

## **Extracción de ADN genómico vegetal (Doyle, 1987).**

### **Equipos:**

- Bloque térmico
- Guantes
- Juego de micropipetas
- Microtubos estériles de 1.5 ml
- Microcentrífuga
- Palitos trituradores
- Puntas de micropipeta estériles
- Vórtex
- Campana de extracción
- Biofotómetro

### **Reactivos y productos:**

- Tampón de extracción CTAB
- Cloroformo:alcohol isoamílico (24/1)
- Etanol absoluto
- Etanol 70%
- Tampón TE o H<sub>2</sub>O miliQ
- Nitrógeno líquido

### **Precauciones:**

- Trabajar con guantes en todo momento.
- Manejar el nitrógeno líquido con cuidado de no quemarse, pues se encuentra a -196°C.
- Trabajar en la campana de extracción de gases al manipular cloroformo, pues es irritante en contacto con la piel, mucosas y tracto respiratorio. También es considerado carcinógeno y puede dañar el hígado y los riñones.

### **Método (Protocolo del CTAB modificado):**

1. Coger uno o dos discos de tejido de hoja de tomate joven en un tubo eppendorf.

2. Rotular el tubo y meterlo en el depósito con nitrógeno líquido con cuidado.
3. Sacar el tubo con pinzas y rápidamente triturar el tejido en el microtubo con un palito triturador hasta que quede reducido a polvo muy fino (evitando la descongelación del tejido).
4. Añadir inmediatamente 600 µl de tampón de extracción CTAB.
5. Mezclar por agitación o vórtex.
6. Incubar 15-20 minutos a 65°C en el bloque. A esta temperatura aumenta la eficacia de la lisis celular.
7. Añadir a continuación unos 600 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24/1) y agitar manualmente hasta que se forme una emulsión verdosa. Al mezclar una solución acuosa con cloroformo se desnaturalizan las proteínas y se separan de los ácidos nucleicos. El alcohol isoamílico facilita la separación de fases y evita la formación de espuma en la agitación.
8. Centrifugar 5 minutos a 11000 rpm. Tras este paso se observarán 2 fases, una inferior orgánica y otra superior acuosa, separadas por una interfase viscosa que contiene las proteínas desnaturalizadas, polisacáridos, restos de paredes y membranas (“debrís”).
9. Recuperar la fase acuosa, que es la que contiene el ADN (400-500µl) evitando coger restos de las otras fases.
10. Añadir 500 µl de etanol absoluto (frío) y mezclar por inversión suavemente. El etanol deshidrata los ácidos nucleicos favoreciendo la precipitación. En este paso se pueden observar fibras de ADN precipitando.
11. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm y eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet.
12. Añadir 100 µl de etanol al 70%.
13. Centrifugar 3 minutos a 13000 rpm y eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet.
14. Eliminar el sobrenadante con la pipeta.
15. Resuspenderlo en 50 µl de H<sub>2</sub>O miliQ.
16. Cuantificar el ADN en el biofotómetro.
17. Guardar el ADN resuspendido en congelador a -20°C.

## **Composición de los tampones empleados:**

### Tampón de extracción CTAB:

2% CTAB (p/vol)

20 mM EDTA

100 mM Tris-HCl pH 8

1.42M NaCl

\*CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) es un detergente catiónico que en soluciones con alta concentración iónica actúa formando complejos con proteínas y polisacáridos, pero sin precipitar ácidos nucleicos.

\*EDTA (ácido etilen diaminotetraacético) es un quelante que inhibe la acción de las ADNasas al constituir complejos con cationes metálicos como el  $Mg^{2+}$ .

\*Tris-HCl (Tris (hidroximetil) aminometano HCl) presenta la capacidad tamponante de pH.

\*NaCl crea un medio salino que rompe las paredes celulares.