

Química Biológica I TP 8 DNA: extracción, identificación y reconocimiento

OBJETIVO:

- Utilizar técnicas sencillas para extraer ADN de tejido vegetal.
- Reconocer los componentes estructurales del ARN y ADN.

FUNDAMENTO:

Los ácidos nucleicos son compuestos nitrogenados de elevado peso molecular que se pueden encontrar en las células asociados a proteínas formando complejos llamados núcleo-proteínas. Estas proteínas tienen carácter básico mientras que los ácidos nucleicos son ácidos. Se conocen dos grupos de ácidos nucleicos: RNA (ácido ribonucleico) y el DNA (ácido desoxirribonucleico). La hidrólisis controlada de RNA y DNA produce nucleótidos. Si la hidrólisis continúa se producen nucleósidos y finalmente fosfatos, azúcares y bases púricas y pirimidínicas.

La función biológica de los ácidos nucleicos es fundamental: el DNA está asociado con el material genético de las células, pudiendo encontrarse como una sola cadena en algunos microorganismos o formando parte de núcleo-proteínas de los cromosomas en organismos superiores. Almacena información genética y sirve de molde para la síntesis de proteínas. Se encuentra mayoritariamente en el núcleo y en muy poca cantidad en mitocondria y cloroplastos. El RNA participa en la síntesis de proteínas y se distribuye en toda la célula, mayormente en citoplasma en forma soluble o formando parte de los ribosomas.

El protocolo básico de extracción de DNA consiste en el tratamiento del homogeneizado con disolventes orgánicos (fenol, cloroformo o ambos)

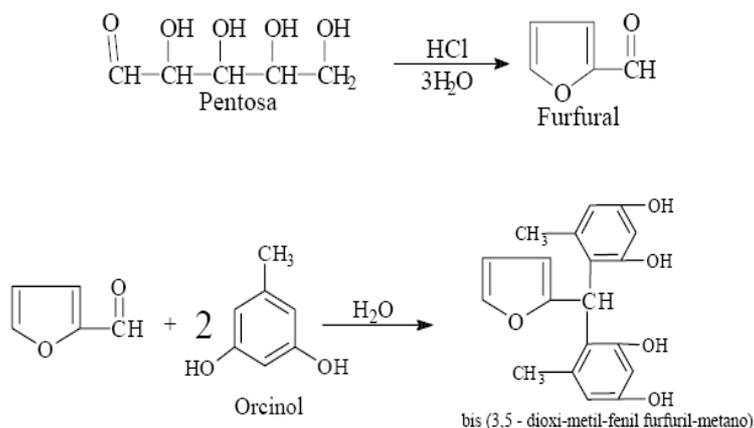
Para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos en extractos celulares vegetales se requiere células en cantidad suficiente y en medio libre de interferencias que puedan causar lisis celular o hidrólisis de los ácidos nucleicos por nucleasas. Una completa extracción de ácidos nucleicos es fundamental para la determinación indirecta.

Una hidrólisis ácida remueve todas las bases púricas (hidrólisis de uniones N-glicosídicas entre pentosa y las bases púricas) sin afectar las uniones fosfodiéster del esqueleto nucleotídico, por lo tanto obtenemos como producto ácidos nucleicos sin bases púricas.

Las desoxipentosas debido a la hidrólisis ácida sufren deshidratación dando aldehídos δ -hidroxi-levulínicos. Estos reaccionan con difenilamina dando un producto de color azul. Así, la reacción de difenilamina servirá para caracterizar, indirectamente, la presencia de DNA en células de cebolla.

La pentosa del DNA y RNA puede evidenciarse por la reacción con orcinol. El ácido sulfúrico hidroliza las uniones fosfodiéster y N-glicosídicas, liberando ribosa, bases púricas, pirimidínicas y ácido fosfórico.

La pentosa en medio ácido se deshidrata originando furfural que reacciona con el orcinol dando un producto verde que demuestra la presencia de DNA y RNA.



El grupo fosfato se identifica por la reacción para fósforo inorgánico, en medio ácido, con el molibdato (reactivo 1) da fosfomolibdato, color amarillo, que es reducido luego por el ácido ascórbico (reactivo 2) a azul de molibdeno, color azul verdoso. El reactivo 3 (arsenito/citrato) se combina con el exceso de molibdato impidiendo su reacción posterior con otros fosfatos.

Parte experimental:

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DNA DE CELULAS VEGETALES.

Reactivos

Solución de lisis: 0,1 % de SDS en 25 mM EDTA pH 8,0

Solución de lisis alternativa: 120 ml H₂O, 1,5 g NaCl, 5 g bicarbonato de sodio, 5 ml de detergente

Alcohol etílico 95%

Rvo difenilamina: 0,2 g en 20 ml de ácido acético glacial y adicionar 0,5 ml de ácido sulfúrico. (Preparar en el momento)

Rvo Bial: 1,5 g de orcinol en 500 ml de HCl cc y 20 gotas de cloruro férrico 100 g/l

Pelar y rallar una cebolla mediana con rallador o procesador hasta picarla finamente. Pesar 10 g de cebolla rallada y adicionar 25 ml de solución de lisis y dejar 20 min. a t° amb. Filtrar en gasa y recoger en probeta. Transferir 4 ml de filtrado a un tubo de ensayo. Adicionar 2 volúmenes de etanol 95% procurando no mezclar las dos soluciones. En la interfase observar la

formación de una fina hebra. Aspirar la interfase con pipeta Pasteur y separarla en un tubo. Precipitar el DNA por calentamiento suave. Observar. Homogeneizar para realizar reacciones.

Reacción para caracterización de DNA (desoxipentosa)

Cuando se trata el ADN con difenilamina en condiciones ácidas, se forma un compuesto azul con una absorción definida máxima a 595 nm. Esta reacción la dan en general las 2-desoxipentosas y no es específica para el ADN. En solución ácida, la estructura lineal de una desoxipentosa se convierte a la forma b- hidroxilevulinoaldehído altamente reactiva y que reacciona con difenilamina para dar un complejo azul.

	Tubo A	Tubo B
Agua destilada	1 ml	-
Extracto	-	1 ml
Rvo difenilamina	2 ml	2 ml

Hervir 10 minutos, enfriar y observar.

Reacción para identificación de pentosa (ribosa o desoxirribosa)

La reacción de Bial es una reacción general para las pentosas y se debe a la formación de furfural cuando se calienta la pentosa con ácido clorhídrico concentrado. El orcinol reacciona con furfural en presencia de cloruro férrico como catalizador, dando una coloración verde. Solamente los nucleótidos de purina dan una reacción considerable.

	Tubo A	Tubo B
Agua destilada	1 ml	-
Extracto	-	1 ml
Rvo orcinol	2 ml	2 ml

Hervir 10 minutos, enfriar y observar.

Reacción para identificación de grupo fosfato.

La presencia del grupo fosfato se determina indirectamente por la presencia de fósforo inorgánico con formación de azul de fosfomolibdeno.

	Blanco	Problema
Agua Destilada	0,1 ml	
Extracto	-	0,1 ml
Rvo 1	0,5 ml	0,5 ml
Mezclar y esperar 30 seg.		
Rvo 2	0,5 ml	0,5 ml
Mezclar y esperar 30 seg.		
Rvo 3	0,75 ml	0,75 ml

Mezclar, incubar 15 minutos a 37° y observar el color.