

Tehnica extracției și purificării ADN

Ulterior realizării unui extract (lizat celular) dintr-un țesut (animal sau vegetal) sau culturi bacteriene sau fungice, în vederea analizei ADN este necesară mai întâi extracția și purificarea sa. Distingem mai multe metode:

	Metode tradiționale		Metode alternative	
	Extracția cu fenol-cloroform	Salting-out	Extracția cu ajutorul membranelor de siliciu	Extracția cu ajutorul bilelor magnetice
Avantaje	Generează ADN în cantitate relativ mare și de o integritate sporită	Metodă mai rapidă, fără reactivi toxici	Metodă rapidă, eficientă și rapidă	Poate fi automatizată, fiind rapidă
Dezavantaje	Presupune timp îndelungat de lucru Utilizează reactivi toxici	Puritate mai mică comparativ cu extracția cu fenol-cloroform	Cantități mult mai reduse de ADN extras Costuri ridicate	Cantități mai mici de produs ADN

după Baptista și colab. (2021) Trends in Food Science & Technology, 109, 386-397

Protocolul de extracție ADN cu fenol-cloroform

Reactivi și soluții necesare

1. Soluție fenol : cloroform : alcool izoamilic (25 : 24 : 1). Se prepară 100 ml din soluție sau se utilizează soluția stoc existentă în laborator.

2. Cloroform, stoc, soluție 100ml

3. Etanol 95%, păstrat la rece (-20°C), 100ml

4. (opțional) Soluție NaOH 10N; 40g NaOH într-o soluție de volum total 100 ml.

5. (opțional) Soluție Tris-HCl 1M (pH=8); Se cântăresc la balanța analitică 12,11g Tris și se introduc într-o eprubetă de 100 ml cu 80 ml apă ultrapură. Se aduce la pH=8 cu HCl iar apoi se adaugă apă ultrapură până la semn.

6. (opțional) Soluție EDTA 0,5M (pH=8); se cântăresc la balanța analitică 18,61g EDTA sare disodică care se introduc într-un pahar Berzelius cu 80 ml apă ultrapură. Se agită puternic și se adaugă soluție NaOH 10N până când pH ajunge la valoarea pH=8. Se transferă într-un balon cotate și se aduce la semn cu apă ultrapură.

7. Soluție Tris-EDTA (TE); sunt necesare soluțiile de la punctele 5-6; într-o eprubetă de 100ml se introduce 1ml soluție Tris-HCl 1M, 200 μL EDTA 0,5M.

Procedura de lucru

Se lucrează sub nișă, folosind protecția adecvată (halat, mănuși). Microtuburile și soluțiile utilizate trebuie să fie autoclavate (sterile).

1. Lizatul celular congelat se aduce la temperatura camerei și se distribuie în microtuburi de 1,5 ml. Microtuburile se etichetează corespunzător. Se adaugă 600 μ l de soluție fenol:cloroform:alcool izoamilic până la semn. Tuburile se agită în mână, prin mișcări ușoare, până când lizatul celular se resuspendă în soluție. Se poate vortexa dacă utilizăm un lizat celular obținut prin ultrasonicare sau alte metode agresive, care fragmentează ADN. Se centrifughează la o turație de 8000 rpm timp de 4 minute. La finalul centrifugării, tuburile vor prezenta trei faze: faza inferioară ce conține solventul organic (inclusiv lipidele, imiscibile cu apa), faza intermediară (resturile celulare, organite dezintegrate, aminoacizi liberi, fragmente proteice, etc), iar faza superioară conține acizii nucleici (în soluție).

2. Faza superioară a fiecărui tub se extrage (700 μ l) cu ajutorul unei micropipete în noi tuburi. Peste aceasta se adaugă 500 μ l cloroform. Se agită maxim un minut și apoi se centrifughează la 8000 rpm, 3 minute.

3. Se extrage supernatantul, cu grijă, fără a se prelua nimic din fazele inferioare. Se adaugă etanol 95% până la semn (max 1,5 ml) și se agită foarte ușor. Este necesară precipitarea ADN.

Opțiunea 1: Se lasă la congelator timp de 30-60 minute, timp în care ADN va precipita. Apoi, se centrifughează tuburile la 10000 rpm timp de 5 minute pentru sedimentarea completă a ADN.

Opțiunea 2: Se centrifughează timp de 15 minute cu o centrifugă cu răcire, la 4°C.

4. Se extrage supernatantul și se elimină, ADN rămânând sub formă de peletă la baza tubului. Ultimele picături de etanol se separă printr-o centrifugare scurtă (minim 10000 rpm câteva secunde) și se extrag cu micropipeta de 20 μ l. Se așteaptă uscarea la aer preț de câteva minute.

5. Se adaugă câte 300 μ l soluție TE în tuburi și se resuspendă ADN prin pipetare ușoară. Tuburile se pot ține în mână pentru a le încălzi și a favoriza solubilizarea ADN. Pentru solubilizare totală (în vederea cuantificării sau a altor experimente) se incubează la 37°C timp de 2 ore.

6. Probele se păstrează la 4°C sau la minim -20° dacă vor fi folosite peste un timp îndelungat.

Tehnica salting-out pentru extracția ADN

Se bazează pe utilizarea unei soluții saturate de NaCl (6M) pentru a extrage proteinele din lizat.

Reactivi și soluții necesare

1. Reactivii de la punctele 3-7 de la protocolul extracției cu fenol-cloroform
2. Soluție NaCl 6M; 35g NaCl într-o soluție de volum total 100 ml

Procedura de lucru

1. Lizatul celular congelat se aduce la temperatura camerei și se distribuie în microtuburi de 1,5 ml. Microtuburile se etichetează corespunzător. Se adaugă 600 μ l de soluție NaCl saturată și se agită la vortex. Se centrifughează la 2500 rpm timp de 15 minute.

2. Se efectuează pașii 3-6 de la tehnica extracției cu fenol-cloroform.

Cuantificarea purității ADN

La finalul extracției și purificării ADN, este necesar să evaluăm puritatea produsului obținut. Acest lucru se face în mod obișnuit utilizând un spectrofotometru nanodrop sau μ Drop. Acesta măsoară absorbția soluției la diferite lungimi de undă. ADN absoarbe radiațiile luminoase în jurul a 260 nm, în timp ce proteinele sau alți contaminanți absorb în jurul lungimii de undă 280 nm. Se evaluează raportul dintre absorbanta la 260 / raportul dintre absorbanta la 280. O valoare de 1,7-1,8 indică o puritate foarte bună, iar puritatea este acceptabilă la valori A_{260}/A_{280} de 1,9-2. Mulți cercetători apelează și la raportul A_{260}/A_{230} întrucât mulți compuși organici contaminanți (fenol, trizol) absorb la 230 nm. Raportul necesar pentru confirmarea purității este cuprins între 2-2,2.

Alternativ, se poate măsura la spectrofotometru, folosind o micro-cuvetă.