KIT EDUCATIVO

Purificación de ADN Genómico a partir de Mucosa Bucal con Columnas de Sílice. Electroforesis en agarosa.

TBED34-20

| 20 ESTUDIANTES | ★★★ AVANZADO

Experiencia docente de +1 módulo

Número de estudiantes

Complejidad de la práctica

© Tiaris Biosciences | v01.2026

Tiaris Biosciences
PT Rabanales 21, Edif Aldebarán
c/ Astrónoma Cecilia Payne s/n. Córdoba. España
info@tiarisbiosciences.com

CONTENIDOS

1 Introducción 4

1.1. El ácido desoxirribonucleico (ADN) 4

1.2. Purificación de ADN 5

2 Objetivos del Experimento 7

3 Material incluido 7

4 Material requerido (*no incluido*) 8

5 Descripción de la Práctica de Laboratorio 8

5.1. Recogida de la muestra 10

5.2. Extracción de ADN de mucosa bucal 10

5.3. Flujo de trabajo 11

5.4. Electroforesis en gel de agarosa 12

5.4.1. Preparación del soporte del gel de agarosa 12

5.4.2. Preparación del tampón de electroforesis 12

5.4.3. Preparación del gel de agarosa 12

5.4.4. Electroforesis 13

1 INTRODUCCIÓN

1.1. EL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

La primera identificación de una sustancia presente en el núcleo celular, que hoy sabemos que corresponde al ADN, fue realizada en 1869 por el científico suizo Friedrich Miescher. Miescher aisló una sustancia rica en fósforo a partir del núcleo de células, a la que llamó "nucleína", sin conocer aún su función biológica.

Décadas más tarde, en el siglo XX, el estudio del ADN avanzó de forma decisiva. En 1953, los científicos James Watson y Francis Crick propusieron el modelo de la doble hélice, explicando la estructura del ADN y su mecanismo de replicación. Este descubrimiento revolucionó la biología, ya que permitió comprender cómo se transmite la información genética de una generación a otra.

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la molécula fundamental que almacena la información genética en todos los seres vivos, incluyendo algunos virus. Este está formado por largas cadenas de nucleótidos organizadas en una estructura de doble hélice. Cada nucleótido está compuesto por un grupo fosfato, el azúcar desoxirribosa y una de las 4 bases nitrogenadas (adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T)) (*Fig. 1*). El orden de las bases nitrogenadas constituye la información genética que determina las características de cada individuo.

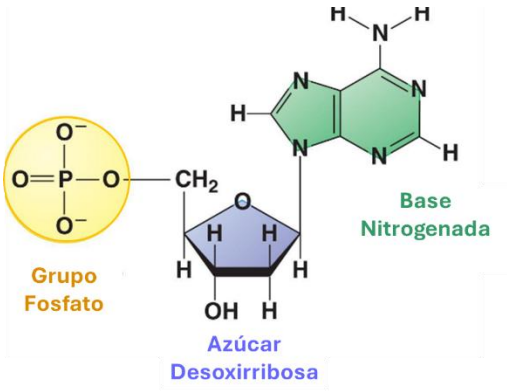


Figura 1. ***Estructura de un nucleótido del ADN.*** *Las bases se unen a través de puentes de hidrógeno, formando dos cadenas complementarias en las que una adenina se une por dos puentes de hidrógeno a una timina, y una citosina se une por tres puentes de hidrógeno con una guanina. La existencia de esta unión da lugar a la existencia de pares de bases (pb).*

Con la secuenciación del genoma de distintos organismos sabemos que el tamaño de los genomas varía enormemente entre los distintos organismos (*Tabla 1*). En el caso del ser humano, el genoma contiene aproximadamente 3.200 millones de pares de bases, mientras que otros organismos tienen un genoma mayor o menor. La no correspondencia del tamaño

de los genomas con la complejidad biológica, es un fenómeno conocido como la Paradoja del valor C. Por ejemplo, algunos organismos relativamente simples pueden tener genomas mucho más grandes que los de organismos más complejos. Esto se debe a que una gran parte del ADN no está dedicada a codificar proteínas, sino que incluye secuencias repetitivas, elementos móviles y regiones no codificantes.

Tabla 1. ***Tamaño del genoma de organismos modelos secuenciados***

Organismo	Tamaño Genoma (pb)	Nº Cromosomas
Organismos modelo		
Bacteria *Escherichia coli*	4.6 Mpb	1
Levadura *Saccharomyces cerevisiae*	12 Mpb	16
Ameba *Dictyostelium discoideum*	34 Mpb	6
Nemátodo *Caenorhabditis elegans*	100 Mpb	12 (2n)
Mosca fruta *Drosophila melanogaster*	140 Mpb	8 (2n)
Planta *Arabidopsis thaliana*	140 Mpb	10 (2n)
Ratón *Mus musculus*	2.8 Gpb	40 (2n)
Humanos *Homo sapiens*	3.2 Gpb	46 (2n)

Se estima que alrededor del 1–2% del genoma humano es codificante, es decir, contiene información directa para la síntesis de proteínas. El resto del genoma está formado por ADN no codificante, que durante mucho tiempo fue considerado "ADN basura", aunque hoy se sabe que muchas de estas regiones tienen funciones importantes. Entre ellas se incluyen la regulación de la expresión génica, la organización estructural de los cromosomas y la participación en procesos evolutivos. Además, existen secuencias repetitivas y elementos transponibles que pueden moverse dentro del genoma y contribuir a su expansión.

1.2. PURIFICACIÓN DE ADN

El ADN es la molécula que contiene la información genética de todas nuestras células. Casi cualquier tejido o fluido corporal puede ser empleado como fuente de ADN, siendo las más usadas pelo, mucosa, saliva y sangre.

El ADN se localiza principalmente en el núcleo celular, aunque también puede encontrarse en otros orgánulos, como las mitocondrias. Su función es almacenar y transmitir la información necesaria para el funcionamiento, desarrollo y reproducción de los organismos. Aunque esta información no es visible a simple vista, el ADN está presente en prácticamente todas las células de nuestro organismo, formando parte esencial de su estructura y actividad.

El ADN se encuentra protegido dentro de las células, asociado a proteínas y rodeado por membranas que dificultan su acceso directo. Por ello, para poder estudiarlo o aislarlo en el

laboratorio es necesario aplicar una serie de procedimientos que permitan romper las estructuras celulares y separar el material genético del resto de componentes.

Tras la recogida de la muestra, el procedimiento de extracción implica la ejecución de distintas etapas:

1. **Lisis celular**: La lisis celular es un paso que garantiza romper la pared y las membranas (celular y nuclear) para liberar el ADN. Este paso depende del tipo de célula con la que se trabaja. En función del tipo de célula es necesario romper la pared celular (*plantas, bacterias, hongos, levaduras*) y/o la membrana celular (*todos los tipos de células*). Este paso requiere del empleo de detergentes, de la eliminación de proteínas y otras moléculas. Frecuentemente se utilizan enzimas para romper las paredes celulares (*lisozima, quitinasa, zimoliasa, etc*) y para degradar proteínas (*proteinasa K*) y otras moléculas que podrían interferir en la purificación del ADN.
2. **Aislamiento del ADN**: Una vez liberado el contenido celular, el ADN debe separarse del resto de componentes presentes en la muestra, como proteínas, lípidos, sales y restos celulares. Para aislar el ADN se pueden seguir distintas metodologías: a) precipitación alcohólica en presencia de altas concentraciones de sales; b) por adsorción a una matriz de silica; c) por adsorción a una perla magnética recubierta con silica; d) uso de una matriz de intercambio iónico.
3. **Lavados del ADN**: Tras el aislamiento, es necesario eliminar sustancias residuales que puedan permanecer adheridas al ADN, como sales, detergentes, proteínas o compuestos inhibidores. Para ello se realizan uno o varios pasos de lavado, generalmente utilizando soluciones hidroalcohólicas, como etanol al 70 %. Estos lavados incrementan la pureza de la muestra y mejoran su calidad para aplicaciones posteriores, como amplificación por PCR, secuenciación o análisis molecular.
4. **Elución**: La etapa final consiste en recuperar el ADN purificado mediante su disolución/ elución en un volumen pequeño de agua libre de nucleasas o en un tampón de elución con pH ligeramente alcalino. Este proceso permite separar el ADN de la matriz de purificación y obtenerlo en solución, listo para su almacenamiento o análisis posterior. La calidad y concentración del ADN obtenido pueden evaluarse mediante técnicas como espectrofotometría o electroforesis en gel de agarosa.

   Una vez extraído el ADN este puede ser conservado por largos períodos de tiempo.

La extracción de ADN es una técnica básica en biología molecular y tiene aplicaciones en investigación, diagnóstico clínico, genética forense y biotecnología. La práctica permite comprender que el ADN es una sustancia presente en nuestras propias células.

2 OBJETIVOS DEL EXPERIMENTO

El objetivo de la práctica es la extracción de ADN de células de nuestro propio cuerpo haciendo uso de un sistema de purificación basado en columnas de sílice, así como el análisis de la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

3 MATERIAL INCLUIDO

El kit incluye reactivos suficientes para la recogida y purificación de ADN genómico de 20 muestras.

Componentes	Referencia	TBED34-20	Almacenaje
Hisopos	-	20 uds	25 °C
Columnas High-Q™ Spin con Tubos de recolección	TBM0010	20 uds	25 °C
Proteinasa K	TBZ0303	10 mg	-20°C
Tampón de Resuspensión Proteinasa K	TBB0546	1 mL	-20°C
Buffer BS	TBB0505	15 mL	25 °C
Buffer Unión MB		10 mL	25 °C
Buffer WB1	TBB0511	12 mL	25 °C
Buffer WB2	TBB0512	20 mL	25 °C
Buffer Elución	TBB0510	2 x 2 mL	25 °C
Agarosa Baja Electroendosmosis	TBR0122-S	3 g	25 °C
TiariStain™ 20.000x	TBR0225	20 µL	25 °C ⚠
TAE 50x	TBB0359-50	30 mL	25 °C
Patrón Peso Molecular Lambda *Hind*III	TBR0283-S	20 µL	-20 °C
Buffer de Carga 6x	TBB0320-S	200 µL	-20 °C

⚠ Almacenar a temperatura ambiente. No almacenar a 4°C. No congelar.

4 MATERIAL REQUERIDO (*no suministrado*)

Para la ejecución de la práctica se requiere:

- Tubos eppendorf de 1,5 mL o 2 mL
- Puntas de micropipetas
- Guantes
- Micropipetas
- Centrífuga
- Baño termostatado (55°C, 70°C)
- Sistema de cubetas y fuentes de electroforesis

5 DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

En esta práctica se trabajará con células de la mucosa oral, que se desprenden tras frotar vigorosamente el interior de la mejilla. Estas células contienen ADN en su núcleo, pero este no se encuentra libre, sino protegido por membranas celulares y nucleares, así como asociado a proteínas. Por ello, para extraerlo es necesario romper estas estructuras mediante un proceso de lisis celular y separar el ADN del resto de componentes celulares.

Para el aislamiento del ADN emplearemos la unión del ADN a una matriz de silica. Esta matriz está empaquetada en columnas que mediante pasos de centrifugación permiten la obtención de ADN de excelente calidad.

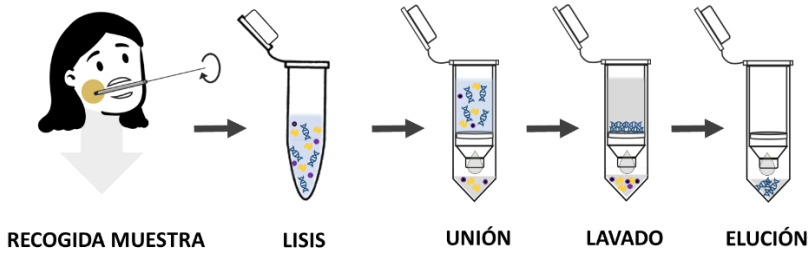


Figura 2. ***Esquema del flujo de trabajo en la purificación de ADN de mucosa bucal usando columnas de silica.***

La práctica incluye un segundo módulo: una electroforesis en gel de agarosa. Ello implica la preparación del gel, la preparación y aplicación de las muestras y la migración electroforética de las mismas.

En primer lugar, se prepara el gel de agarosa disolviendo la cantidad necesaria de agarosa en el tampón de electroforesis TAE1x mediante calentamiento, hasta su completa solubilización. Una vez obtenida la disolución, se deja enfriar hasta aproximadamente 55 °C. Tras añadir a la solución el intercalante del ADN (TiariStain™ Green Safe), esta se vierte en el molde correspondiente, previamente preparado. Tras el vertido de la solución de agarosa, colocar un peine para generar los pocillos, donde se depositarán posteriormente las muestras. Dejar en reposo hasta la total solidificación de la agarosa.

Cuando el gel ha solidificado, los peines son removidos y el gel sobre su soporte, se introduce en la cubeta de electroforesis horizontal. Ubicar los pocillos hacia el lado donde se encuentra el polo negativo. A la cubeta se le añade buffer TAE1x hasta cubrir el gel completamente. La cubeta se dispone con los electrodos en extremos opuestos, uno positivo y otro negativo.

A continuación, las muestras de ADN se preparan mezclándolas con un tampón de carga que contiene glicerol, lo que aumenta su densidad y facilita que se depositen en el fondo de los pocillos. Con ayuda de una micropipeta, se cargan cuidadosamente las muestras en cada pocillo.

Por último, se conecta la fuente de alimentación y se aplica el campo eléctrico, iniciándose la migración de las moléculas a través del gel de agarosa.

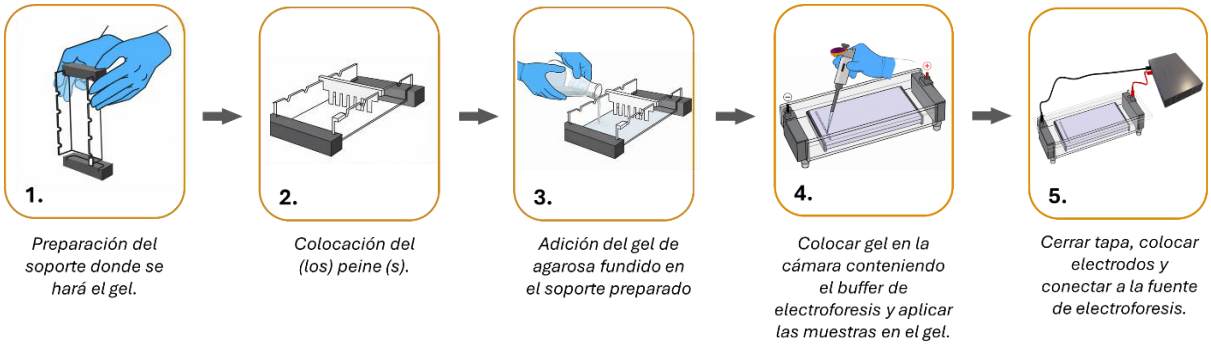


Figura 4. ***Flujo de trabajo para la realización de una electroforesis.***

Al emplear como intercalante el TiariStain™ Green Safe, los fragmentos amplificados se observarán colocando el gel en un transiluminador con luz azul y filtro naranja (preferiblemente) o ultravioleta.

5.1. RECOGIDA DE LA MUESTRA

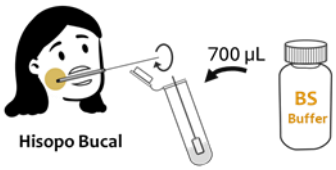
⚠ No comer ni beber durante 1 hora antes de la recogida de la muestra.

1. En un tubo de 1,5 mL limpio, añadir **700 µL de Buffer BS**.
2. Introducir un hisopo bucal en la boca y frotar vigorosamente el interior de la mejilla entre 10 y 20 veces.
3. Colocar el hisopo en el tubo con Buffer BS y descargar el contenido del hisopo girando el mismo 5–6 veces en la solución. Girar y presionar firmemente el hisopo contra la pared del tubo para maximizar la liberación de células en la solución.
   CUIDADO: *¡No introducir en la boca el hisopo una vez introducido en el Buffer BS!*

5.2. EXTRACCIÓN DE ADN DE MUCOSA BUCAL

1. Transferir **400 µL de la muestra** a un vial limpio.
2. Añadir **20 µL de Proteinasa** K. Mezclar con pipeta.
3. Incubar a 55 °C durante 20 minutos. Este tiempo se puede prolongar hasta 1h de incubación.
4. Añadir **400 µL Buffer de Unión MB** y mezclar por inversión.
5. Transferir la mezcla a una columna High-Q™ Spin colocada en un tubo de recolección.
6. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y desechar el eluato (solución que queda en el colector de la columna). Repetir los pasos 5 y 6 con la mezcla restante.
7. Colocar la columna High-Q™ Spin en el tubo de recolección y añadir **500 µL de Buffer WB1**.
8. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y desechar el eluato.
9. Colocar la columna High-Q™ Spin en el tubo de recolección y añadir **700 µL de Buffer WB2**.
10. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y desechar el eluato.
11. Para secar la columna High-Q™ Spin, colocarla en el tubo de recolección y centrifugar nuevamente a 12.000 g durante 2 minutos. Eliminar el colector.
12. Colocar la columna en un tubo limpio de 1,5 mL.
13. Añadir **80 µL de tampón de elución precalentado** (precalentada a 70 °C) e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto. Recoger el ADN eluído en el vial limpio. El ADN para su conservación debe ser almacenado a -20° C.
15. Analizar el ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN puede además ser cuantificado mediante espectrofotometría (λ= 260 nm, 230 y 280 nm).

5.3. FLUJO DE TRABAJO DE LA PURIFICACIÓN DE ADN



Recogida de la muestra

Extracción de ADN

1. 400 µL Muestra

2. 20 µL — Proteinasa K

3. 55ºC 20'

4. 400 µL Etanol 100% — Etanol 100%

Mezclar por inversión

5. Transferir

6. 13.000g, 1'

7. 500 µL WB1 Buffer

8. 13.000g, 1'

9. 700 µL WB2 Buffer

10. 13.000g, 1'

11. 13.000g, 2'

12.

13. 80 µL EB Buffer 70ºC — RT 2'

14. 13.000g, 1'

ADN

5.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

5.4.1. PREPARACIÓN DEL SOPORTE DONDE SE HARÁ EL GEL DE AGAROSA

1. Coger el soporte y cerrar los extremos con los topes o con cinta de carrocero (*Figura 4. Paso 1*), para que cuando se vierta la solución de agarosa fundida, esta no se derrame.
2. Colocar el peine para formar los pocillos. Valore si colocar 1 o 2 peines y disponer de 1 o 2 filas de pocillos donde cargar las muestras (*Figura 4. Paso 2*).

5.4.2. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

1. Preparar el Tampón de electroforesis TAE a una concentración 1x. Necesitará un volumen correspondiente al del gel más el de la cubeta de electroforesis. Preparar la cantidad necesaria según su cubeta de electroforesis y tamaño del gel.

	Volumen a preparar		
	500 mL	1 L	1,5 L
TAE 50x	10 mL	20 mL	30 mL
Agua Destilada	490 mL	980 mL	1.470 mL

5.4.3. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

1. En un matraz, pesar la cantidad de agarosa necesaria para preparar un gel de agarosa al 0,7% en Tampón de electroforesis TAE 1x. En función del número de pocillos del peine, calcule la cantidad de geles que necesite para cargar todas las muestras.

	Tamaño Soporte			
	7 x 7 cm	**7 x 10 cm**	**6 x 10 cm**	**15 x 10 cm**
Gel Agarosa 0,7%				
Agarosa	0,22 g	0,29 g	0,35 g	0,7 g
TAE 1x	32 mL	42 mL	50 mL	100 mL

2. En un microondas, fundir la agarosa hasta que esté totalmente disuelta. Agitar la solución de vez en vez hasta que no queden granos de agarosa sin fundir.
3. Cuando la solución esté atemperada (~55 °C), añadir a la agarosa fundida el intercalante TiariStain™ Green Safe 20.000x a razón de 3 µL para un gel de hasta 50 mL y 5 µL para un gel de 100 mL. Mezclar bien.

4. Verter cuidadosamente la solución en el soporte donde se solidificará el gel (*Figura 4. Paso 3*). Evitar que queden burbujas.
5. Colocar el peine en uno de los extremos de la bandeja.

5.4.4. ELECTROFORESIS

1. Una vez que el gel se haya solidificado, sujetar el peine por ambos lados y desencajarlo del gel.
2. Quitar los topes o la cinta de carrocero y colocar el gel sobre su soporte (*sin los topes o la cinta de carrocero en su defecto*) en la cámara de electroforesis, conteniendo ésta tampón de electroforesis TAE1x suficiente para que quede el gel cubierto.
3. Colocar en la cubeta de electroforesis el gel sobre su soporte, teniendo en cuenta que los pocillos deben estar cerca del polo negativo.
4. Añadir Buffer TAE 1x hasta cubrir el gel.
   El tampón puede recuperarse y utilizarse al menos una vez más.
5. Preparación de las muestras: En un vial o sobre parafilm, mezclar 5 µL del ADN extraído con 1-2 µL del Buffer de carga 6x. Cargar una muestra por pocillo
6. Reservar un pocillo para cargar 5 µL del patrón de peso molecular Lambda-*Hind*III. Se debe de cargar un pocillo del patrón de bandas por línea de pocillos del gel de agarosa.
7. Tras cargar todas las muestras disponibles, colocar la tapa de la cubeta de electroforesis, conectar los electrodos a la fuente (*Figura 4. Paso 5*).
8. Configurar la fuente de corriente a 75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos).
9. Cuando el frente de carga haya migrado lo suficiente, parar la fuente de electroforesis.
10. Coger el gel y colocarlo en el transiluminador.
11. Hacer foto y analizar los resultados obtenidos.