

“PUESTA A PUNTO DEL METODO DE EXTRACCION DE ADN CON CTAB EN ALFALFA (*Medicago sativa* L.)”.

GRANDON, N. G.; MORENO, M. V.; GIECO, J. O.

Grupo de Biotecnología en Cultivos. INTA - Estación Experimental Agropecuaria Manfredi.
Ruta Nacional N° 9 Km 636. (5988) Manfredi - Córdoba.

Correo-e: gabygrandon@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

Para cualquier tipo de análisis molecular por PCR (Polymerase Chain Reaction) se requiere un buen método de extracción de ADN, que permita obtener tanto una cantidad significativa como una alta calidad del mismo. En base a referencias bibliográficas, el método que emplea CTAB (Bromuro de cetil - trimetil amonio) como agente extractivo es el más utilizado en muestras verdes de alfalfa.

El principio de extracción consiste en que el CTAB produce la disgregación de las membranas celulares, dando origen a la ruptura celular. El buffer de extracción, además de contener CTAB, cuenta con polivinilpirrolidona (PVP) que elimina los polifenoles y β - mercaptoetanol que desnaturaliza proteínas. Este método no sólo facilita la extracción, sino también permite obtener una mejor limpieza del ADN, eliminando compuestos secundarios o polisacáridos que puedan interferir luego con su amplificación.

El objetivo del siguiente trabajo consistió en poner a punto el método de extracción con CTAB para la obtención de ADN a partir de hojas de alfalfa maceradas en nitrógeno líquido o liofilizadas.

METODOLOGÍA

Se pesaron 0.03 gr de la muestra en un eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 500 μ l de la solución buffer de extracción [1% de CTAB, 1% de β - mercaptoetanol y 2% de PVP]. Se incubaron los tubos a 60°C durante 50' en baño termostático con agitación constante, luego se los retiró y se les agregó 250 μ l de una solución de cloroformo:octanol en proporción 24:1. Se invirtieron suavemente varias veces hasta homogeneizar la mezcla y centrifugaron a 4000 rpm por 10'. Se trasvasó el sobrenadante límpido a tubos nuevos (con una recuperación de aproximadamente 450 μ l) y se les agregó el mismo volumen de isopropanol frío. Se invirtieron suavemente unas 10 veces y se dejaron reposar a temperatura ambiente unos minutos para facilitar la precipitación. Luego se centrifugaron los tubos a 10.000 rpm por 10' a 4°C y se descartó el sobrenadante de cada uno, lavando posteriormente el pellet con un volumen de etanol al 70% de aproximadamente 450 μ l. Se centrifugó con la misma velocidad y tiempo, se descartó el sobrenadante y se efectuó un segundo lavado con etanol al 70%. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar los pellets a 60°C por 10'. Por último, se los resuspendió en 100 μ l de agua bidestilada estéril.

Para el tratamiento con ARNasa se agregaron 2 μ l de la enzima a cada muestra con una incubación de una hora en baño termostático a 37°C.

Para chequear la calidad del ADN se realizó un gel de agarosa al 0.8% y se lo cuantificó por fluorimetría con el equipo Versafluor de BioRad.

RESULTADOS

El gel de agarosa mostró una buena resolución de las bandas. Esto indicó una calidad aceptable en la extracción por dicho método, dado que no se observaron zonas de degradación del ADN ni extensiones terminales de las bandas que podrían indicar presencia de contaminantes o fragmentación del genoma.

La cuantificación reveló valores de entre 30 - 50 ng de ADN por muestra, lo cual permitió realizar diluciones a valores menores para obtener soluciones stock de entre 15 - 30 ng que serán utilizadas en distintos análisis genéticos como SSR (Single Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), etc.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir del gel de agarosa y de la cuantificación, demostraron que el método de extracción con CTAB es eficiente para la obtención de ADN para su posterior utilización en análisis por PCR.

