

“EXTRACCION DE DNA CON PAPAÑA”

ARIEL AMARU CALZADA, JAVIER FABRICIO ARENÉ HOCHKOFER, DAVID BALLÓN COSSÍO,
HUGO CALLISAYA MAMANI, ASESOR: DR. HERIBERTO CUEVAS
UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

RESUMEN

Palabras claves.- DNA, Papaina, Leucocitos

En el presente trabajo se realizó la extracción del DNA genómico, por el método clásico de extracción (fenol cloroformo), utilizando la enzima papaina (latex del papaya) en lugar de la proteínaasa K, con el objetivo de economizar los costos y presentar como modelo de práctica de extracción de DNA en la práctica de Bioquímica y Biología Molecular.

La muestra de leucocitos fue obtenida por la lisis eritrocítica de 5 ml de sangre venosa periférica. El pellet de leucocitos fue disuelto con 2 ml de TNE y 100 ml de SDS al 10%. Se agregó 50 ml de papaina (obtenida de la fruta natural papaya). La digestión se mantuvo por 12 horas a 37 grados centígrados, en baño maría. Posteriormente, al tubo se agregó 2 ml de fenol-cloroformo; se mezcló por 5 minutos hasta homogenizar, y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente el sobrenadante fue transferido a otro tubo de ensayo de 5 ml. A este fue agregado 2 ml de cloroformo-alcohol isomálico; se mezcló por 5 minutos hasta homogenizar y luego se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. A este último se agregó 3 ml de etanol absoluto frío (mantenido a -20°C), observándose el precipitado de DNA. Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se hizo secar en el medio ambiente. El precipitado de DNA fue disuelto en 50 ml de agua destilada. Se realizó con esta muestra la electroforesis en gel de agarosa, junto a otra muestra de DNA extraído con proteínaasa K y otro extraído sin proteínaasa K ni papaina. Se demostró la presencia de DNA con el método papaina.

INTRODUCCION

La Papaya es una fruta tropical de la familia de las Caricáceas, empleada desde hace muchos años por sus excelentes propiedades digestivas. Tradicionalmente, en los países de origen, es habitual ablandar la carne, envolviéndola en hojas de papayo durante al-

ABSTRACT

They ABRIDGE Words you nail.- DNA, Papaina, Leucocitos presently work was carried out the extraction of the DNA [genómico], for the classical method of extraction ([fenol cloroformo]), utilizing the [enzima papaina] ([latex of the papaya]) instead of the K [proteínasa], with the objective of economizing the costs and present like model of you/he/she/it practice of extraction of DNA in the practice of Bioquímica and Molecular Biology.

The pattern of [leucocitos] was gotten [eritrocítica] of 5 [ml] of veined outlying blood for the [lisis]. The [pelet] of [leucocitos] was dissolved with 2 [ml] of TNE and 100 [ml] of SDS at 10%. 50 [ml] of [papaina] (gotten of the fruit was added natural papaya). The [digestión] stayed for 12 hours to 37 grades [centígrados], in bathroom [maría]. Subsequently, to the tube 2 [ml] was added of 1 fenol-chlorine-form; he/she/it/you mixed for 5 minutes even [homogenizar], and [centrifugó] to 2000 [rpm] for 5 minutos. Subsequently the [sobrenadante] was transferred to another tube of rehearsal of 5 [ml]. To this 2 [ml] of chlorine-formo-alcohol was added [isomálico]; he/she/it/you mixed for 5 minutes even [homogenizar] and then [centrifugó] to 2000 [rpm] for 5 minutos. To latest east 3 [ml] of [etanol] was added absolute cold (maintained to- 20°C), observing the precipitate of DNA. [centrifugó] to 2000 [rpm] for 5 minutes. The [sobrenadante] was eliminated and was made to dry in the environment. The precipitate of DNA was dissolved in 50 [ml] of distilled water. He/she/it/you was carried out the [electroforesis] in gel of [agarosa] with this pattern, next to another pattern of DNA extracted with k [proteínasa] and another extracted without k [proteínasa] neither [papaina]. The presence of DNA with the method was demonstrated [papaina].

gunas horas. Su jugo fresco se usa también como antihelmíntico. Dentro de su composición química debemos destacar su riqueza en vitaminas A, C y del grupo B y en Papaina que es una enzima proteolítica. 4

La papaina bruta, contiene un poco de agua, glúcidos, ácidos orgánicos y una mezcla de enzimas, donde destacan las denominadas proteasas que actúan

rompiendo los enlaces peptídicos en cualquier lugar de la cadena peptídica en la que se hallen situados (endopeptidasas). Dentro de estas enzimas proteolíticas, la que se encuentra en mayor cantidad es la papaina, de la que se distinguen la papaina I o papaina propiamente dicha y la papaina II o quimopapaina, que es más estable en medio ácido, pero su actividad proteolítica es cuantitativamente menos marcada que la de la anterior, pues sólo coagula la leche. Además también contiene pequeñas cantidades de otros enzimas: papaya peptidasa A, lipasa y lisozima (enzima que rompe las paredes de las células bacterianas). 3

La papaina pura, es una proteína constituida por 212 aa, que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre. La papaina es una enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres. Preferentemente actúa sobre los aa básicos, leucina, glicina, así como sobre arginina, lisina y fenil-alanina (son en enlaces próximos al grupo carboxilo de la fenilalanina). Es activada por la cisteína (aa), el tiosulfato (compuesto de azufre) y el glutatión. Es inhibida o inactivada por iones metálicos (zinc, cadmio, hierro, plomo), oxidantes (H₂O₂, radicales libres, etc.) y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico). 4

OBJETIVOS

Objetivo general

- Utilizar la papaina, obtenida manualmente de la papaya, en lugar de la proteínasa K, en la extracción del DNA genómico con el método clásico (fenol cloroformo), con fines académicos.

Objetivos específicos

- Obtener la enzima papaina del latex de la papaya.
- Obtener leucocitos de la sangre venosa periférica mediante la lisis de glóbulos rojos.
- Digerir los leucocitos con papaina.
- Extraer el DNA con fenol-cloroformo.
- Observar el DNA extraído en gel de agarosa.

HIPÓTESIS

La papaina puede reemplazar a la proteínasa K por ser una enzima proteolítica, en la metodología clásica de la extracción de DNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- 5 tubos de ensayo
- Jeringa de 5 ml
- Cualquier material cortante
- Vacutainer
- Micropipeta de 100 ul
- Centrifugadora
- Pipetas de Pausteur
- Gel de agarosa al 1%

Sujetos

Las personas donantes de sangre fueron los mismos componentes del grupo de investigación, sin ningún criterio de selectividad.

Procedimiento

Obtención de la papaina

- Tener a disposición una papaya de 250 g, mas o menos.
- Realizar una buena limpieza con agua.
- Realizar líneas profundas sobre la cáscara de la papaya con un clavo.
- Depositar sobre un vaso hasta observar latex de papaya en cantidad de 10 ml .
- Conservar el contenido recolectado en tubo de ensayo de 5 ml.

Extracción del DNA 1

- Extraer 5 ml de sangre venosa periférica en tubo Vacutainer con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).
- Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante (plasma) y agregar solución de lisis de eritrocitos. Agitar suavemente por 5 minutos y luego centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos.
- Repetir el paso anterior.
- Retirar el sobrenadante y quedar con el pellet de leucocitos.
- Agregar 2 ml de TNE y 100 ml SDS (Dodesil Sulfato Sodico) y agitar suavemente hasta homogenizar.
- Agregar 100 ml de papaina (obtenida de la papaya).
- Llevar a baño maria por 12 horas.
- Agregar 2 ml de fenol agitar suavemente por 5 minutos.

- Centrifuga a 2000 rpm, por 5 minutos y obtener el sobrenadante en otro tubo de ensayo de 5 ml.
- Agregar 2 ml de cloroformo-alcohol isoamilico y agitar suavemente por 5 minutos.
- Centrifuga a 2000 rpm, por 5 minutos y obtener el sobrenadante en otro tubo de ensayo de 5 ml.
- Agregar 3 ml de alcohol etílico absoluto frío. Agitar suavemente para observar la precipitación del DNA.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos. Desechar el sobrenadante.
- Agregar 100 ml de agua destilada agitar suavemente, para la disolución del DNA:
- Realizar electroforesis con 30 ml de la solución en gel de agarosa al 1 %.
- Observar el DNA con luz ultravioleta.

EL patrón a seguir para la cantidad de las sustancias que vamos a utilizar para las diferentes pruebas es la siguiente:

TNE: Cl Na, H₂O, EDTA

SDS: Dodesil Sulfato Sodico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

RESULTADOS

Se realizó la extracción del DNA de leucocitos de sangre venosa periférica, separado por lisis de eritrocitos con 3 tipos de digestiones e idéntica separación con fenol cloroformo. El tubo 1 se digirió con sol fisiológica, el tubo 2 con proteinasa k y el tubo 3 con papaina (zumo de papaya).

Los DNA extraídos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, para observar la cantidad y la calidad del DNA. A los 15 minutos de electroforesis (foto 1) se observó el siguiente detalle: la muestra del tubo 1 no presentó presencia de DNA, la muestra del tubo 2 presentó DNA en dos bandas una superior de muy alto peso molecular y otra de alto peso molecular aproximadamente de 23 Kb. La muestra del tubo 3 presentó dos bandas de DNA una superior de muy alto peso molecular, al mismo nivel de la muestra 2 y otra banda de bajo peso molecular por debajo de la banda de alto peso molecular de la 2 muestra. A una hora de electroforesis (foto 2) se observa cola de DNA en la muestra del tubo 3.

CONCLUSIONES

En la extracción de DNA es posible reemplazar, la proteinasa k por la papaina. De esta manera se hace muy accesible la extracción del DNA con objetivos académicos; por ejemplo en la práctica de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la carrera de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Profesor Heriberto Cuevas por el asesoramiento del trabajo, y la oportunidad de trabajar en el laboratorio de la Cátedra de Bioquímica, para la realización de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

1. Giorgio Corte. "Biología Molecolare Tecnica di Base", Soluzione Stock, 2da Edición, Ediciones easy-life, año 1994, Pág.87-95
2. José Luque. "Biología Molecular e Ingeniería Genética", Preparación de muestras, extracción y análisis de ácidos nucleicos, Ediciones Harcourt, año 2001, Pág. 164 -139
3. http://www.bioplanet.net/magazine/bio_novdic_1999/bio_1999_novdic_industria.htm
4. <http://www.fitoterapia.net/vademecum/plantas/703.html>