



## Purificación de DNA genómico con la Solución de Chomczynski

La Solución de Chomczynski se utiliza para purificar el DNA genómico a partir de células o tejidos de origen animal y vegetal, o de bacterias y levaduras. El DNA se purifica en dos pasos: un paso de lisis celular y homogenización con la **Solución de Chomczynski**; y otro de precipitación con **Alcohol Etilico**. La simplicidad y rapidez del método permiten el procesamiento simultáneo de gran número de muestras, y la reproducibilidad y pureza del DNA obtenido permite su uso posterior en cualquier aplicación en Biología Molecular.

### *Lisis y Homogenización:*

**a) Tejidos:** Homogenice las muestras de tejido con 1 ml de la **Solución de Chomczynski** por 50-100 mg de tejido, usando un homogenizador de vidrio con teflón (uno en el que el émbolo encaje con soltura) y homogenice completamente con el mínimo de golpes (normalmente se necesitan de 5-10 golpes). Si se trata de pequeñas cantidades de un tejido suave (como el bazo y el cerebro), se puede fragmentar y lisar por pipeteo repetido con una micropipeta. Los tejidos de plantas deben ser pulverizados antes de mezclarlos con la **Solución de Chomczynski**, lo que se puede hacer eficientemente si primero se congelan en nitrógeno líquido o hielo seco con etanol.

**b) Células crecidas como monocapa:** Lise las células directamente en la placa de cultivo, añadiendo 0.75-1.0 ml de **Solución de Chomczynski** por cada 10 cm<sup>2</sup> del área de la placa de cultivo (1 ml en una placa de 3.5 cm de diámetro), agitando la placa y pasando suavemente con una pipeta el lisado celular a un tubo nuevo.

**c) Células crecidas en suspensión:** Añada 1 ml de **Solución de Chomczynski** por cada 1-3 x 10<sup>7</sup> células, sedimentadas o en suspensión, cuyo volumen no exceda 0.1 ml, y lise las células por pipeteo suave y repetido.

**d) Núcleos de células:** Añada 1 ml de **Solución de Chomczynski** por cada 1-3 x 10<sup>7</sup> núcleos de células, sedimentados o en suspensión, cuyo volumen no exceda 0.1 ml, y lise los núcleos por inversión del tubo o pipeteo suave y repetido.

**e) Sangre:** Con muestras de hasta 100 µl de sangre, añada 1 ml de **Solución de Chomczynski** y lise las células por pipeteo suave y repetido. Si el volumen de la muestra es mayor de 100 µl, entonces mezcle la sangre, en proporción 1:5, con un buffer de lisis (Sacarosa 0.32 M, Tris 10 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y Tritón X-100 1%), y agite suavemente hasta lograr la lisis celular. Centrifugue a 4000 rpm (1000xg) por 10 min a 2-8°C y deseche el sobrenadante (puede usar una pipeta Pasteur). Añada 1 ml de **Solución de Chomczynski** y lise el precipitado o sedimento de núcleos por pipeteo suave y repetido.

Opcionalmente, centrifugue el homogenizado por 10 min a 10000xg a 4°C o temperatura ambiente y transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso permite eliminar fragmentos insolubles de tejido, RNA, y polisacáridos; sólo se requiere para purificar DNA de tejidos como el hígado, el músculo y los tejidos vegetales que contienen gran cantidad de material extracelular, y es recomendable si se quiere minimizar la contaminación del DNA con RNA.



### ***Precipitación del DNA:***

1- Precipite el DNA añadiendo 0.5 ml de **Alcohol Etilico** absoluto por cada ml de **Solución de Chomczynski** usada en la homogenización.

2- Mezcle por inversión e incube 1-3 min a temperatura ambiente. El DNA se puede visualizar como un precipitado blanco nebuloso.

3.a- Si el precipitado de DNA es suficientemente grande, se puede pescar con una punta de pipeta o una bagueta, enrollarlo sobre ésta, y moverlo hacia la boca del tubo, dejándolo en la pared del tubo cerca de la boca (otra alternativa es transferirlo a un tubo nuevo). Deseche el sobrenadante con mucho cuidado, coloque el tubo verticalmente por 1 min y elimine por aspiración el resto del sobrenadante que quede en el fondo del tubo.

3.b- Si se pipeteó mucho para lograr la lisis y homogenización, y por esa causa el DNA se fragmentó, o si hay poco DNA en la muestra, el DNA no formará el precipitado nebuloso visible. En estos casos se debe centrifugar a 4000xg por 1-2 min a temperatura ambiente o a 4°C para precipitar el DNA.

4- Lave dos veces el precipitado de DNA con 0.8-1.0 ml de **Alcohol Etilico al 95%**. En cada lavado agite por inversión, coloque verticalmente el tubo durante 0.5-1 min para que el precipitado de DNA se sedimente en el fondo del tubo, y elimine el **Alcohol Etilico al 95%** con una micropipeta.

5- Seque el precipitado al aire y a temperatura ambiente por 5-15 min.

6- Disuelva el precipitado de DNA en una solución de **Sodio Hidróxido 8 mM** por pipeteo suave y repetido. Añada la cantidad necesaria de esta solución para alcanzar una concentración de DNA de 200-300 ng/µl (normalmente serían 200-300 µl de **Sodio Hidróxido 8 mM** para una preparación hecha a partir de 10<sup>7</sup> células o 10-20 mg de tejido de origen animal. Si después de solubilizado el DNA, queda algún material insoluble en la preparación, elimínelo por centrifugación a 10000xg por 10 min, y transfiera el sobrenadante con el DNA a un tubo nuevo.

### **Notas:**

- El homogenizado puede guardarse un día a temperatura ambiente, o tres días a 2-8°C.
- El DNA se puede conservar en **Alcohol Etilico al 95%** por al menos una semana a temperatura ambiente, o tres meses a 2-8°C.
- La solubilidad del DNA que ha sido purificado con la **Solución de Chomczynski** es baja en los buffers de **Tris**, por eso se utiliza el **Sodio Hidróxido 8 mM**, que asegura la total solubilización del precipitado de DNA.
- Las preparaciones de DNA hechas a partir de tejidos como el hígado, el músculo y los tejidos vegetales que contienen gran cantidad de material insoluble (mayormente polisacáridos) deben ser centrifugadas a 10000xg por 10 min para eliminar el material insoluble.
- La solución de **Sodio Hidróxido 8 mM** debe prepararse mensualmente, y por dilución de una solución madre concentrada (2-4 M) que no tenga más de seis meses de antigüedad.
- Si se desea cuantificar con exactitud la cantidad de DNA, tome una alícuota, dilúyala en **Sodio Hidróxido 8 mM** y mida la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. Calcule la cantidad de DNA asumiendo que 1 unidad de A<sub>260</sub> equivale a 50 µg de dsDNA/ml.
- El DNA purificado contiene RNA parcialmente degradado. Si se quiere disminuir el contenido de RNA en la preparación, realice el paso opcional de centrifugación después de la homogenización. Para análisis de DNA por Southern Blot, el RNA puede eliminarse suplementando la mezcla de digestión con RNasa A (1 µg/ml).
- La razón A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> del DNA purificado suele estar en el rango de 1.6-1.9; y el peso molecular, de 20-100 kb. El peso molecular depende del grado de fragmentación del DNA, causado por fuerzas mecánicas durante la lisis y homogenización y durante la solubilización del precipitado.

### **Referencias:**

- Cox, R. A. (1968) *Methods in Enzymology* (Grossmann, L. & Moldave, E., Eds.) Vol. 12, Part B, pp. 120-129, Academic Press, Orlando, FL.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G. & Struhl, K. (1990) in *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, p. A.1.5, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.