

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO EN PONCE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

Biol 3013 Laboratorio de Biología Moderna

Ejercicio 9. Estructura del DNA

Introducción

Existen dos tipos de ácidos nucleicos: DNA y RNA. Estas moléculas les permiten a los organismos vivos reproducir sus componentes de una generación a otra. El DNA posee instrucciones para su propia replicación y además dirige la síntesis de RNA. A través de la síntesis de RNA, el DNA también controla la síntesis de proteínas. El DNA es el material de herencia en todos los organismos celulares, cada molécula de DNA es muy grande y puede poseer cientos de genes. Codificada en la estructura del DNA esta la información que programa todas las actividades celulares.

Los ácidos nucleicos son moléculas poliméricas formadas por monómeros llamados nucleótidos. Cada nucleótido se compone de tres partes: una molécula orgánica llamada base nitrogenada, una pentosa y un grupo funcional fosfato. Existen dos familias de bases nitrogenadas, las pirimidinas y las purinas. Las pirimidinas están formadas por un anillo de seis miembros que incluye átomos de carbono y nitrógeno. Los átomos de nitrógeno en este anillo pueden adquirir hidrógeno de soluciones, por eso se les llama bases nitrogenadas. Los miembros de esta familia lo son Citosina (C), Timina y Uracilo (U). La timina esta presente en nucleótidos de DNA mientras que el Uracilo solo estará en nucleótidos de RNA. Las purinas son más grandes y están formadas por dos anillos, uno de cinco miembros y el otro de seis. Las purinas son adenina(A) y Guanina (G) y pueden estar presentes en nucleótidos de DNA como en los de RNA. Solo la presencia y localización de los grupos funcionales las diferencian entre si. La pentosa esta enlazada a la base nitrogenada a través de un enlace en el carbono uno del azúcar. La pentosa presente en los nucleótidos del RNA es ribosa y en los del DNA se encuentra desoxirribosa. La única diferencia entre estas pentosas es la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono dos de la ribosa que es sustituido por un átomo de hidrógeno en la desoxirribosa.

En un polinucleótido, los nucleótidos están enlazados entre si por un enlace covalente llamado enlace fosfodiéster. El enlace se forma entre el grupo fosfato de un nucleótido y la pentosa de otro. El DNA consiste de dos hebras de polinucleótidos que forman un espiral alrededor de un eje imaginario formando una doble hélice. El modelo de la doble hélice fue propuesto en 1953 por James Watson y Francis Crick. En este modelo los "esqueletos" de pentosas y fosfatos están en la parte exterior de la hélice mientras que las bases nitrogenadas están apareadas en el interior a través de dos o tres puentes de hidrógeno. Esta conformación tridimensional está ayudada por las interacciones de van der Waals entre las bases nitrogenadas. El apareo de bases es de modo específico, citosina con guanina formando tres puentes de hidrógeno y adenina formando solo dos puentes con la timina. Cada molécula de DNA puede consistir de miles o millones de pares de bases.

Objetivos

Al finalizar este laboratorio los estudiantes serán capaces de utilizar adecuadamente el equipo y materiales necesarios para la extracción de DNA y conocerán las condiciones óptimas para el proceso. Podrán reconocer al equipo utilizado por nombre y función al igual que fortalecerán su entendimiento del cambio sufrido por la estructura de las células para poder separar las moléculas de DNA.

Materiales

- germen de trigo sin tostar
- Etanol al 95% frío
- detergente líquido
- baño de hielo
- agua destilada
- ablandador de carnes
- Bicarbonato de sodio
- morteros
- lápiz de cera
- cronómetro
- Centrífuga y sus tubos
- detergente y cepillo para fregar
- vasos de precipitado
- pipetas
- matraz volumétrico de 100ml
- baño de María a 55°C
- termómetro
- hornilla/mezcladora + cápsulas
- presilla gigante
- probetas
- balanza y platos de pesaje
- video de Extracción de DNA
- papel secante

Métodos

El germen de trigo es el embrión del trigo. Es rico en vitaminas y nutrientes y es una fuente excelente de DNA. El procedimiento utilizado facilita la liberación del DNA del núcleo y luego hace que se precipite. Esta es una actividad de extracción de DNA utilizando agentes químicos de uso casero. Aislaremos el DNA del germen de trigo crudo utilizando jabón de fregar, ablandador de carnes, bicarbonato y etanol.

Previo al laboratorio

Coloque el etanol al 95% en el congelador a 0°C si es posible desde el día anterior. No lo remueva del congelador hasta el momento de utilizarlo y mientras no lo utilice manténgalo en una neverita con hielo y tapada.

Durante el Laboratorio

1. Mida 45ml de agua destilada y colóquela en un vaso de precipitado de 250ml. Coloque el vaso en un baño de María con agua a 55°C durante tres minutos. [Si la temperatura se aleja mucho de los 55°C, las probabilidades de éxito disminuyen. La temperatura nunca debe alcanzar los 60°C.]
2. Vierta 2g de germen de trigo crudo (el procedimiento no funcionara con germen tostado) en un mortero y macere hasta obtener pequeñas partículas.
3. Transfiera el germen macerado al mismo vaso de precipitado. Añada 3ml de detergente líquido poco a poco. Homogenice la solución moviendo el contenido del

vaso en forma circular según añada el detergente. Incube nuevamente en el baño de María durante 5 minutos a 55°C.

4. **Una sola persona por sección.** Prepare una solución de bicarbonato 1M pesando 8.4g de bicarbonato y disolviendo en 50ml de agua destilada. Mezcle bien utilizando una cápsula magnética sobre la hornilla/mezcladora **fría**. Transfiera los 50ml de solución a un matraz volumétrico de 100ml. Complete con agua destilada hasta 100ml de solución y homogenice.
5. Luego de los 5 minutos de incubación, añada lentamente 2g de ablandador de carnes y 5ml de la solución de bicarbonato 1M. Incube la mezcla a 55°C por 20 minutos.
6. Transfiera el vaso con la mezcla a un baño de hielo por 5 minutos, agitando suavemente durante todo ese tiempo.
7. Remueva del baño de hielo y permita que llegue a temperatura ambiente.
8. Decante y centrifuge por 5 minutos. Al terminar, decante el sobrenadante en un vaso de 125ml y descarte el precipitado.
9. Con mucho cuidado, utilizando una pipeta, coloque una capa de 20ml de etanol al 95% frío. Permita que el alcohol fluya suavemente desde la pipeta colocando la punta de la pipeta contra la superficie interna del vaso, justo sobre el nivel de la solución.
10. Se hará evidente una interfase entre la capa de alcohol y la solución. El precipitado blanco que se formará es el DNA. Sumerja la presilla de metal y enrolle las fibras de DNA usando un movimiento rotatorio lento.
11. Transfiera a un tubo limpio con agua destilada.

Preguntas de discusión para contestar en el laboratorio

Según sus conocimientos de la estructura de las células eucarióticas y las propiedades bioquímicas de los ácidos nucleicos, conteste las siguientes preguntas

- 1 ¿Dónde está el DNA de las células eucarióticas? ¿Por qué el jabón facilita la extracción del DNA celular? ¿Por qué calentar lo facilita aun más?

6. Como y por que se precipita el DNA?

7. Existirá alguna enzima celular que pueda degradar al DNA

Bibliografía

Dolphin, Warren D. 1997. *Biology Laboratory Manual*. 4th Ed.

Mader, Sylvia S. 2000. *Inquiry into life, Laboratory Manual* 9th Ed.

Vodopich & Moore. 2002. *Biology Laboratory Manual*. 6th Ed.

Referencias en Internet

www.salonhogar.com

Esta separata fue revisada y editada en marzo 2004 por el Prof. David Forestier.