



## DANAEXTRACTOR SALIVA 2

### 1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

Este kit permite a cada alumno individualmente aislar su propio ADN a partir de una muestra de su saliva.

### 2. COMPONENTES

COMPONENTES	CANTIDAD	CONSERVACIÓN
<b>SOLUCIÓN DE LISIS</b>	30 ml	T <sup>a</sup> ambiente
<b>SOLUCIÓN ACETATO DE SODIO</b>	6 ml	T <sup>a</sup> ambiente
<b>ETANOL ABSOLUTO</b>	80 ml	<b>4°C</b>
<b>PROTEINASA K 50 µg/ml</b>	2 x 275 microlitros	<b>-20°C</b>
<b>TUBO 15 ml</b>	25 unidades	T <sup>a</sup> ambiente
<b>PIPETA PASTEUR 1 ml</b>	25 unidades	T <sup>a</sup> ambiente
<b>PIPETA PASTEUR 3 ml</b>	25 unidades	T <sup>a</sup> ambiente

Material necesario y no suministrado:

- Micropipeta o micropipetas de 20 ul a 200 ul y las correspondientes puntas.
- Micropipeta o micropipetas de 200 ul a 1000 ul y las correspondientes puntas.
- Guantes, gafas y batas.

## 3. PRACTICA

### 3.1 METODOLOGÍA

1. Obtener la muestra.

El primer paso es obtener las células de las cuales extraeremos el ADN. Estas células se obtienen muy fácilmente rascando la lengua y las paredes interiores de la boca.

2. Liberar el contenido de las células.

- a) **Lisis:** este es el proceso mediante el cual se rompen las membranas celulares y nucleares. Esto se consigue con detergentes que permiten liberar el ADN en la solución.
- b) **Descompactar el ADN:** utilizamos la proteinasa K, un enzima que degrada las proteínas que estaban ligadas al ADN y que lo mantenían compactado. Así que, cuando actúa la proteinasa K, el ADN se descompacta y al mismo tiempo se degradan otras moléculas orgánicas de nuestra muestra, como las DNasas, unas enzimas cuya función es degradar el ADN.
- c) **Neutralizar la carga del ADN:** este proceso se realiza utilizando una sal, el acetato de sodio. Los iones  $\text{Na}^+$  se unen a los grupos fosfato del ADN que tienen una carga negativa.

3. Precipitar el ADN

El paso final es la precipitación del ADN que nos permitirá hacer visible lo invisible. Para ello utilizamos el etanol. El ADN es soluble en agua, pero cuando añadimos etanol se desenrolla y precipita. Tras añadir el etanol, observamos hebras blancas que empiezan a aparecer en suspensión. Es nuestro ADN.

### 3.2 PROTOCOLO

1. La obtención de una buena muestra de saliva **es el paso más importante** del proceso. El objetivo es obtener muestras de saliva en donde encontremos el mayor número posible de células que contengan una gran cantidad de ADN.

Es importante que no se haya bebido ni comido nada antes de 30 minutos de la toma de la muestra.

Secretar 1.5 ml de saliva en un vaso u otro envase adecuado (no suministrado). Para facilitar la obtención del mayor número de células posible rascar con la lengua el interior de la boca, paladar y mejillas, e incluso dientes, durante 1 minuto, para desprender las células de estas zonas antes de secretar la saliva.

2. Recoger 1 ml de saliva utilizando la pipeta pasteur de 1 ml y colocar su contenido en el tubo de 15 ml.

3. Utilizando una micropipeta de 200-1000  $\mu\text{l}$  o pipeta pasteur de 1 ml (no suministrada) añadir **1ml de Solución de Lisis** al tubo de 15 ml que contiene la saliva.

4. Tapar bien el tubo y mezclar su contenido por inversión.



5. Utilizando una micropipeta añadir **20 µl de Proteinasa K**. Apoya la pipeta en la pared del tubo y deja que el líquido resbale por la pared.



6. Tapar bien el tubo y mezclar su contenido por inversión.



7. Incubar durante 10 minutos y agitar cada 3 minutos.

8. Añadir 200 µl de Acetato de Sodio. Tapar bien el tubo y mezclar su contenido por inversión.

9. Utilizando la pipeta pasteur de 3 ml añade **3 ml del Etanol, que siempre debe estar frío a 4°C (muy importante)**. Apoya la pipeta en la pared del tubo **y deja que el líquido resbale muy lentamente**.

10. Incubar 2 minutos sin agitar.

11. Tapar bien el tubo y mezclar su contenido **por inversión muy lentamente**.



12. El ADN aparecerá en forma de precipitado blanquecino. Observamos hebras blancas que empiezan a aparecer en suspensión. Es nuestro ADN. Lo ideal es que aparezca como una única hebra blanca compacta pero muchas veces se disgrega y aparecen muchas pequeñas hebras blancas.

