.

- Congelación y descongelación del fragmento de agarosa seguido de un aplastamiento por centrifugación (J. Langridge y col., 1980).
- 2do. Electroelución en sacos de diálisis (Mc Donnel y col., 1977, T. Maniatis y col., 1982).
- 3ro. Elución por electroforesis contra papel Whatman DEAE 81 (G. Dietzen y col., 1981).
- Extracción de agarosa de bajo punto de fusión usando fenol (Weislander, 1979, Maniatis, 1982).
- 5to. Elución usando la capacidad de adsorción del polvo de vidrio al ADN.
- 6to. Un método recientemente publicado en que se usa una filtración centrífuga en membrana de Durapore.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta para evaluar un método de este tipo es la calidad del ADN que se obtiene después de la extracción. Esta calidad está dada por su integridad, la facilidad de ser digerido por endonucleasas de restricción, ser ligado, fosforilado y desfosforilado, y que sirva como sustrato para la ADN polimerasa en el marcaje por "Nick Traslation", etcétera.

A continuación analizamos la facilidad y rapidez del método, factores también a tener en cuenta, los métodos No. 4 y No. 5 son los más sencillos y requieren menos trabajo; además, en cuanto a recuperación de material, ambos son igualmente eficientes para concentraciones altas de ADN en la tira de agarosa. El método de filtración es más eficiente en cuanto a recobrado, sin embargo para cantidades pequeñas, el paso de la precipitación etanólica disminuye el rendimiento hasta el 50 por ciento.

Sin embargo, el polvo de vidrio tiene varios detalles que pueden hacerlo un método no generalizable. En primer lugar no todas las preparaciones de polvo funcionan con igual eficiencia, siendo necesario entonces probar muchas preparaciones diferentes; cuando una funcione adecuadamente debe adquirirse y prepararse un lote grande. Tampoco es adquirible comercialmente.

Otra cuestión que se debe tener en cuenta es que los fragmentos de ADN de longitud inferior a 300 pb no se adsorben al polvo, luego es además útil para separar en mezclas de fragmentos

No.	Método	Calidad ADN	Rapidez	Recobrado	Manipulación
1	congelación, descongelación	aceptable	media	bajo	complicada
2	electroelución	buena	rápido	regular	complicada
3	electroforesis contra DEAE 81	muy buena	media	regular	aceptable
4	extracción de agarosa con fenol	regular	muy rápido	bajo	sencilla
5	adsorción a polvo de vidrio	muy buena	rápido	alto	sencilla
6	filtración en Durapore	buena	muy rápido	alto	sencilla

TABLA COMPARATIVA DE LOS METODOS DE EXTRACCION DE ADN DE GELES DE AGAROSA

de diferentes longitudes aquellos fragmentos cortos producto de digestiones con dos enzimas, como por ejemplo cuando se usan materiales biológicos (plásmidos fagos, etcétera), en los cuales hay insertados poliadaptadores con secuencias para varias enzimas.

A continuación describimos el método de filtración en Durapore (Millipore GVWP 04700) publicado por J. Zhen en noviembre de 1985 en *Biotechnology*, con algunas observaciones según nuestra experiencia:

- Se realiza la separación mediante electroforesis en agarosa.
 Observaciones: cualquier agarosa (grado electroforético) puede ser usada.
- Se corta el fragmento de agarosa incluyendo la banda que se desea purificar, previamente identificada por su fluorescencia bajo irradiación UV, usando 0,5 mg/ml - 0,2 mg/ml de bromuro de etidio.
 - Observaciones: El ADN debe someterse el menor tiempo posible a la irradiación UV para evitar cortes en la doble cadena.
- 3. Se prepara un cono con la membrana previamente humedecida en agua destilada y se introduce en un tubo Eppendorf, el cual fue cortado 2-3 mm por encima de su parte cónica y con un pequeño agujero por el fondo.
- 4. Se introduce el fragmento de gel dentro de este cono, todo lo cual se coloca sobre la boca de otro tubo Eppendorf donde se colectará el ADN.
 - Observaciones: Toda esta manipulación es necesario realizarla con guantes; el cono de la membrana debe introducirse lo más al fondo posible.
- 5. Se centrifuga a 3 000 rpm x 1 min primeramente, y después a 12 000 rpm x 5 min en una centrífuga tipo Eppendorf.
 - Observaciones: El primer tiempo a 3 000 rpm es necesario para que el cono de la membrana se pegue al fondo del tubo recortado; si esto no ocurre se puede perforar la membrana, en ese caso es necesario preparar un cono nuevo y volver a filtrarlo, dentro del cono de la membrana quedan (visibles) los restos de agarosa.
- 6. Se adiciona al volumen colectado ¹/₂ volumen de fenol-cloroformo (1:1) saturado en buffer TE (Tris 10 mM, 1mM EDTA). Se agita en vortex por 1 min, se centrifuga y se colecta la fase acuosa en otro tubo.
 - Observación: Este paso y el siguiente no son estrictamente necesarios, pero hemos observado que elimina restos de contaminación de agarosa que en ciertos casos pueda traer problemas en la posterior manipulación del ADN.
- A la fase acuosa se adiciona I volumen de butanol saturado con NH₄ AcO IM, se agita, centrifuga y se elimina la fase butanólica.

- Se adicionan 0.5 volúmenes de NH₄ A_cO 1M y 2,5 volúmenes de etanol (-20°C) se coloca por 30' en hielo seco.
- Se centrifuga por 5'a 12 000 rpm, se elimina el sobrenadante y se seca el precipitado a vacío. Observación: El precipitado en ocasiones no es visible, dependiendo de la cantidad de ADN.
- 10. Se resuspende en un volumen de agua estéril en dependencia de la cantidad inicial y de la concentración en que se desee tener la preparación de ADN.

REFERENCIAS

- DRETZEN, G. y cols. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from Agarose and Acrilamide gels. Anal. Bioch. 112: 295.
- LANGIDGE, J. y cols. (1980). Extraction of nucleic acid from Agarose gels. Anal. Bioch. 103: 264.
- MC DONNELL (1977). Analysis of restriction fragments of T 7 DNA and determination of molec, weight by electrophoresis in neutral and alcaline gels. J. Mol. Biol. 110: 119.
- MANIATIS, T. (1982). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 177.
- WEISLANDER (1979). A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoresis separation in low gelling temperature agarose gels. Anal. Bioch. 98: 305.
- ZHEN, J. y cols. (1985). A method for fast and pure DNA elution from Agarose gels by centrifugal filtration. Biotechnology 3: 1014.