



UNIVERSIDAD DE SONORA



POSGRADO EN BIOCIENCIAS

MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (2442)

**UNIDAD 2. EXTRACCIÓN Y MANIPULACIÓN DE
ÁCIDOS NUCLÉICOS**

Elaboró: Dra. Kadiya del C. Calderón Alvarado

Conceptos

- **Extracción:** sacar los componentes desde un compartimento celular.

Involucra:

- Lisis de las células que contienen a los ácidos nucleicos (AN)
 - Inactivación de nucleasas
 - Clarificación: separación de los AN de los restos celulares.
-
- **Purificación:** Separación de AN:
 - De proteínas solubles
 - De otros AN no deseados
 - De Lípidos, carbohidratos
 - De sales y otros compuestos orgánicos

Para muchas aplicaciones que involucran manipulación de AN es necesario disponer de éstos en **estado puro**.

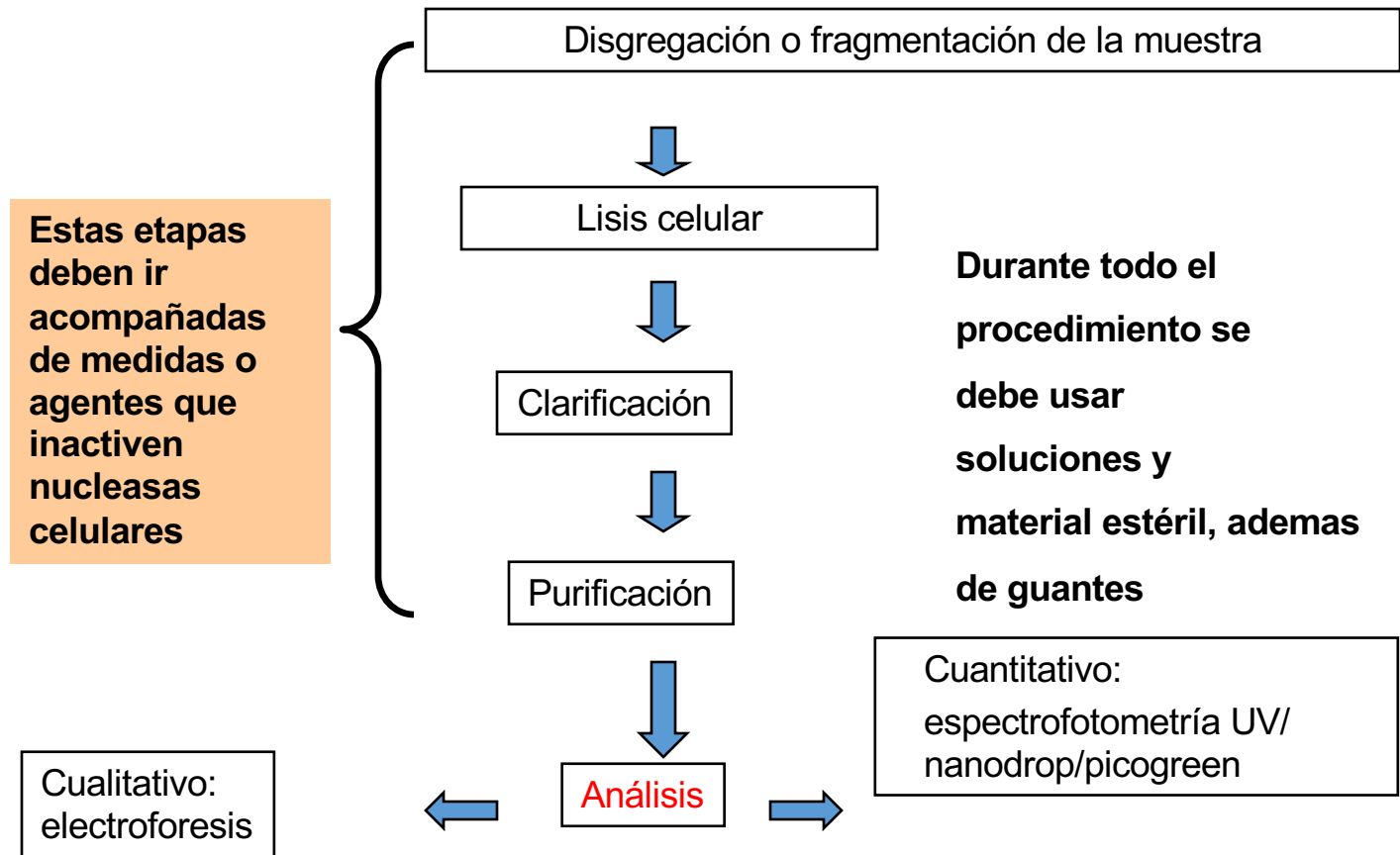
Por qué purificar?

- Nucleasas que se liberan al lisar las células degradan los AN
- Interferentes que inhiben a las enzimas que se usan en ingeniería genética.

Por lo tanto, el reto en todo procedimiento que utilice herramientas moleculares se basa en separar los ácidos nucleicos deseados desde una mezcla compleja, manteniendo la integridad de los AN

Contaminantes: Proteínas, lípidos y carbohidratos, sales del medio, iones, etc.

Etapas básicas de un procedimiento general para la Extracción y Purificación de AN



1. Métodos de fragmentación y lisis celular para la extracción de AN

El procedimiento ideal de lisis debe tener la fuerza necesaria para romper el material de inicio (células o tejido) y la delicadeza requerida para preservar las moléculas de interés (ADN o ARN).

• Métodos físicos

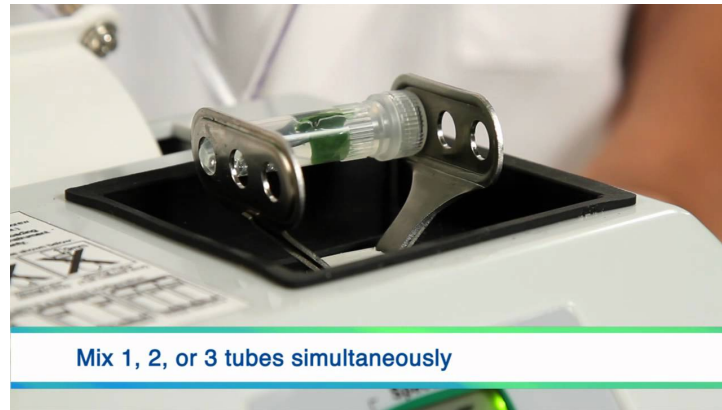
- Homogenización mecánica,
- Homogenización en solución
- Molienda manual en mortero
- Bolitas de vidrio (glass beads)
- Sonicación

• Métodos químicos

- Detergentes (SDS)

• Métodos enzimáticos

- **Lysozima**: rompe enlaces β -1.4- entre N-acetil murámico y N-acetil glucosamina de peptidoglicán de la pared celular de bacterias
- **Lyticasa**: rompe enlaces β -1.3 de glucano de levaduras
- **Proteasas**: rompe enlaces peptídicos de prot. de pared y membrana plasmática e interacciones célula-célula.



Mix 1, 2, or 3 tubes simultaneously

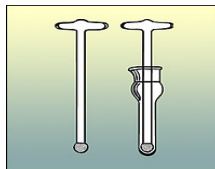
Calderón et al., 2011; Calderón et al., 2017.

Ruptura de células por medios físicos

Método de lisis	Descripción	Aparato
Mecánica	Destrucción, molienda, pulverización	Homogenizador
Homogenización líquida	El contenido interior de las células o tejidos en suspensión son arrastrados al exterior	Prensa francesa, Homogenizador
Sonicación	Alta frecuencia de ondas que fragmentan las células	Sonicador
Congelación	Ciclos repetidos de congelación-descongelación	Congelador, nitrógeno líquido, etanol
Molienda manual	Molienda de material como tejidos, plantas o suelo	Mortero y pistilo.



Homogenizador
mecánico -
polytron



Homogenizador
Dounce



Sonicador

Otros componentes de una solución de lisis

- Etilen diamino tetracético (EDTA).

Quelante de iones Mg^{2+} , baja la concentración efectiva de este ión. Por lo tanto, EDTA inhibe nucleasas y minimiza la degradación de AN durante la extracción/purificación.

Amortiguador de pH (7-8).

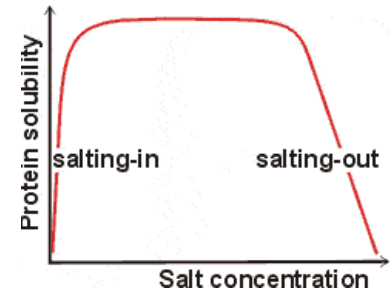
- Triton
- SDS

2. Clarificación. Eliminación de restos celulares

- Centrifugación
- Filtración
- Método mixto: enzimas + centrifugación

3. Purificación

- Desproteinización con fenol, al desnaturar las proteínas presentes causa su precipitación.
- Precipitación de proteínas con sales (“salting out” aumento de hidrofobicidad entre las proteínas)
- Cromatografía
 - De intercambio iónico
 - De adsorción a sílica
 - De filtración
- Extracción de ADN desde un gel de agarosa



Algunas marcas comerciales:

MP

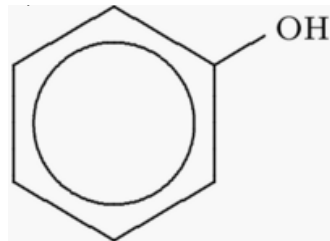
Zymo

MoBio

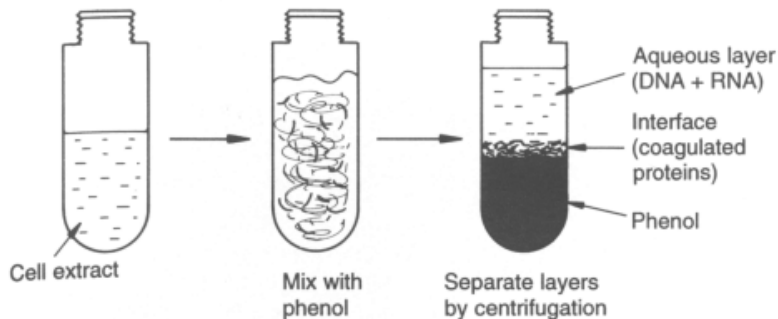
Qiagen



Extracción Fenólica de proteínas

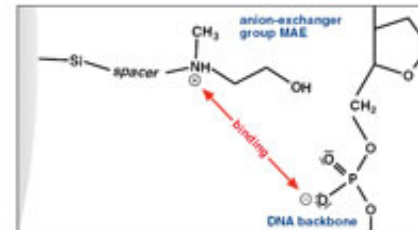
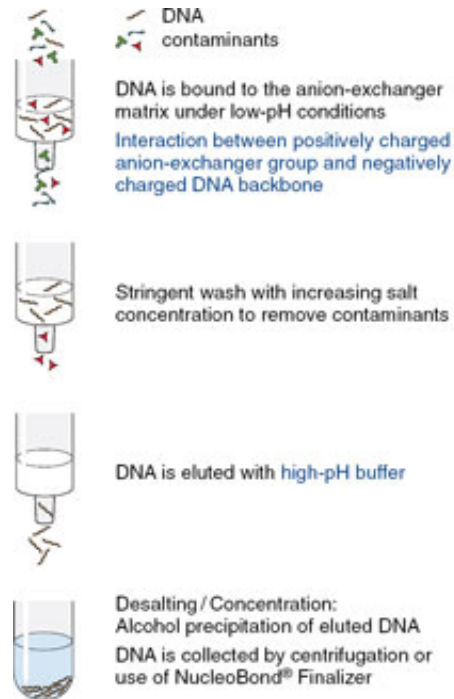


fenol

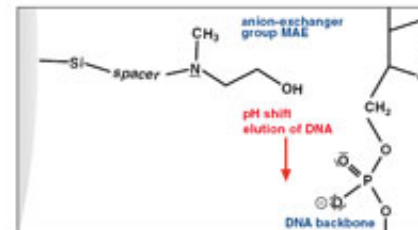


Se fundamenta en el uso de solventes orgánicos que por diferencia de densidades y por su capacidad para degradar proteínas permiten la purificación y aislamiento de AN

Cromatografía de intercambio iónico



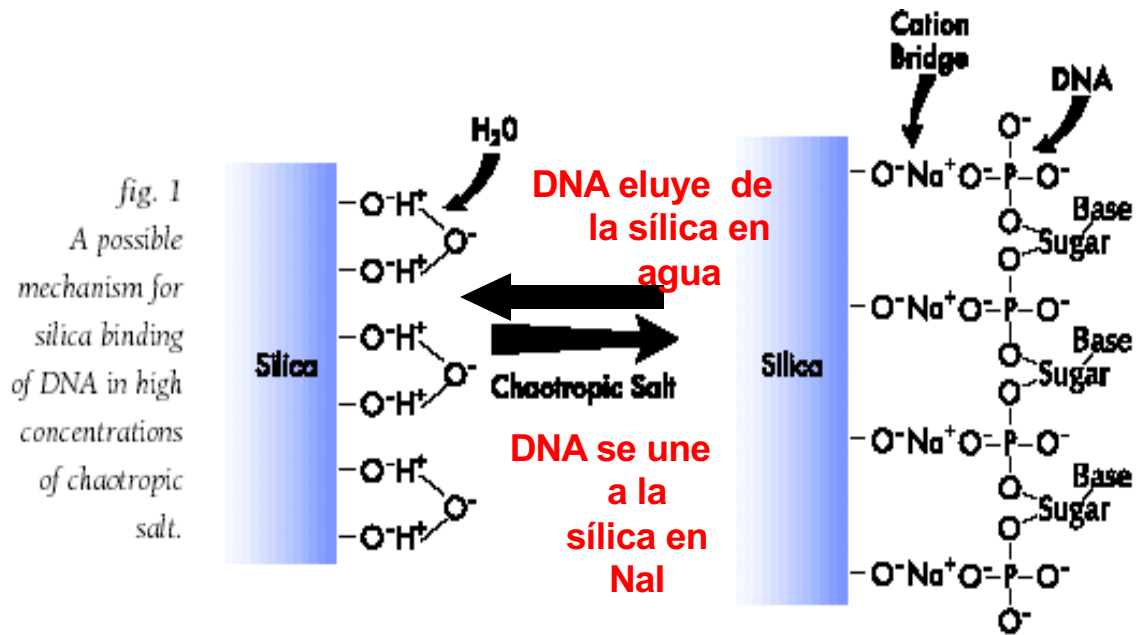
Principle of binding



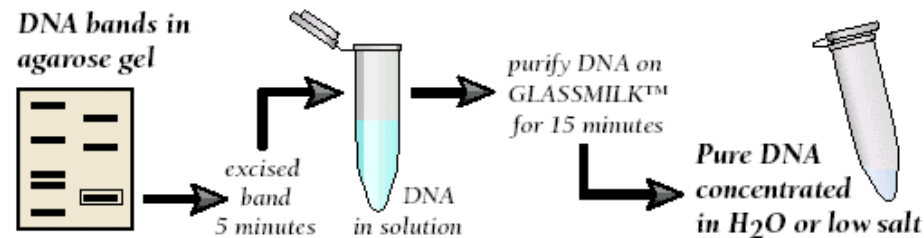
Principle of elution

El mecanismo básico es el intercambio reversible de los iones en solución con los grupos funcionales unidos covalentemente a una fase estacionaria insoluble llamada resina.

Adsorción de ADN a sílica: mecanismo



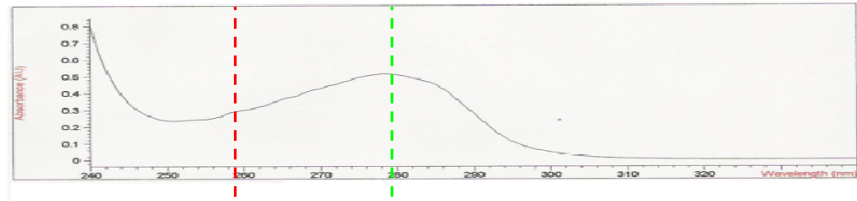
Separación de fragmentos de ADN desde un gel de agarosa



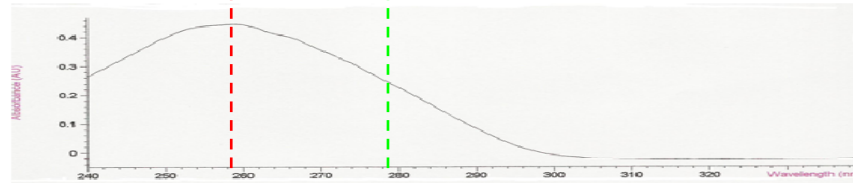
- Electroforesis de la mezcla de fragmentos en un gel de agarosa de bajo punto de fusión
- Solubilización por temperatura (~ 60 C°)
- Purificación por cromatografía en columna para eliminar agarosa y otros contaminantes

Análisis espectrofotométrico de Ácidos Nucléicos y criterios de pureza

BSA UV absorbance spectrum



DNA UV Absorbance Spectra



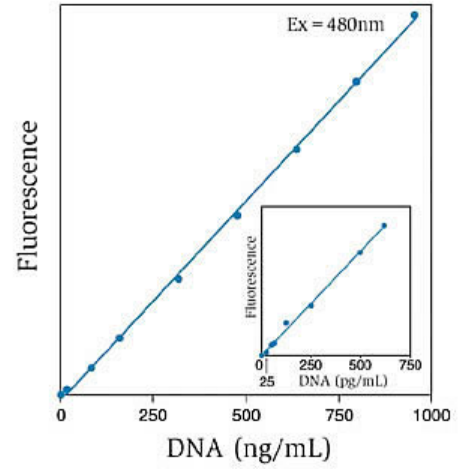
Longitud de onda

- Los AN absorben a 260 nm
- $\text{Abs}_{230}/\text{Abs}_{260}$ debe ser menor de 0.5 (> sugiere contaminación con fenol/ CHCl_3 o carbohidratos).
- $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ debe ser $\sim 1.8-2$ (menor a 1.8 sugiere contaminación con proteínas).

Nanodrop vs picogreen



Figure 1 - Quantitation using the PicoGreen® Reagent



Linear quantitation of calf thymus DNA from 25 pg/mL to 1000 ng/mL using the PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent.



Factores que afectan el rendimiento, calidad y pureza de los AN purificados

- Cantidad de material de partida
 - Número de copias de las moléculas de AN
 - Cantidad de tejido
- Condiciones en las que se encuentra el material de inicio (fresco, congelado, fijado)
- Contaminantes e interferentes en el material biológico

¿cuál método debo elegir?.....

Métodos Específicos

Extracción de ADN plasmídico desde bacterias: Método de Lisis alcalina

- Centrifugación del cultivo
- Re-suspensión en solución amortiguadora de pH + EDTA.
- Lisis y desnaturalización alcalina
 1. SDS, un detergente que disuelve lípidos de membrana. Desnaturalizante de proteínas.
 2. NaOH (pH >12):

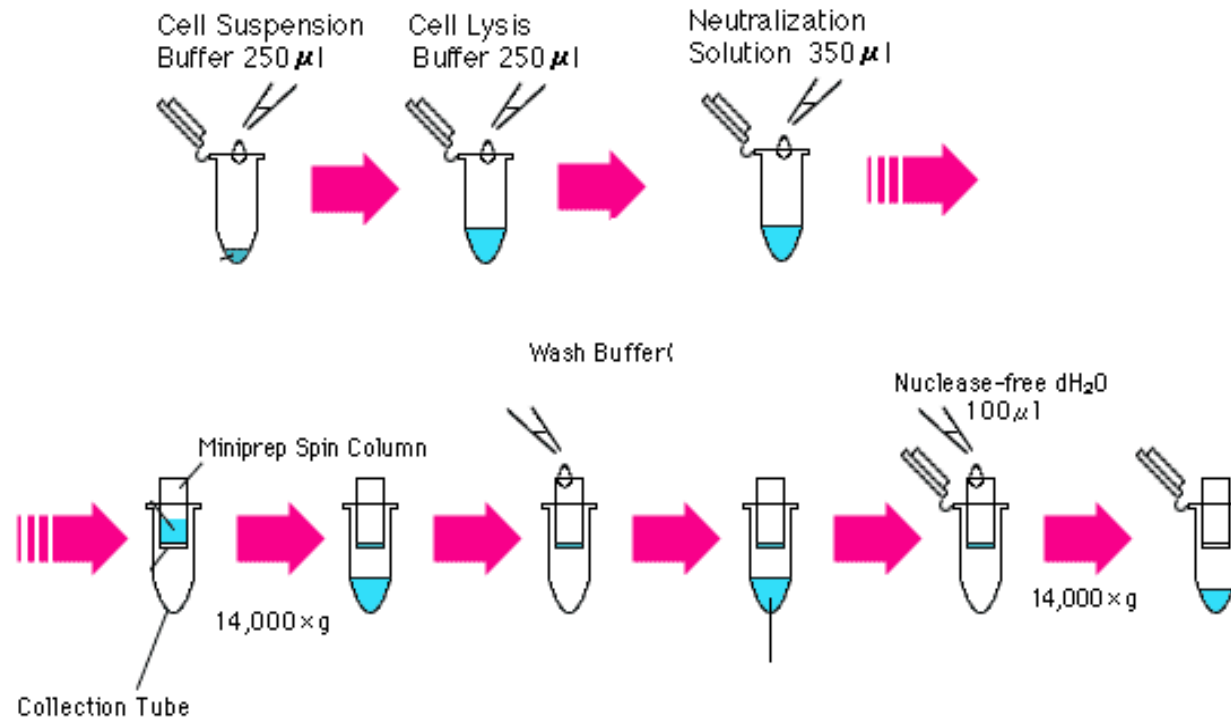
Debilita la pared celular y libera el contenido de la célula. Ayuda en la desnaturalización de proteínas.

Desnaturaliza el ADN. Las dos hebras del ADN (cromosomal y plasmidial) se separan.

Extracción de ADN plasmídico desde bacterias

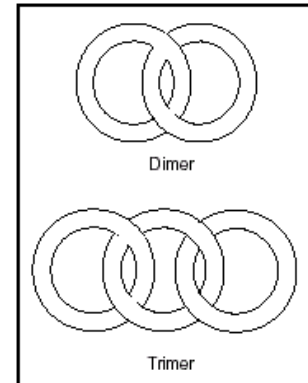
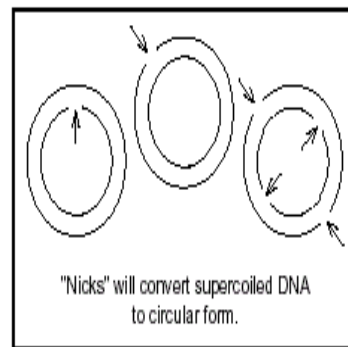
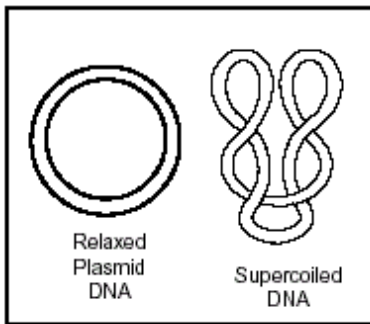
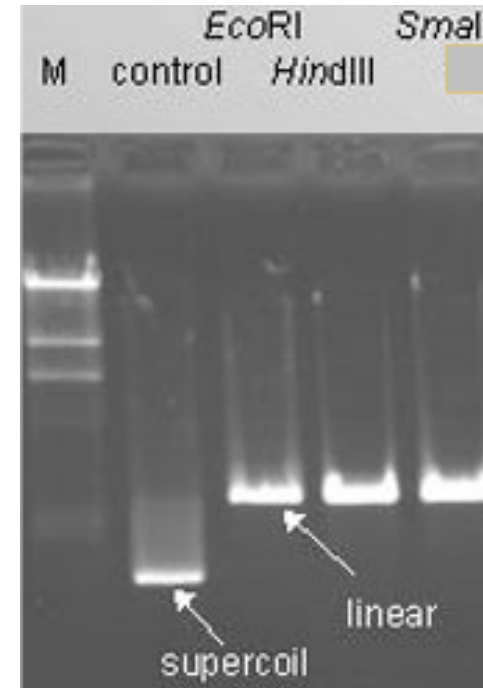
- Neutralización en acetato de amonio pH ~ 5.
 1. El ADN circular plasmidial se renaturaliza. ADN cromosomal de alto peso molecular lineal permanece desnaturalizado (ssADN). ss= single strand= hebra sencilla
 2. El ssADN precipita ya que moléculas grandes de ssADN son insolubles en alta concentración de sales (5M). Co-precipitación de membranas y *debris* celular.
 3. La adición de acetato de potasio al SDS forma KDS, que es un complejo insoluble (ayuda a la remoción de SDS de la solución).

Preparación de ADN por el método de lisis alcalina



Voo, K. S., and Jacobsen, B. M., Rapid resuspension of pelleted bacterial cells for miniprep plasmid DNA isolation. *BioTechniques*, 24, 240-243 (1998).

Electroforesis de ADN plasmídico



Velocidad de migración en geles de agarosa

Súperenrollado > lineal > dimeros > trímeros

EXTRACCIÓN DE ARN



El ARN es degradado por RNasas, que **están por todos lados.**

- Las **RNasas** son mucho más “poderosas” que las ADNasas.
- Son **termorresistentes** en general, por lo que autoclavar es una solución parcial.
- No requieren cationes divalentes (así que EDTA no tiene efecto, a diferencia de lo que pasa con ADNasas).

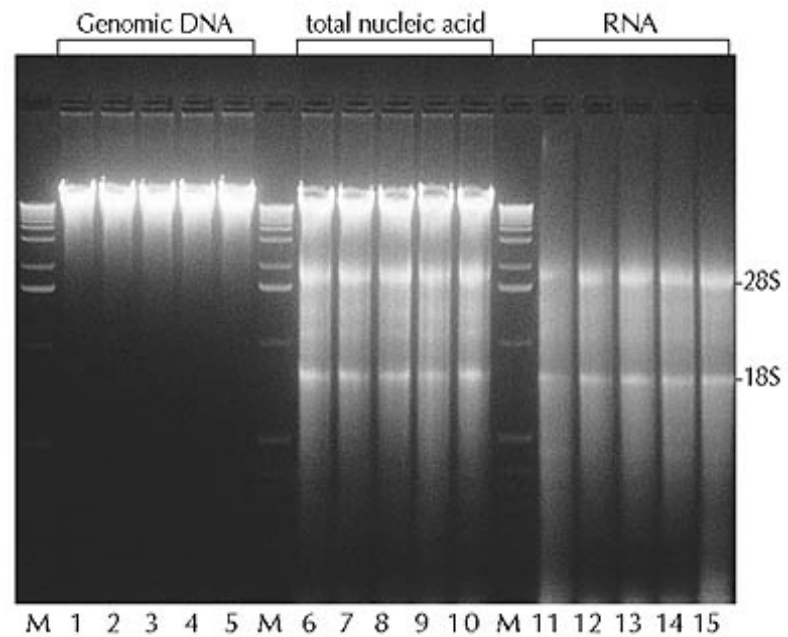
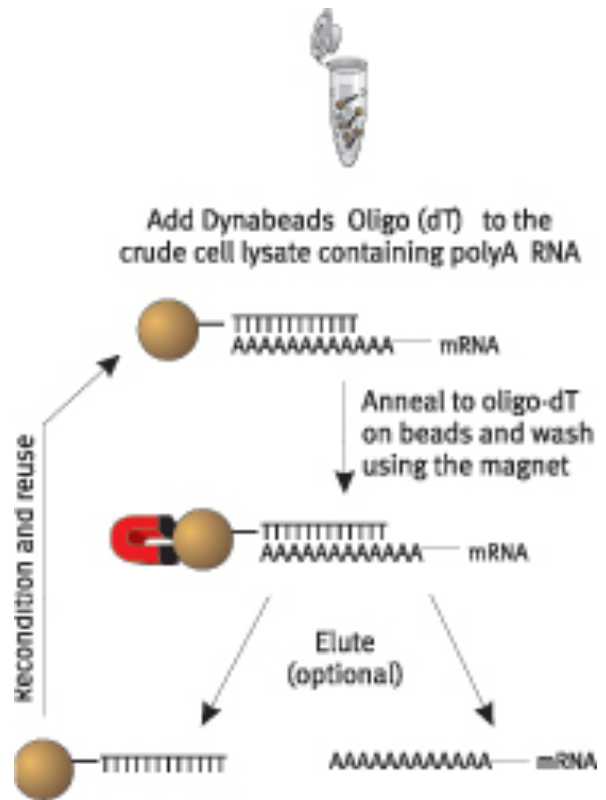
Extracción y Purificación de ARN

- Lo primero es minimizar la actividad de ARNasa liberadas desde las células lisadas durante el proceso de extracción.
 - La cantidad de ARNasa depende del tipo de células.
- Las ARNasas son muy resistentes (resisten T° de ebullición, autoclavado, denaturación con denaturalizantes fuertes). Por lo tanto, en lo posible deben ser eliminadas, no sólo inhibidas.
 - tratamiento del material de vidrio y de la soluciones,
 - uso de guantes, y mantención de un ambiente libre de Rnasas.
 - cambiar de guantes frecuentemente
 - Uso de inhibidores de ARNasa
 - Desnaturalizantes fuertes (HCl Guanidina o tiocianato de guanidinina con agentes reductores).
 - Usar micropipetas exclusivas para ARN

Extracción y purificación de ARN total

- Lisis en presencia de agentes desnaturantes fuertes de proteínas como el TRIZOL → solución monofásica de guanidina isotiocianato, fenol y otros componentes que facilitan el aislamiento de los ARNs e inactivan las ARNasas
- Usar agua DEPC---elimina ARNasas
- Extracción con fenol ácido (pH 4.5)
- Precipitación con etanol 75% en ddH₂O-DEPC
- Se obtiene mezcla de mARN, ARNr y ARNt
- Purificación de ARNm mediante cromatografía de afinidad a poli-dT

Extracción y purificación de ARN



Jacobson, A. (1987). S. Berger and A. Kimmel(Ed.), *Methods Enzymol.* 152, 254-257. San Diego: Academic Press.

Artículo de discusión

Analytical Biochemistry 416 (2011) 240–242



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio



Notes & Tips

Comparative analysis of microbial DNA extraction protocols for groundwater samples

Jessica Purswani^a, Antonio Manuel Martín-Platero^b, Patricia Reboleiro-Rivas^a, Jesús González-López^{a,b}, Clementina Pozo^{a,b,*}

^aEnvironmental Microbiology Group, Institute of Water Research, University of Granada, 18071 Granada, Spain

^bDepartment of Microbiology, University of Granada, 18071 Granada, Spain

Introduction

- Groundwater
 - 10^3 - 10^6 cfu/ml, most of them non culturable
 - Molecular techniques using DNA analysis
- Need to correlate microbial diversity to different contaminant factors
- Importance of an appropriate DNA extraction method in order to obtain more accurate correlations
- Comparing with one of the most populars → chemical and mechanical lysis, etc.

Objetivo del trabajo

-Materiales y métodos

Discusión

Table 1
Genomic DNA quality and amplification of 16S rDNA and V3 rDNA from different DNA extraction protocols.

		DNA extraction method			
		Chelex	MSOP	Epicentre	FastDNA
Minimum method time per sample (min)		120	76	63	36
Genomic DNA	Concentration (ng/ μ l)	75.27 \pm 6.96	4.80 \pm 1.25	11.40 \pm 2.25	9.43 \pm 0.57
	260/230 nm	0.27 \pm 0.00	0.11 \pm 0.03	0.21 \pm 0.09	0.04 \pm 0.03
	260/280 nm	0.93 \pm 0.01	5.81 \pm 2.74	2.04 \pm 0.22	1.91 \pm 0.20
16S rDNA	Concentration (ng/ μ l)	531.67 \pm 68.93	249.10 \pm 45.11	231.87 \pm 30.50	413.87 \pm 125.28
V3 rDNA	Concentration (ng/ μ l)	291.93 \pm 165.89	188.57 \pm 146.89	280.93 \pm 62.17	138.00 \pm 46.95
	16S amplification	+	-	+	+
	V3 amplification	+	+	+	+

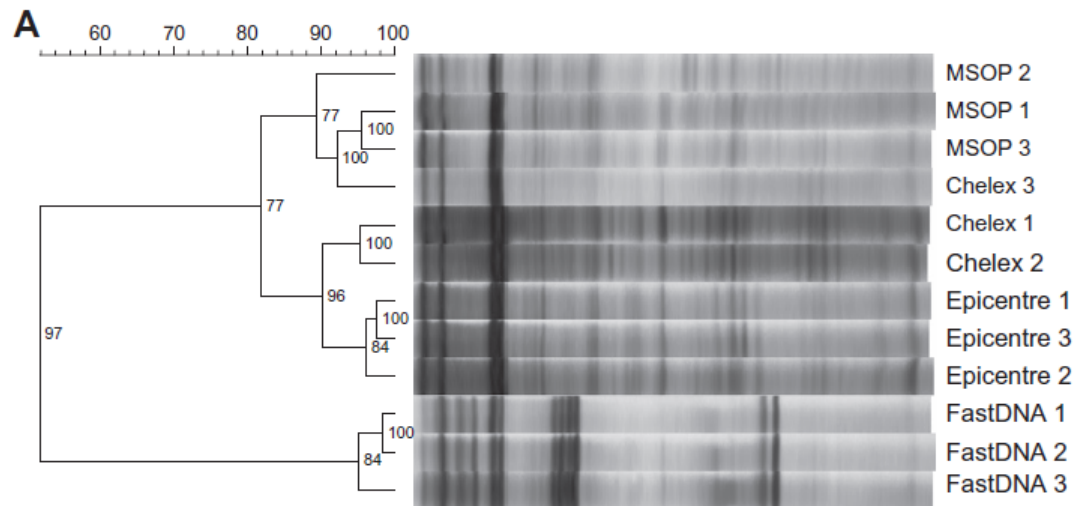
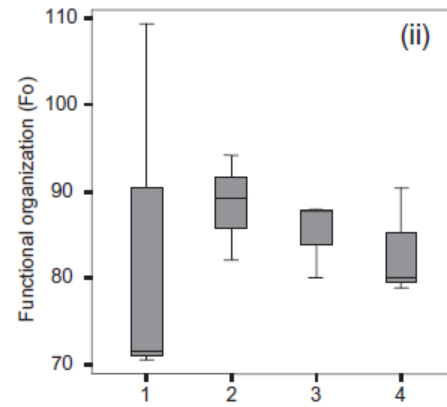
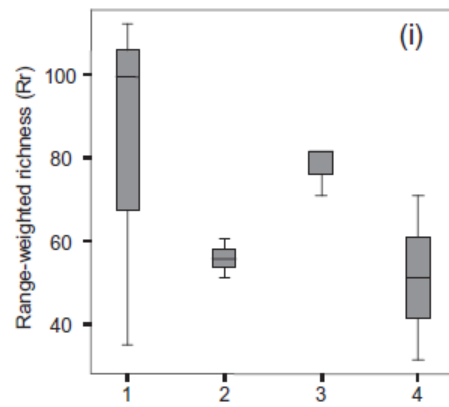


Fig.1. (A) TGGE neighbor-joining cluster analysis of four DNA extraction methods from a sole groundwater sample using the Pearson correlation coefficient. The circle represents the outliers, the line inside the box indicates the median value, the box indicates 50% of the data around the mean, and the limits cover 95% of the analyzed data.



The cophonic correlation is shown in the dendrogram. (B) Box plot diagrams showing the variation within each DNA extraction method with the following coefficients: (i) range-weighted richness; (ii) functional organization. 1, Chelex; 2, MSOP; 3, Epicentre; 4, FastDNA.

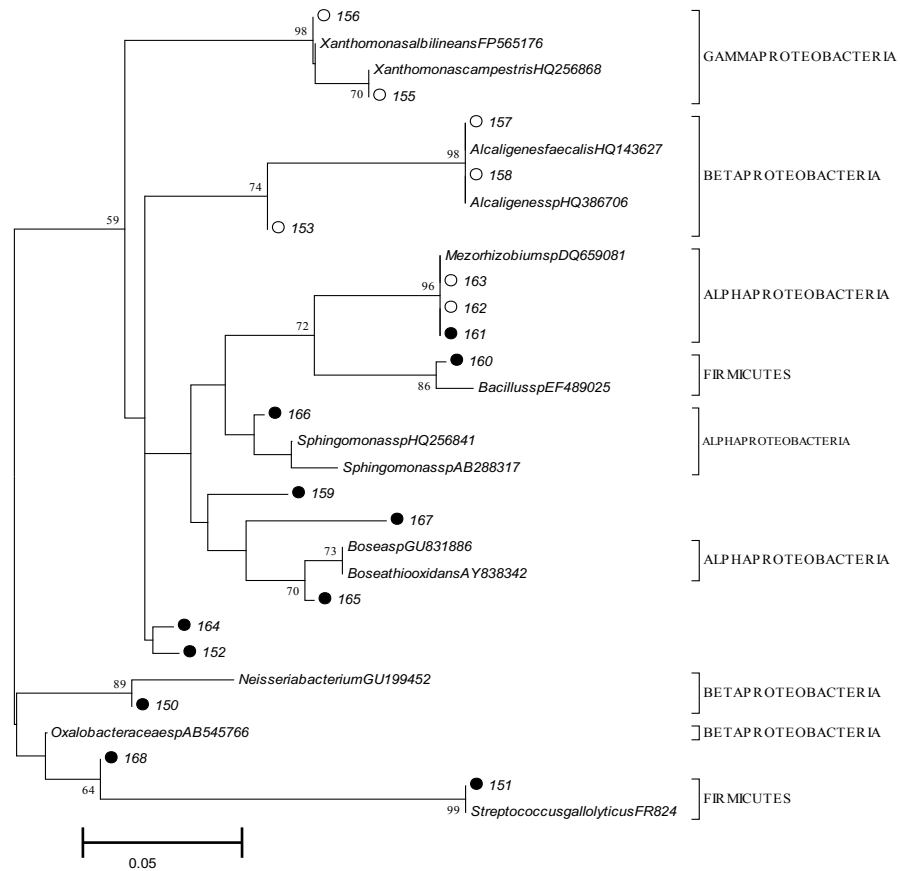


Figure SM1. Phylogenetic tree of band sequence differences in FastDNA[®] protocols, and the rest of methods. Open circle – band sequence present in FastDNA[®] protocol and not the rest. Closed circle – band sequence in chelex, MSOP and Epicentre[®] protocols, and not present in FastDNA[®].

Table SM1. Summary of the similarities and differences among the DNA extraction protocols.

	Chelex	MSOP	Epicentre®	FastDNA®
Lysozyme treatment	Yes	Yes	No	No
Proteinase K treatment	Yes	Yes	Yes	No
Other lytic enzymatic treatment	No	Mutanolysin	No	No
RNase treatment	No	Yes	No	No
Lysis	Heat and Vortex	Chemical, Heat and Vortex	Chemical and Vortex	Mechanical
Protein precipitation	No	Yes	Yes	Yes
Elution	Bidistilled water	0.5x TE	TE	DNase free pyrogen water

Conclusiones

¿Cuál método es el más recomendado?.....

¿Es aplicable para todo tipo de muestras?



Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications

Magdalena Nagler¹  · Heribert Insam¹ · Giacomo Pietramellara² · Judith Ascher-Jenull^{1,2}

Received: 29 March 2018 / Revised: 15 May 2018 / Accepted: 19 May 2018 / Published online: 1 June 2018
© The Author(s) 2018

Abstract

Extracellular DNA (exDNA) is abundant in many habitats, including soil, sediments, oceans and freshwater as well as the intercellular milieu of metazoa. For a long time, its origin has been assumed to be mainly lysed cells. Nowadays, research is collecting evidence that exDNA is often secreted actively and is used to perform a number of tasks, thereby offering an attractive target or tool for biotechnological, medical, environmental and general microbiological applications. The present review gives an overview on the main research areas dealing with exDNA, depicts its inherent origins and functions and deduces the potential of existing and emerging exDNA-based applications. Furthermore, it provides an overview on existing extraction methods and indicates common pitfalls that should be avoided whilst working with exDNA.

Keywords Extracellular DNA · Environment · Biofilm · Soil · Plant · Microbial activity