

## EXPERIMENTO 13

### EXTRACCIÓN DE ADN

#### REQUISITOS

Revisar los nucleótidos que forman parte de los ácidos nucleicos y sus propiedades iónicas.

#### OBJETIVOS

Utilizar técnicas sencillas para poder extraer el ADN de un tejido animal y por el aspecto que presenta, confirmar su estructura fibrilar y confirmar que en el núcleo el ADN se encuentra replegado.

### 1. FUNDAMENTOS

Las moléculas más grandes y probablemente las de mayor interés que se encuentran en los seres vivos actuales son los Ácidos Nucleicos. Todas las evidencias experimentales recientes indican que los Ácidos Nucleicos son las moléculas que ejercen el control primario sobre los procesos básicos de todos los organismos vivos. Estas sustancias forman el enlace químico entre las generaciones, para entender como este tipo de molécula puede controlar todas las reacciones de los seres vivos, los científicos han estudiado cuidadosamente la estructura de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se descubrieron en la época en que se llevaron a cabo intensas investigaciones químicas sobre la materia viva, a fines del siglo XIX.

El bioquímico suizo Friedrich Miescher fue el primero en descubrir sustancia, ácidos asociados con las proteínas del núcleo celular. Al estudiarlas mejor, Miescher comprendió que estas sustancias son bastante diferentes de las proteínas y de otros compuestos conocidos. La unidad básica de un ácido nucleico es el nucleótido, cada molécula de ácido nucleico se forma como una larga cadena de 4 clases de nucleótidos, a su vez los nucleótidos pueden ser fragmentados en 3 partes; una de esas partes es siempre un azúcar de 5 carbonos y que son la ribosa y la desoxirribosa, los ácidos nucleicos que contienen ribosa se denominan ácido ribonucleico o ARN y los ácidos nucleicos que contienen

desoxirribosa se denominan ácido desoxirribonucleicos o ADN. El ADN existe como un duplo de dos cadenas de polidesoxirribonucleótidos, excepto en algunos virus bacterianos formado de una sola cadena de ADN o ARN. Las cadenas complementarias de la doble hélice muestra polaridad opuesta y por lo tanto son antiparalelas: una cadena progresa en la dirección  $5' \rightarrow 3'$  y la cadena opuesta progresa en la dirección  $3' \rightarrow 5'$ . Por cristalografía de rayos X se han identificado tres formas de ADN: A, B y Z la forma B de ADN, que es la forma predominante en las células, es una doble hélice derecha con 10 pares de base en cada vuelta de la hélice. La forma A, que se forma en el laboratorio con baja humedad, existe como doble hélice derecha con casi 11 pares de base por vuelta. La forma Z, que puede presentarse fisiológicamente en dobles del ADN que contiene purina y pirimidinas alternadas, es una doble hélice izquierda en 12 pares de base por vueltas. El ADN se organiza en cromosomas que son estructuras intranucleares con la propiedad de autoduplicarse y de transmitir la información genética de los seres vivos.

### **1.1 ÁCIDOS NUCLEICOS.**

Hay 2 tipos de ácidos nucleicos (AN): el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), y están presentes en todas las células. Su función biológica no quedó plenamente demostrada hasta que Avery y sus colaboradores demostraron en 1944 que el ADN era la molécula portadora de la información genética. Los ácidos nucleicos son polímeros lineales de una unidad repetitiva llamada nucleótido (Figura de la derecha), cada nucleótido está formado, mediante un enlace éster, por un ácido fosfórico y un nucleósido (zona sombreada de la figura), este último se constituye por la unión de una pentosa (la D-ribosa o la 2-desoxi-D-ribosa), y una base nitrogenada (purina o pirimidina). Las bases nitrogenadas pueden ser purinas: ADENINA y GUANINA, las bases pirimidínicas son: CITOSINA, TIMINA y URACILO. La timina solo puede formar ADN y el uracilo solo está presente en el ARN.

Los nucleótidos se enlazan de modo encadenado para formar los ácidos nucleicos o polinucleótidos. A se complementa con T, y G se complementa con C. A menudo los pares de bases son mencionados como A-T o G-C, adenina a timina y guanina a citosina. Raramente los libros o las personas usan los nombres completos de las bases. A-T están unidas por dos puentes Hidrógeno y C-G por tres. Como cada una de las bases permite distinguir el nucleótido que lleva por lo general hay cuatro tipos distintos de desoxirribonucleótidos en el ADN y cuatro ribonucleótidos en el ARN.

## 1.2 ADN.

Es una molécula compleja formada por cientos y miles de nucleótidos distintos en secuencias diversas formando una cadena larga. En el hombre la dotación haploide de cromosomas presenta una molécula de ADN con una longitud total de aproximadamente dos a tres cuartos de billón de nucleótidos. En el ácido nucleico, los nucleótidos se unen unos a otros mediante el enlace azúcar-fosfórico-azúcar-fosfórico.etc (S-P). Con las purinas y las pirimidinas unidas como grupos laterales a las moléculas de azúcar.

### 1.2.1 Secuencia del ADN.

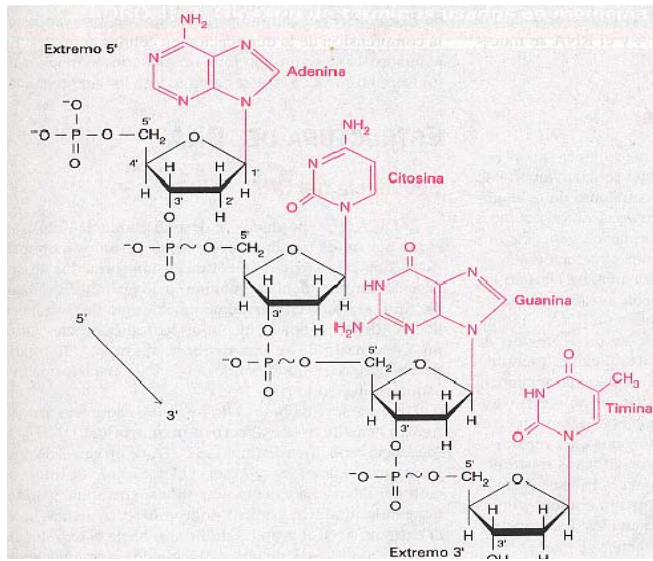
El ADN es un polímero de desoxirribonucleótidos formados por miles o incluso millones de residuos monoméricos. Los desoxirribonucleótidos están formados de una base de purina (adenina, guanina) o de pirimidina (citosina, timina) unida covalentemente al átomo de carbono 1' de la 2'- desoxirribosa. Una unión fosfodiéster une el grupo 5'- hidroxilo de la desoxirribosa al grupo 3'- hidroxilo de un desoxirribonucleótido adyacente para formar un esqueleto repetido. La secuencia específica distingue al ADN de un gen al de otro. La secuencia de base representa el contenido de información del ADN. La cadena de polidesoxirribonucleótido tiene polaridad. Un grupo 5'- hidroxilo se encuentra hacia el extremo 5', y el grupo 3'- hidroxilo hacia el extremo 3'; la dirección 5'→3' de una molécula de ácido nucleico es muy importante. Tal polaridad se puede encontrar a un en el ADN circular que no tiene un extremo 5'- hidroxilo ó 3'- hidroxilo libre. Para determinar la polaridad, se dibuja una flecha del grupo 5'- hidroxilo al grupo 3'- hidroxilo de un residuo de desoxirribosa, y esta flecha apunta en la dirección 5 → 3' (figura 1)

### 1.2.2 Estructura del ADN.

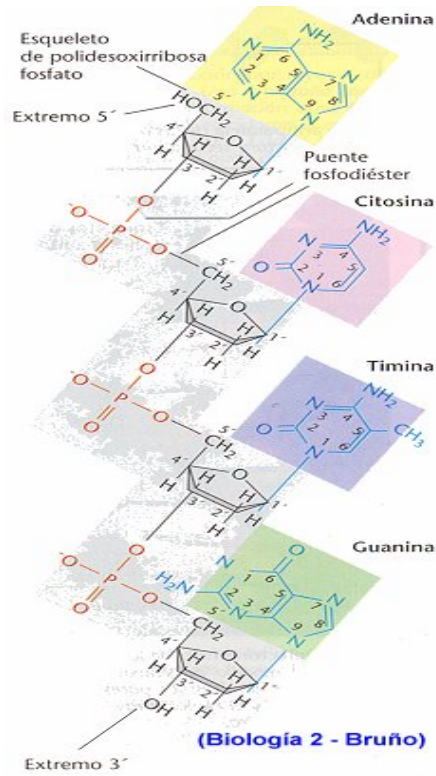
**1.2.2.1 Estructura primaria:** Se trata de la secuencia de desoxirribonucleótidos de una de las cadenas. La información genética está contenida en el orden exacto de los nucleótidos. (figura 2)

**1.2.2.2 Estructura secundaria:** Es una estructura en doble hélice. Permite explicar el almacenamiento de la información genética y el mecanismo de duplicación del ADN. La estructura secundaria. Fué postulada por Watson y Crick, basándose en: a. La difracción de rayos X que habían realizado Franklin y Wilkins (figura 3), b.La equivalencia de bases de Chargaff, que dice que la suma de adeninas más guaninas es igual a la suma de timinas más citosinas (figura 4)

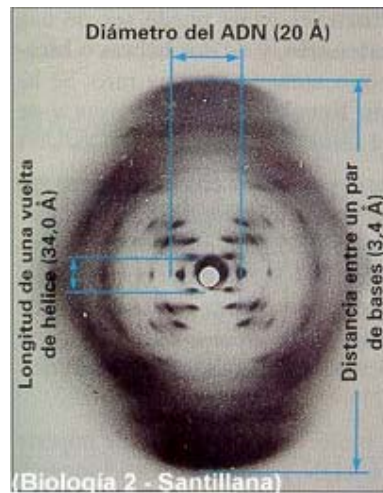
**Figura 1** Polaridad del ADN



**Figura 2** Estructura primaria

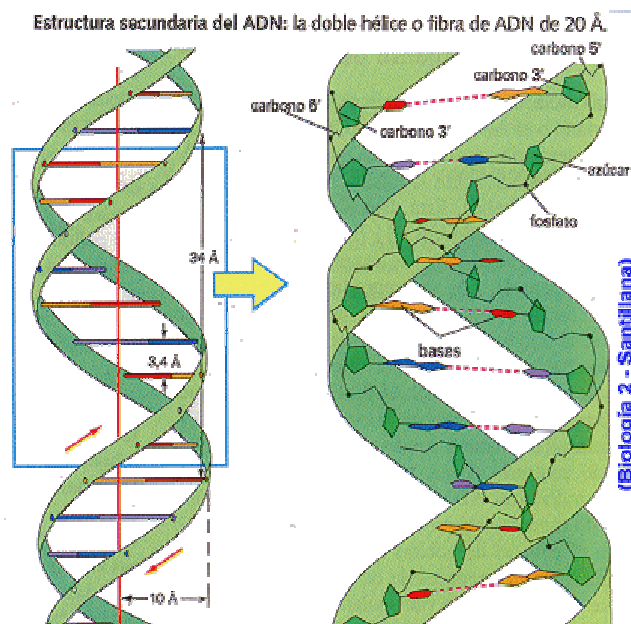


**Figura 3** La difracción de rayos X que habían realizado Franklin y Wilkins



Difracción de rayos X de ADN extraído del timo de ternera.

**Figura 4** La equivalencia de bases de Chargaff.



Es una cadena doble, dextrógira o levógira, según el tipo de ADN. Ambas cadenas son complementarias, pues la adenina de una se une a la timina de la otra, y la guanina de una a la citosina

de la otra. Ambas cadenas son antiparalelas, pues el extremo 3' de una se enfrenta al extremo 5' de la otra. (tabla 1)

**Tabla 1 Características de los tipos de ADN**

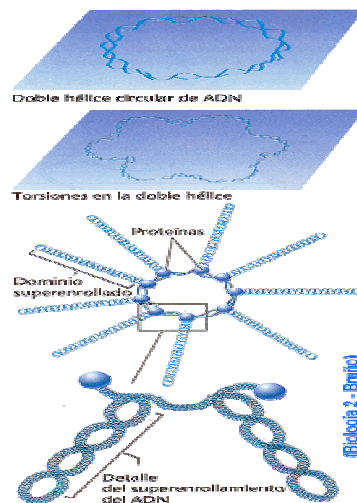
Tipo de ADN	Giro de hélice	nm por vuelta	Plano entre bases	n° de nucleótidos por vuelta
<b>A</b>	Dextrógiro	2.8	inclinado	11
<b>B</b>	Dextrógiro	3.4	perpendicular	10
<b>Z</b>	Levógiro	4.5	Zig-zag	12

**1.2.2.3 Estructura terciaria.**

Se refiere a como se almacena el ADN en un volumen reducido. Varía según se trate de organismos procariontes o eucariontes:

a. En procariontes se pliega como una super-hélice en forma, generalmente, circular y asociada a una pequeña cantidad de proteínas. Lo mismo ocurre en la mitocondrias y en los plastos. (figura 7)

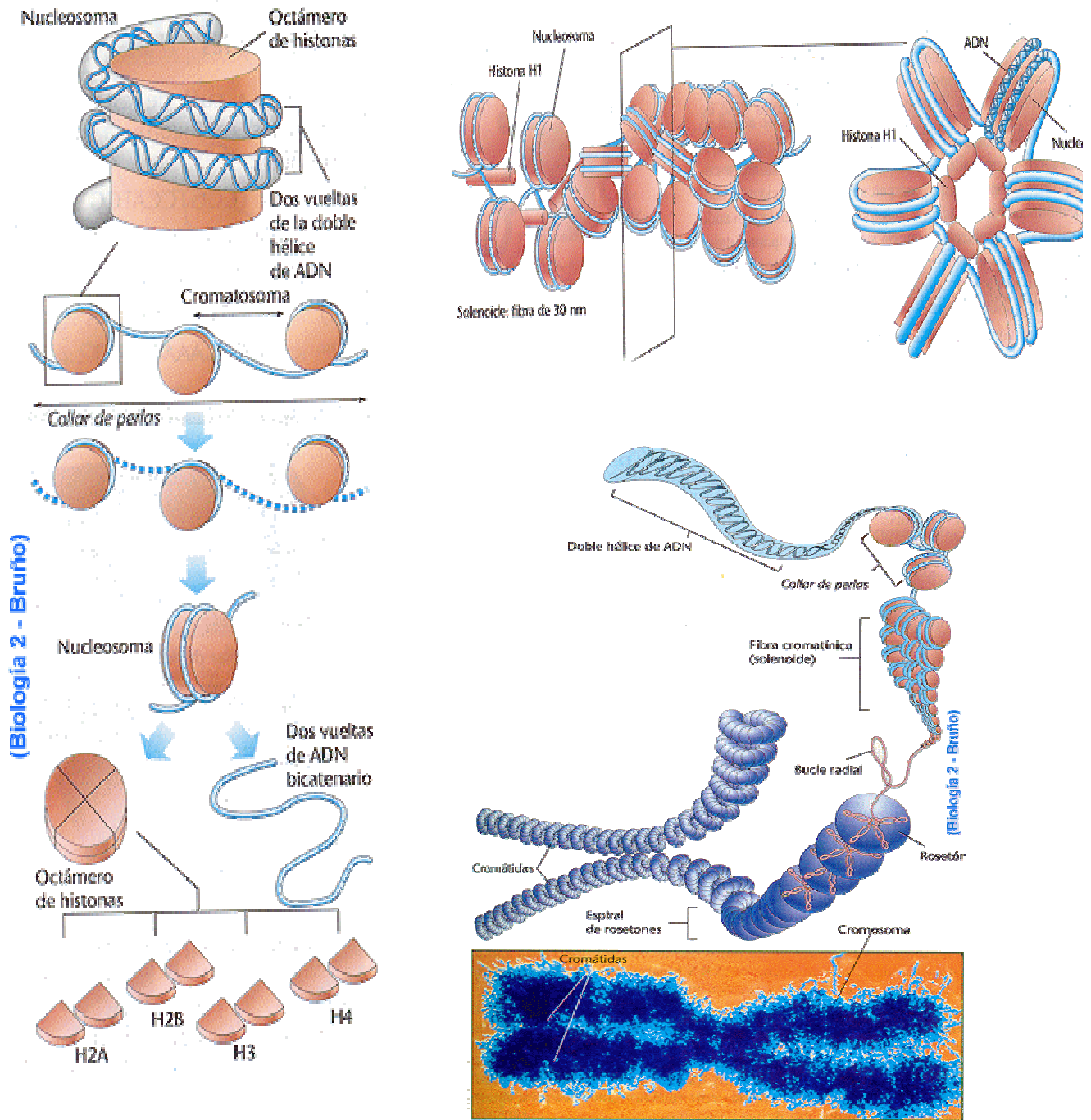
**Figura 5 ADN en procariotas**



b. En eucariontes el empaquetamiento ha de ser más complejo y compacto y para esto necesita la presencia de proteínas, como son las histonas y otras de naturaleza no histona (en los espermatozoides

las proteínas son las portaminas). A esta unión de ADN y proteínas se conoce como cromatina, en la cual se distinguen diferentes niveles de organización: Nucleosoma, collar de perlas, fibra cromátida, bucles radiales, cromosomas (figura 6)

**Figura 6 ADN en eucariotas**



### 1.2.2 Formas del ADN.

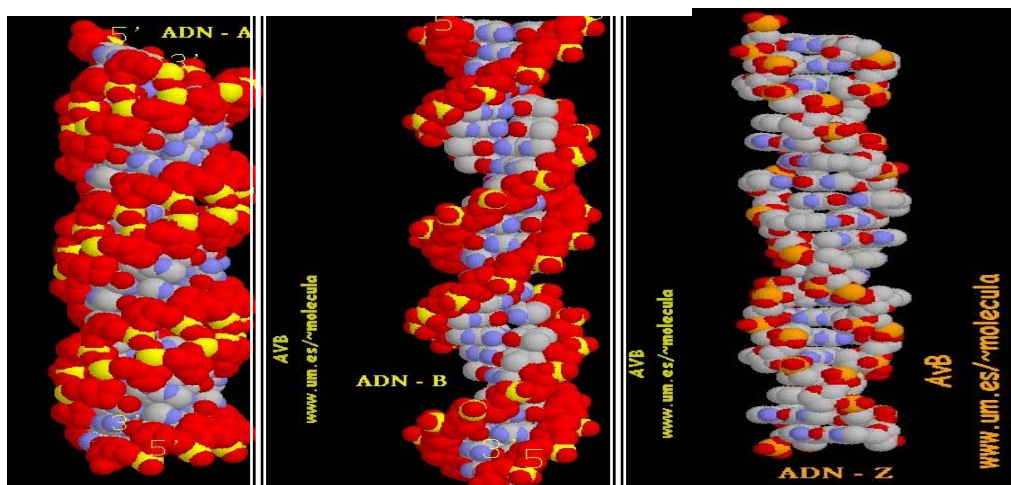
Se han observado tres tipos de forma en el ADN:

Forma tipo B: Descubierta por Watson y Crick es la que está presente en condiciones biológicas, es decir, cuando en el medio celular hay agua. Los planos de las bases nitrogenadas son perpendiculares al eje, además las hélices se enrollan según las agujas del reloj, dextrógira. Watson y Crick constituyeron un modelo de este tipo ya que conocían los tamaños atómicos de los distintos componentes del ADN, comprobando que cada 0,34 nm se encontraban un par de bases y que la doble hélice daba un giro completo cada 3,4 nm siendo el diámetro de 2 nm. Existen 10 pares de bases por cada vuelta de hélice.

Forma tipo A: Se presenta únicamente cuando no hay agua. Los planos de las bases son ligeramente oblicuos al eje longitudinal. La hélice es dextrógira y hay un giro completo cada 2,8 nm, en cada vuelta podemos encontrar 11 nucleótidos. Se forma por deshidratación de la estructura tipo B y se cree que es la estructura que presenta los ARN de doble cadena, los híbridos de ADN y ARN y las zonas con doble hélice de los ARNt y ARNr.

Forma tipo Z: Aparece cuando el ADN ya se ha expresado o que no se va a expresar nunca porque no tiene información. Presenta una doble hélice levógira, el giro completo se produce cada 4,5 nm y contiene unos 12 residuos por vuelta. Por tanto, esta estructura es más alargada y delgada que las anteriores. El esqueleto de la hélice tiene un aspecto de zigzag, de ahí su nombre. Es común encontrar ésta estructura donde sus bases están metiladas, genes ya expresados o genes que no van a expresarse, por eso se asocia a la ausencia de actividad del ADN. (figura 7)

**Figura 7** Formas tipo B, A y Z del ADN





### **1.2.3 Desnaturalización del ADN.**

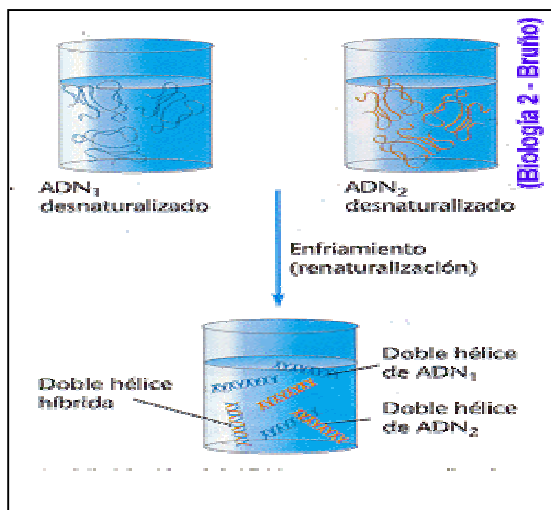
Es el cambio físico del ADN cuando se somete a: pH<sub>s</sub> extremados, cambios de temperatura, disminución de la constante dieléctrica del medio acuoso por incorporación de alcoholes, cetonas, etc., exposición a la urea, amidas y otras soluciones similares. Cuando la temperatura alcanza el punto de fusión del ADN, la agitación térmica es capaz de separar las dos hebras y producir una desnaturalización. Dos conjuntos de fuerzas son las responsables de mantener la estructura del doble hélice del ADN: Los puentes de hidrógeno están entre los pares de base y las interacciones del apilado son las bases sucesivas. Cuando cualquiera de los dos conjuntos de fuerza se interrumpen, la estructura duplohelicoidal nativa experimenta su transición a una forma con lazos al azar, denominada ADN desnaturalizado o monofilar. En la desnaturalización de la estructura del ADN duplex se distinguen dos etapas:

- a. Las dos hebras se desarrollan parcialmente pero permanecen unidas por lo menos mediante un corto segmento de la estructura duplohelicoidal con algunas bases complementarias todavía en registro. Los segmentos desenrollados de las hebras adoptan una conformación cambiante y al azar.
- b. En la segunda etapa ambas hebras se separan por completo una de otra, si en este estado se enfrían rápidamente cada una de las hebras se doblan sobre sí misma para formar unos segmentos duplohelicoidales intracatenarios.

### **1.2.4 Renaturalización del ADN.**

Este es un proceso reversible, ya que al bajar la temperatura se puede producir una renaturalización. Las cadenas del ADN separada se renaturalizarán o reasociarán cuando se alcance la temperatura fisiológica y las condiciones de salinidad adecuado. La desnaturalización de un ADN homogéneo es fácilmente reversible si el proceso de desenrollamiento no ha pasado de la primera etapa. Mientras un segmento duplohelicoidal esté uniendo a las dos hebras con los pares de base en su sitio, los segmentos desplegados de las dos hebras volverán a enrollarse espontáneamente reformando un dúplex completo instantáneamente se produce un retorno a la conformación nativa, que es la de mínima energía libre. Sin embargo, si las dos hebras se han separado por completo la renaturalización es más lenta. (figura 8)

**Figura 8 Renaturalización de un ADN**



1.2.5

**Cromosomas.**

Los cromosomas son estructuras intranucleares con la propiedad de auto duplicarse, de alberga información genética y, además, transmitirla de una generación celular a otra. Por lo general, son visibles durante la división celular. Su aspecto depende del estado fisiológico de la célula, pero se presentan frecuentemente como filamentos delgados, enrollados sobre sí mismos, con una longitud que varía entre una y 20 micra.

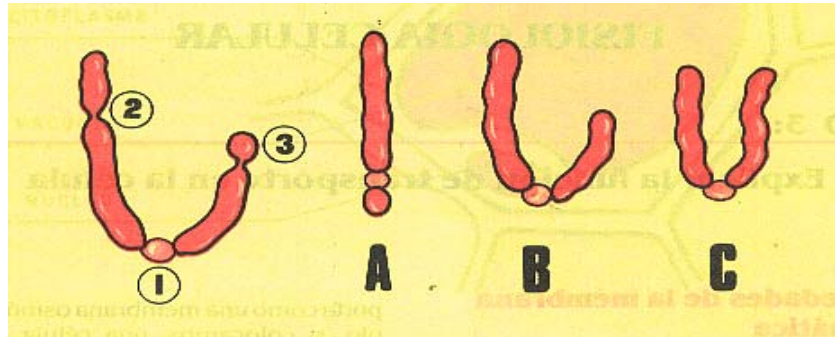
El estudio de la estructura de los cromosomas se suele realizar durante la metafase de las mitosis somáticas porque en estas fases son fácilmente observables en su estructura.

Los cromosomas se presentan como estructura cilíndrica con una disminución de calibre denominada constricción primaria, que los divide en dos segmentos que reciben el nombre de telómeros o brazos cromosómicos. La telomerasa es la enzima responsable de la síntesis del telómeros, importante, de mantener la longitud del telómeros.

La ubicación de la constricción primaria determina la longitud de los brazos, permitiendo clasificar los cromosomas, morfológicamente en tres grandes grupos:

- a. Acrocéntrico: que son los cromosomas que adoptan la forma de bastón con un brazo muy pequeño y otro de gran longitud.
- b. Metacéntrico: cuando la constricción primaria es central y los dos brazos son iguales en forma de V.
- c. Submetacéntrico: cuando la constricción primaria se encuentra entre el centro y el extremo cromosómico originando brazo desigual en forma de J o L.

**Figura 9 Partes de los cromosomas**



1 Centrómero; 2 Estrangulación secundaria; 3 Satélite; A acrocéntrico; B submetacéntrico; C metacéntrico.

En meta fase los cromosomas poseen una doble simetría, con cromátida hermana idénticas conectadas en un centrómero. El centrómero es una región A-T de cerca de 130 pares de bases, y une a varias proteínas con alta afinidad. Este complejo, llamado centro simétrico, proporciona el ancla para los usos mitóticos, una estructura esencial para la segregación cromosómica durante la mitosis.

#### **1.2.5.1 Estructura cromosómica de un procarionta.**

El ADN de una célula procarionta (*E.coli*), consiste en una sola molécula doble (doble cadena). El ADN o cromosoma es un círculo cerrado covalentemente. El cromosoma también está superenrollado o superentorcido. Este proceso introduce superespirales negativas y produce una forma de ADN más compacta. Las variaciones de las superespirales conducen a la formación de isómeros con topología diferente llamado topoisómeros.

Las procariontas tampoco tienen genes con segmentos internos (intrones) no expresados en el producto genético maduro. Además, los procariontas carecen de segmentos de ADN “basura” o “egoísta” que aparentemente no tienen función alguna. El ADN procarionta forma complejo con sales positivamente cargadas y con poliaminas, como putrescina y espermidinas. Los procariontas carecen de una clase prominente de proteínas básicas llamadas histonas que tienen un papel muy estructural en la formación de la cromatina en las células de animales y plantas.

#### **1.2.5.2 Estructura cromosómica de un eucariota.**

Las células eucariotas pueden contener varios o muchos cromosomas, según las especies. Cada cromosoma contiene una molécula muy grande de ADN. La longitud total de todo el ADN presente en una sola célula de mamífero se ha calculado que debe ser 2 metros, admitiendo que es duplohelicoidal.

Esto equivale a unos  $5,5 \times 10^9$  pares de bases. La organización ultraestructural del ADN en el núcleo de las células eucariotas es muy compleja, y experimenta cambios espectaculares durante el ciclo celular. Durante la interfase, periodo entre las mitosis, el núcleo eucariótico contiene un retículo irregular de cromatina, denominada así por su tendencia a teñirse profundamente por colorante básico. Las fibras de cromatina de las células somáticas tienen un diámetro de unos 20 nanómetros. Consta de dos componentes principales, el ADN y unas proteínas básicas llamadas histonas. Además contiene algunas proteínas enzimáticas tales como la ADN polimerasa, así como ARN nuclear y algunos lípidos. Las histonas son relativamente pequeñas y muy básicas, es decir, a pH 7 están positivamente cargadas, y poseen pesos moleculares comprendidos entre 10.000 y 20.000. Existen 5 clases principales, que se diferencian en su contenido relativo en lisina y en arginina. Se cree que las moléculas de histonas se hallan regularmente dispuestas en el surco profundo de la doble hélice del ADN. Las cargas positivas de las histonas forman asociaciones electrostáticas con los grupos fosfato negativos del ADN, lo cual hace más estable y flexible a la molécula de ADN. Las mitocondrias de las células eucariotas contienen un ADN que es completamente diferente del hallado en el núcleo. El ADN mitocondrial es de doble hebra y circular, y tiene un peso molecular de tan solo 10000. El ADN mitocondrial difiere también del nuclear de la célula en su composición en bases. En las células somáticas existen de cuatro a seis moléculas de ADN por cada mitocondria, pero el total del ADN mitocondrial es mucho menos del 1% del total del ADN contenido por la célula.

## **2 MATERIALES Y METODOS**

### **2.2 Materiales**

Hígadito de pollo

Varilla de vidrio

Mortero

Vasos de precipitado

Pipeta

Portaobjeto

Colorante básico

Probeta

Alcohol de 96

Cloruro sódico 2M

SDS

Arena

Trocito de tela para filtrar

## 2.2 Métodos

1. Triturar medio higadito de pollo en un mortero. Añadir arena para que al triturar se puedan romper las membranas de y queden los núcleos sueltos.
2. Añadir al triturado, 50 centímetros cúbicos de agua. Remover hasta hacer una especie de papilla.
3. Filtrar varias veces sobre una tela para separar los restos de tejidos que hayan quedado por romper.
4. Medir el volumen del filtrado con una probeta.
5. Añadir al filtrado un volumen igual de cloruro sódico 2M. Con esto conseguimos producir el estallido de los núcleos para que queden libres las fibras de cromatina.
6. A continuación se añade 1 centímetro cúbico de SDS. (Nota: Si no se dispone de este producto puede sustituirse por un detergente de vajillas, tipo Mistol o similar. La acción de este detergente es formar un complejo con las proteínas y separarlas del ADN. Así nos quedará el ADN libre de las proteínas que tiene asociadas.
7. Añadir mediante una pipeta 50 ml de alcohol de 96. Hay que hacerlo de forma que el alcohol resbale por las paredes del vaso y se formen dos capas. En la interfase, precipita el ADN.
8. Introducir una varilla de vidrio e ir removiendo en la misma dirección. Sobre la varilla se van adhiriendo unas fibras blancas, visibles a simple vista, que son el resultado de la agrupación de muchas fibras de ADN.
9. Esta práctica puede completarse con una tinción específica de ADN. Tenemos que tomar una muestra de las fibras que se van depositando sobre la varilla de vidrio y depositarlas sobre un portaobjeto.
10. Teñir durante unos minutos con un colorante básico.
11. Observar al microscopio.

## 3. AUTO-EVALUACIÓN.

1. Revise en el index Merck que propiedades y el nombre químico del SDS
2. Porque cree Ud., que el NaCl produce el estallido de los núcleos
3. Porque se usa un colorante básico para teñir el ADN, mencione dos.
4. Que son las histonas
5. Que diferencias hay entre el ADN eucariota y el procariota

#### 4. INFORME 12 (ARN)

**Apellidos**

Grupo de prácticas

Fecha

Calificaciones

**Nombres**

N° del mesón

N° del estudiante

Entrada		Desarrollo		Informe		<b>Definitiva</b>	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

1. Dibuje en el siguiente cuadro los mononucleótidos de los ácidos nucleicos presentes en el ADN y coloque su nombre.


2. Dibuje sus observaciones al microscopio

3. Escriba unas corta líneas sobre las estructuras y propiedades del ADN.

**Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.**