



## Purificación de RNA, DNA y Proteínas con la Solución de Chomczynski con Fenol

La **Solución de Chomczynski con Fenol** se utiliza fundamentalmente para purificar el RNA total, aunque también se pueden purificar el DNA y las proteínas a partir de células y tejidos de origen animal y vegetal, o de bacterias y levaduras. El RNA se purifica en tres pasos: un paso de lisis celular y homogenización con la **Solución de Chomczynski con Fenol**; adición de **Cloroformo**, el cual produce la formación de dos fases, una acuosa, que contiene el RNA, y una orgánica, que contiene el DNA y las proteínas; y un último paso de precipitación con **Alcohol iso-Propílico**. El DNA y las proteínas se pueden purificar, después de formadas las dos fases, por precipitación secuencial, primero del DNA con **Alcohol Etilico**, a partir de la interfase; y luego de las proteínas con **Alcohol iso-Propílico**, a partir de la fase orgánica. La simplicidad y rapidez del método permiten el procesamiento simultáneo de gran número de muestras, y la pureza del RNA obtenido permite su uso posterior en cualquier aplicación en Biología Molecular.

### *Homogenización:*

**a) Tejidos:** Homogenice las muestras de tejido con 1 ml de la **Solución de Chomczynski con Fenol** por 50-100 mg de tejido, usando un homogenizador de vidrio con teflón, o uno eléctrico (como el Polytron u otro equivalente). El volumen de la muestra no debe exceder el 10% del volumen de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada para la homogenización.

**b) Células crecidas como monocapa:** Lise las células directamente en la placa de cultivo, añadiendo 1 ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** en una placa de 3.5 cm de diámetro y pasando varias veces por una pipeta el lisado celular. La cantidad de **Solución de Chomczynski con Fenol** que debe añadirse debe estimarse con respecto al área de la placa de cultivo (1 ml/10 cm<sup>2</sup>) y no con respecto al número de células del cultivo.

**c) Células crecidas en suspensión:** Sedimente las células por centrifugación, añada 1 ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** por cada 5-10 x 10<sup>6</sup> células de origen animal, vegetal o de levadura, o por cada 10<sup>9</sup> células bacterianas, y lise las células por pipeteo repetido. El rompimiento de algunas células de bacterias o levaduras puede requerir el uso de un homogenizador.

### *Separación de Fases:*

1- Incube 5 min a temperatura ambiente las muestras homogenizadas.

2- Añada 0.2 ml de **Cloroformo** por cada ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada en la homogenización.

3- Tape bien los tubos, agite vigorosamente por 15 seg, e incube 2-3 min a temperatura ambiente.

4- Centrifugue las muestras a 12000xg por 15 min a 2-8°C. Con la centrifugación se forman dos fases: una inferior, de fenol-cloroformo y color amarillo-naranja; y otra superior, acuosa e incolora, que contiene el RNA.



### ***Precipitación del RNA:***

- 1- Transfiera la fase acuosa superior a un tubo nuevo, y guarde la fase orgánica si desea purificar posteriormente el DNA y/o las proteínas.
- 2- Precipite el RNA añadiendo 0.5 ml de **Alcohol iso-Propílico** por ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada previamente. Mezcle e incube por 10 min a temperatura ambiente.
- 3- Centrifugue las muestras a 12000xg por 15 min a 2-8°C. El precipitado de RNA, usualmente visible antes de la precipitación, forma como un gel en el fondo y a lo largo de la pared del tubo.
- 4- Después de centrifugar, elimine el sobrenadante y lave el precipitado de RNA con **Alcohol Etilico al 75%**, usando al menos 1 ml por cada ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada previamente.
- 5- Mezcle con vórtex y centrifugue a 7500xg por 5 min a 2-8°C.
- 6- Elimine el sobrenadante y seque brevemente el precipitado, al aire o con vacío, por 5-10 min. No lo haga por centrifugación con vacío.
- 7- Disuelva el RNA en 100-200 µl de **Agua sin Nucleasas** o en una solución de **SDS al 0.5%**, por pipeteo repetido e incubando 10 min a 55-60°C. El RNA también puede disolverse en **Formamida desionizada** y guardarse de -60 a -70°C.

### **Notas sobre la purificación de RNA:**

- Para purificar RNA a partir de muestras pequeñas (< 10<sup>6</sup> células o < 10 mg de tejido), haga la lisis y homogenización en 0.8 ml de **Solución de Chomczynski con Fenol**. Continúe con el procedimiento hasta la separación de las fases, y antes de precipitar con **Alcohol iso-Propílico**, añada 5-10 µg de **Glicógeno**, como agente coprecipitante, a la fase acuosa. Si el RNA se va a utilizar en experimentos de RT-PCR no es necesario añadir el agente coprecipitante.
- Puede ser que se requiera un paso adicional de purificación en las muestras con un alto contenido de proteínas, grasas, polisacáridos o material extracelular, como ocurre en los tejidos muscular y adiposo, o en las partes fibrosas de las plantas. Después de la homogenización, elimine el material insoluble por centrifugación a 12000xg durante 10 min a 2-8°C. En muestras de tejido adiposo, el exceso de grasa forma una capa en la superficie del homogenizado que debe ser eliminada. En cada caso, transfiera la solución homogenizada a un tubo nuevo y continúe con el paso siguiente de separación de las fases.
- Después de la homogenización y antes de la adición del **Cloroformo**, las muestras se pueden conservar a -70°C por al menos un mes. El precipitado de RNA obtenido en el paso 4 de la precipitación, puede conservarse en **Alcohol Etilico al 75%** por al menos una semana a 2-8°C, o un año de -5 a -20°C.
- En este procedimiento se pueden usar centrifugas de mesa, que pueden alcanzar un máximo de 2600xg, si los tiempos de centrifugación se aumentan a 30-60 minutos.



### ***Precipitación del DNA:***

1- Elimine la fase acuosa remanente y precipite el DNA de la interfase y la fase orgánica añadiendo 0.3 ml de **Alcohol Etilico** absoluto por cada ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada previamente. Mezcle por inversión e incube las muestras por 2-3 min a temperatura ambiente.

2- Sedimente el DNA por centrifugación a 2000xg durante 5 min a 2-8°C. Extraiga el sobrenadante de fenol-etanol y guárdelo si desea purificar las proteínas

3- Lave dos veces el precipitado con una solución de **Sodio Citrato 0.1 M** y **Alcohol Etilico 10% (v/v)**, usando 1 ml de solución por cada ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada previamente. En cada lavado incube el DNA precipitado durante 30 min en esta solución, mezclando periódicamente, antes de centrifugar a 2000xg por 5 min a 2-8°C.

4- Lave nuevamente el DNA precipitado con **Alcohol Etilico al 75%**, usando 1.5-2.0 ml por cada ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada previamente. Incube el DNA en **Alcohol Etilico al 75%** durante 10-20 min a temperatura ambiente, mezclando periódicamente, y centrifugue a 2000xg por 5 min a 2-8°C.

5- Elimine el sobrenadante y seque brevemente el precipitado, con vacío, por 5-10 min.

6- Disuelva el DNA en **Sodio Hidróxido 8 mM** por pipeteo suave y repetido, añadiendo el volumen necesario para alcanzar una concentración de 200-300 ng/μl (aproximadamente 0.6-0.8 ml por cada 50-70 mg de tejido o  $1 \times 10^7$  células). Después de disolver el DNA, muchas preparaciones (especialmente las hechas a partir de tejidos) todavía contienen material insoluble como fragmentos de membrana, etc. Elimine el material insoluble centrifugando a 12000xg por 10 min y transfiriendo el sobrenadante, que contiene el DNA, a un tubo nuevo.

### **Notas sobre la purificación de DNA:**

- La fase orgánica y la interfase pueden guardarse a 2-8°C por un día.

- La eliminación cuidadosa de la fase acuosa en el primer paso es crítica para la calidad del DNA purificado.

- En el paso 3, las muestras que produzcan un precipitado grande por contener más de 200 μg de DNA o material contaminante, requieren un lavado adicional con la solución de **Sodio Citrato 0.1 M** y **Alcohol Etilico 10% (v/v)**.

- El DNA puede conservarse en **Alcohol Etilico al 75%** durante meses a 2-8°C.

- El DNA disuelto en **Sodio Hidróxido 8 mM** puede guardarse a 2-8°C por un día. Si se quiere conservar por tiempo indefinido, ajuste el pH a 7-8 y añada **EDTA** a una concentración final de 1 mM.

- La purificación conjunta del DNA genómico con el RNA total permite la normalización más exacta de los resultados del análisis del RNA por Northern Blot, usando como referencia la cantidad de DNA genómico en vez del RNA total o el peso del tejido, que son más variables.

- Si se desea cuantificar con exactitud la cantidad de DNA, tome una alícuota, dilúyala en agua y mida la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. Calcule la cantidad de DNA asumiendo que 1 unidad de  $A_{260}$  equivale a 50 μg de dsDNA/ml.

- El DNA obtenido se puede usar para PCR o digestión con enzimas de restricción. Para este último uso se recomienda dializar la preparación en **Buffer TE pH 7-8** y usar 3-5 unidades/μg de DNA en las condiciones recomendadas por el proveedor de la enzima, digiriendo durante 3-24 horas. Normalmente se alcanza a digerir un 80-90% del DNA.

- Dependiendo de la fuente de origen, el DNA obtenido pudiera requerir otros pasos de purificación (como extracción con **Fenol:Cloroformo básico**) para poderlo usar en otras aplicaciones.

- Si se desea únicamente purificar el DNA genómico, es recomendable usar la **Solución de Chomczynski** (BM-1750) en vez de la **Solución de Chomczynski con Fenol** (BM-1755).



### ***Precipitación de proteínas:***

1- Del sobrenadante de fenol-etanol obtenido en el segundo paso del procedimiento anterior, precipite las proteínas añadiendo 1.5 ml de **Alcohol iso-Propílico** por cada ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada previamente. Mezcle e incube las muestras 10 min a temperatura ambiente.

2- Sedimente las proteínas centrifugando a 12000xg por 10 min a 2-8°C y elimine el sobrenadante.

3- Lave tres veces el precipitado de proteínas con una solución de **Guanidinio Cloruro 0.3 M** y **Alcohol Etilico 95% (p/v)**, usando 2 ml de esta solución por cada ml de **Solución de Chomczynski con Fenol** usada previamente. En cada lavado incube el precipitado en la solución de lavado por 20 min a temperatura ambiente, y centrifugue a 7500xg por 5 min a 2-8°C.

4- Después del último lavado, haga uno adicional con 2 ml de **Alcohol Etilico**. Después de añadir el **Alcohol Etilico**, agite con vórtex, e incube y centrifugue en iguales condiciones que en el paso anterior.

5- Elimine el sobrenadante y seque brevemente el precipitado, con vacío, por 5-10 min.

6- Disuelva el precipitado de proteínas en una solución de **SDS 1% (p/v)** por pipeteo repetido. Para completar la disolución del precipitado puede que se requiera incubar la muestra a 50°C. Sedimente cualquier material insoluble remanente centrifugando a 10000xg por 10 min a 2-8°C y transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo. La solución de proteínas debe conservarse de -5 a -20°C.

### **Notas sobre la purificación de proteínas:**

- El precipitado de proteínas puede conservarse en una solución de **Guanidinio Cloruro 0.3 M** y **Alcohol Etilico 95% (p/v)** por al menos un mes a 2-8°C, o un año de -5 a -20°C.

- La preparación de proteínas obtenida es apropiada para electroforesis de proteínas y Western Blot.

- Un procedimiento alternativo al expuesto es dializar el sobrenadante de fenol-etanol en un volumen suficiente de una solución de **SDS 0.1% (p/v)** a 2-8°C, con tres cambios de solución, seguido de una centrifugación a 10000xg por 10 min. El sobrenadante se puede usar en una electroforesis de proteínas o en un Western Blot.

- Las proteínas se pueden cuantificar por el método de **Bradford** siempre y cuando la concentración de **SDS** no exceda el 0.1%, de modo que no interfiera. También se puede usar cualquier otro método en el que no interfieran el detergente y el fenol.

### **Referencias:**

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.*, **162**:156.

- Chomczynski, P. (1993) *Biotechniques*, **15**:532.