Biomédica
Vol 13 No. 3 - 1993

COMPARACION DE METODOS PARA LA RECUPERACION DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Jorge Contreras [1], María Orfa Rojas [1], Gladys Pinilla [1], Moisés Wasserman [2]

Se ensayaron cuatro métodos para la recuperación de ADN separado por electroforesis en gel de agarosa. Se usaron diferentes cantidades y tamaños de ADN. Se discuten las condiciones especiales, los cuidados de cada método y la recuperación según el tamaño y las cantidades iniciales utilizadas.

INTRODUCCION

La frecuente necesidad de recuperar y purificar fragmentos de ADN separados sobre geles de agarosa y poliacrilamida ha llevado al desarrollo de gran variedad de métodos (1-9). Teniendo en cuenta que ninguno ha mostrado ser plenamente satisfactorio, se han realizado modificaciones a cada uno de ellos con el fin de hacerlos más eficientes.

Uno de los métodos utilizados es la electroforesis y recuperación sobre un papel de DEAE-celulosa. Es una técnica simple que se puede aplicar a varias muestras simultáneamente. El ADN obtenido es de alta pureza. El método fue inicialmente desarrollado por Girvitz quien utilizó membranas de diálisis (1). Posteriormente es modificado introduciéndose las membranas de DEAE-celulosa que tienen la ventaja de no liberar fibras, presenta una matriz de mayor densidad y estár cargadas positivamente por la introducción de grupos amino (2, 3). El método se basa en la unión del ADN a las membranas por interacciones electrostáticas, entre las cargas positivas en la membrana y las cargas negativas del ADN. La elución del ADN se hace con un buffer de alta fuerza iónica.

La electroelución (EE) fue usada por primera vez por McDonell en 1977 (4). El método consiste en cortar el fragmento de gel que contiene el ADN que se quiere purificar, introducirlo en una bolsa de diálisis con un buffer, someter la bolsa a un campo eléctrico para sacar el ADN de la agarosa, purificarlo mediante extracciones orgánicas y concentrarlo por precipitación etanólica .

Otro procedimiento es hacer electroforesis empleando agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) y cortar el fragmento de gel que contiene el ADN que se desea purificar, fundirlo y, mediante extracciones orgánicas, retirar la agarosa. El ADN queda en la fase acuosa (9).

La utilización de matriz de sílica fue descrita por Vogelstein en 1979 (7). Se basa en la unión del ADN de cadena sencilla y doble a la matriz a través de interacciones polares débiles. La elución del ADN se hace con un solvente polar (H_2O).

METODOLOGIA

Se probaron los cuatro métodos mencionados. Se separaron fragmentos de ADN de tres tamaños y de cada uno tres cantidades diferentes (tabla 1).

1 Instituto Nacional de Salud, Universidad Nacional de Colombia
2 Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Santafé, de Bogotá.

TABLA 1. Separación de DNA de fago lambda cortado con HIND III.

TAMAÑO (Kb)		CANTIDAD (µg)	
24	5	1	0,25
*2	0,9	0,18	0,045
0,5	0,11	0,024	0,006

(*) Este fragmento corresponde a las bandas de 2 y 2,3 kb del ADN lambda Hind III.

Se realizaron cuatro electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión. El gel fue de un tamaño de 6,5x10x1 cm. Las electroforesis se realizaron a 1 voltio/cm. En cada una se separaron tres muestras, así: 10, 2 y 0,5 µg de ADN de fago Lambda cortado con la enzima de restricción Hind III. Se hizo purificación del ADN de las bandas de 2.400, 2.000 y 2.300 (se tomaron conjuntamente) y 500 pb. Las bandas de ADN se visualizaron mediante tinción sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml durante 10 minutos e iluminando con una lámpara de luz ultravioleta de 302 nm. Se cortaron las bandas de interés para purificar el ADN.

La purificación por extracciones orgánicas de la agarosa de bajo punto de fusión de hizo de la siguiente forma (5,6,9):

1. Se fundió la agarosa por calentamiento a 65°C y se agregó un volumen igual de TE (Tris pH:7,5 10 mM, EDTA pH:8,0 1 mM).
2. Se hizo extracción orgánica agregando un volumen de fenol, igual al volumen final obtenido después de agregar el TE. Se mezcló por 5 minutos. Se centrifugó a 5.000 g, 3 minutos para separación de fases y se descartó la fase orgánica.
3. A la fase acuosa se le hizo extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 respectivamente, la extracción fue similar a la anterior. De igual forma se hizo una extracción con cloroformo.
4. Se retiró el bromuro de etidio haciendo extracción con isobutanol saturado con agua.
5. Se hizo precipitación etanólica llevando la concentración salina de la solución a 0,3 M con NaAc y agregando dos volúmenes de etanol absoluto. Se incubó 30 minutos a -20°C. Se centrifugó 20 minutos a 15.000 g. El precipitado se resuspendió en buffer TE. Se hizo cuantificación espectrofotométrica y por electroforesis en gel de agarosa (AGE) del DNA.

La electroelución (EE) se hizo de la siguiente forma (4,5,6):

1. Se introdujo el trozo de gel en una bolsa de diálisis que contiene 500 µl de TE. Se colocó la bolsa en una cámara de electroforesis ante un campo elétrico de 1 voltio/cm durante 5 minutos. El ADN salió del gel y se pegó a las paredes de la bolsa.
2. Se cambió la polaridad del campo eléctrico durante 30 segundos para liberar al ADN de la bolsa y dejarlo disuelto en el TE.
3. Se saca el TE de la bolsa y se hace:
   a. Extracción con fenol.
   b. Extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.
   c. Extracción con cloroformo.
   d. Extracción con isobutanol.
   e. Precipitación etanólica.
4. Se resuspendió el ADN precipitado en TE y se cuantificó.

La recuperación sobre una membrana de nylon cargada positivamente se hizo de la siguiente forma (3,5,6):

1. Se trataron las membranas sumergiénlas 5 minutos en una solución 10mM de EDTA pH 8,0; se lavaron con agua destilada; se sumergieron en una solución 0,5 N de NaOH y se lavaron y almacenaron con agua estéril.
2. Se insertaron fragmentos de membrana de nylon (tratados) inmediatamente por debajo de las bandas de ADN de interés.

3. Se continuó la electroforesis durante el tiempo necesario para que el ADN pasara a la membrana.
4. Se lavó la membrana con un buffer de baja concentración salina (150 mM de N_aCl).
5. Se eluyó el ADN en un buffer de alta concentración salina (1 M de N_aCl). Se hizo una segunda elución.
6. Con el eluído se realizó:
   a. Extracción fenólica.
   b. Extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.
   c. Extracción con cloroformo.
   d. Extracción con isobutanol.
   e. Precipitación etanólica.
7. Se resuspendió el ADN en TE y se cuantificó.

El procedimiento de purificación con matriz de sílica (GENECLEAN™) se realizó de la siguiente manera (7,8):

1. A los fragmentos de gel que contenían el ADN de interés se agregaron 2.5 volúmenes de una solución de NaI. Se incubó 5 minutos a 55 °C.
2. Se adicionó 5 µL de la suspensión de sílica (GLASSMILK™). Se incubó 15 minutos a 4 °C.
3. Se centrifugó 5 minutos a 5.000 rpm
4. Se agregó al precipitado 400 µL de etanol al 50%, 10 mM de Tris pH:7,5, 0,1 M de NaCl y 1 mM de EDTA (NEWWASH™). Se centrifugó 5 minutos a 5.000 g. Este procedimiento se repitió tres veces.
5. Para eluir el ADN se agregaron 50 µL de TE y se incubó 3 minutos a 55°C.
6. Se centrifugó 3 minutos a 5.000 g y se cuantificó el ADN en sobrenadante.

La valoración del ADN recuperado por los diferentes métodos se hizo por electroforesis, espectrofotómetro y se hicieron diluciones seriadas de una solución con concentración conocida de ADN para una cuantificación rápida con bromuro de etidio (6).

RESULTADOS Y DISCUSION

Algunas fracciones de ADN obtenidas por métodos que utilizan extracción con solventes orgánicos, al hacer la valoración espectrofotométrica presentaron un espectro con un desplazamiento del máximo de absorción de 260 nm (para ácidos nucleicos) a 270 nm indicando contaminación con fenol (figura 1). Es importante buscar la manera de eliminar completamente cualquier traza de este solvente de las soluciones de ADN debido a que su presencia interfiere en la mayoría de reacciones enzimáticas.

De igual forma el ADN extraído por GENECLEAN queda con trazas de NaI. Al hacer la valoración espectrofotométrica, en algunas muestras, la presencia de NaI impide la valoración del ADN (datos no mostrados). Los lavados e incluso una precipitación etanólica a la solución de ADN son insuficientes para la eliminación completa del NaI. Sin embargo, la presencia de NaI no afecta significativamente las reacciones en las cuales se utiliza el ADN. El GENECLEAN tiene la ventaja de no utilizar extracciones orgánicas evitando la contaminación con fenol y evita la precipitación etanólica dando rapidez al proceso.

ESPECTROS PRODUCIDOS POR ADN Y FENOL

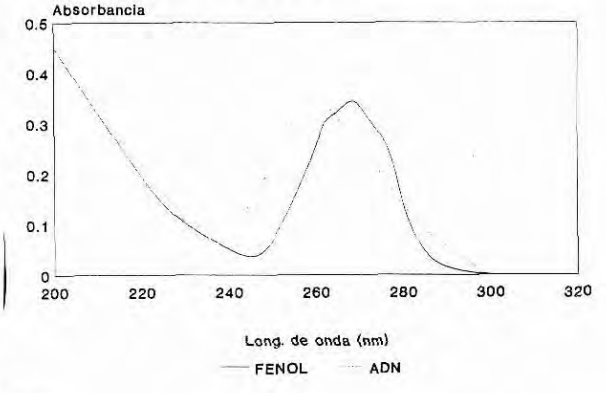

Figura 1

Para obviar los problemas anteriores, las cifras obtenidas para calcular el porcentaje de recuperación (figura 2) de cada una de las muestras con relación al teórico esperado fue realizado por cuantificación rápida con bromuro de etidio (figura 3) y una evaluación cualitativa y cuantitativa por AGE de cada una de las muestras obtenidas (figura 4). Un hecho importante fue la visualización de bandas por electroforesis de muestras en las cuales por coloración con bromuro de etidio no fue posible detectar la presencia de ADN.

Uno de los problemas de la recuperación de ADN de geles de agarosa es la cantidad. Entre menor es la cantidad de ADN, disminuye proporcionalmente la recuperación. Por ninguno de los métodos fue posible recuperar ADN cuando se parta de cantidades inferiores a 180 ng.

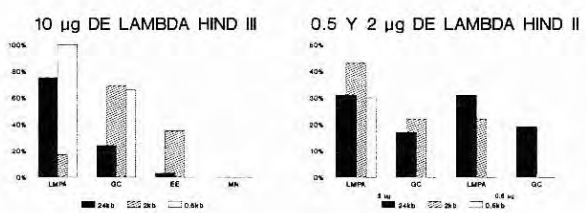

Figura 2: Se compara el porcentaje de recuperación de los 4 métodos: agarosa de bajo punto de fusión (LMPA), GENECLEAN (GC), electroelución (EE) y unión a membranas de nylon (MN).

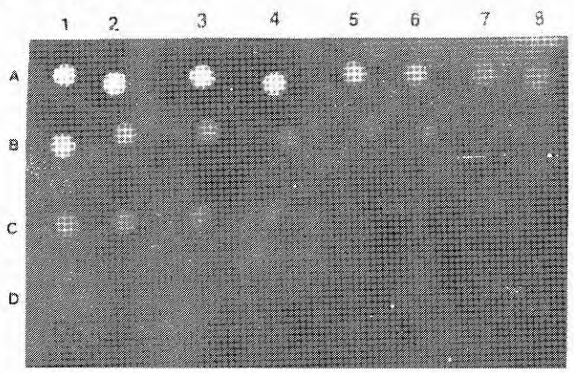

Figura 3: Cuantificación de DNA con bromuro de etidio. Se hicieron diluciones seriadas de un ADN comercial de concentración conocida (A) desde 25 ng/µL hasta 0.2 ng/µL (1-8). Se hacen diluciones seriadas de cada una de las muestras: 24kb (B), 2kb (C) y 0.5kb (D). Por la comparación de la intensidad de señal en las muestras con el patrón se establece la concentración.

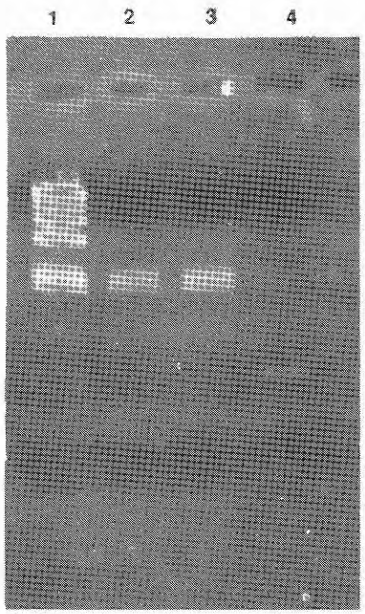

Figura 4: Control de recuperación del DNA purificado por electroforesis en agarosa. (1) marcador lambda Hind III,(2 y 3) fragmento de 2kb y (4) fragmento de 0.5 kb.

Se puede afirmar que el método que da mayor eficiencia de purificación, independiente del tamaño y de la cantidad de ADN, fue la utilización de LMPA.

Las cifras de recuperación para los fragmentos de 500 y 2000 pb por la LMPA y de GC fueron similares. Para los fragmentos de 24.000 pb la recuperación por GC fue sensiblemente menor. Este problema está descrito en la literatura para los métodos que utilizan la unión a matriz sólida (5). Con moléculas de ADN de gran tamaño, el número de interacciones por molécula con la matriz es mayor, dificultando la elución. Una característica que llama la atención para la utilización de GENECLEAN es la rapidez, sencillez y bajo costo; el procesamiento de una muestra emplea 30 minutos.

Por los métodos de EE y recuperación sobre la membrana de nylon prácticamente no hubo recuperación para todos los tamaños y cantidades de ADN probados. La afinidad de los ácidos nucléicos es muy grande por la membrana de nylon cargada dificultando su elución.

SUMMARY

We tested four different methods to purify DNA from agarose gels. Various amounts of DNA and fragments of different size were used. An estimation of the recoverery of DNA, depending on the initial quantity and the size of the fragment is presented. Special conditions and applicability of each method are discussed.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Instituto para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, Colciencias, y la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional, JICA.

REFERENCIAS

1. **Girvitz OC, Bacchetti S, Rainbow AJ et al.** A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels. Anal Biochem 1980; 106:492.

2. **Dretzen G, Bellard M, Sassone-Corsi P, et al.** A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal Biochem 1981; 112:295.

3. **Lizardi PM.** Binding and recovery of DNA and RNA using S&S NA- 45 DEAE Membrane. Schleicher and Schuel.

4. **McDonell MW, Simon MN, Studier FW.** Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J Mol Biol1977; 110:119.

5. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. I, Harbor: 1989.

6. **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al.** Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Vol. I and II, 1989.

7. **Vogelstein B, Gillespie D.** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76:613.

8. GENECLEAN™. Manual técnico. BIO 101 Inc. La Jolla: California.

9. **Wieslander L.** A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarosa gels. Anal Biochem 1979; 98:305.