
MODIFICACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA EXTRACCIÓN DE ADN DE GLÓBULOS BLANCOS HUMANOS

José Henry Osorio¹
Yocner Edilson Quenán²

RESUMEN

Introducción: Las técnicas modificadas de extracción de ADN a partir de glóbulos blancos, permiten obtener un buen rendimiento en cantidad y pureza de ADN extraído. **Objetivo:** Modificar la técnica de extracción de ADN para economizar tiempo y reactivos utilizados. **Materiales y Métodos:** Fueron modificados los pasos de la técnica de extracción de Gustafson (1987). La cantidad de ADN producida fue calculada por espectrofotometría. La pureza del ADN extraído fue evaluada mediante amplificación con PCR y comprobación en geles de agarosa. **Resultados:** Las modificaciones que proponemos al método de Gustafson (1987) representan un ahorro económico del 70% y en tiempo de 6 horas aproximadamente. **Conclusión:** El método que se propone en el presente trabajo es más económico en tiempo y dinero para la extracción de ADN de glóbulos blancos. Además, el rendimiento en cuanto a la cantidad de ADN producida es superior.

Palabras clave: ADN, métodos de extracción, ácidos nucleicos.

MODIFICATION OF A DNA EXTRACTION TECHNIQUE FROM WHITE HUMAN BLOOD CELLS

ABSTRACT

Introduction: The modified techniques for DNA extraction from white blood cells, allow obtaining a good efficiency in the extracted DNA quantity and purity.. **Objective:** To modify the DNA extraction technique in order to save time and necessary reactivos. **Materials and Methods:** Gustafson's /1987) extraction technique steps were modified. The quantity of DNA produced was calculated using spectrophotometry. The DNA purity was assessed through PCR amplification and confirmed using agarose gels. **Results:** The changes proposed to Gustafson's DNA extraction method, represent 70% savings in money, and a 6 hours savings in time approximately. **Conclusion:** The method proposed in the present work is more economic in time and money for white blood cells DNA extraction. Also the efficiency as far as quantity of DNA produced is higher.

Key words: DNA, extraction methods, nucleic acids.

¹ Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas. Correo electrónico: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

² Semillero de Investigación en Metabolismo (SIM), Universidad de Caldas.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos (animales y plantas) tienen una única composición hereditaria (huella genética) que permite la diferenciación genotípica y fenotípica de humanos, animales y plantas (1). La huella genética se puede visualizar utilizando herramientas como la biología molecular que ha servido para obtener ADN (ácido desoxirribonucleico), este es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos (2). Al inicio, la extracción de ADN a partir de sangre u otras muestras biológicas demandaba más tiempo, más recursos económicos, la calidad y cantidad de ADN no eran las apropiadas, además por la mala utilización de las muestras (sangre, saliva, uñas, tallo, hojas, etc.) fácilmente existía la probabilidad de contaminación del ADN (3, 4). Hoy en día el proceso para extraer ADN tiene un gran impacto sobre la sensibilidad y reproductibilidad de la prueba diagnóstico molecular (5), su análisis tiene implicaciones en diferentes disciplinas tales como la medicina forense, diagnóstico genotípico en biomedicina, determinación de paternidad o de otras relaciones familiares, identificación de especies animales, etc. Por eso, es necesario y a la vez fundamental hacer propuestas para que se estandaricen protocolos, técnicas y procedimientos para la extracción de ADN, de esa manera se puede garantizar calidad, eficiencia y economía. El ADN necesario para estudios moleculares se mide en microgramos (1). Esos estudios se basan en que la mayor parte de la información genética de cada célula está acumulada en el ADN del núcleo, bajo la forma de un código genético (existe también una pequeña porción de información genética fuera del núcleo, en las mitocondrias y cloroplastos) (6). Para el análisis del genoma se requiere del conocimiento y aplicación de las diversas técnicas usadas en la biología molecular, que dependen en gran parte de la habilidad para extraer el ADN, por ende se utilizan varios métodos de extracción (7), dependiendo del tipo de tejido o muestra a analizar y de lo que se quiere investigar. Las técnicas de extracción

de ácidos nucleicos son relativamente sencillas, y tan solo es necesario evitar toda destrucción enzimática o mecánica de los mismos, esto se debe a que los ácidos nucleicos que son estables en la célula intacta, al ser sometidos a procesos de digestión por nucleasas endógenas se vuelven muy vulnerables después que la célula es lisada. En el presente trabajo, presentamos algunas modificaciones realizadas al método de extracción de ADN que buscan abreviar el tiempo utilizado en la extracción, economizar reactivos utilizados y mejorar la concentración y pureza del ADN obtenido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de sangre de 10 voluntarios aparentemente sanos, quienes firmaron consentimiento informado, fueron tomadas en tubos que contenían EDTA y fueron congeladas a -35°C , hasta su procesamiento. Posteriormente, fueron analizados uno a uno los pasos empleados por Gustafson (1987) para el proceso de la extracción del ADN y una serie de modificaciones fueron implementadas con miras a mejorar el rendimiento en la extracción. Se determinó la concentración de ADN en $\text{ng}/\mu\text{l}$ mediante espectrofotometría. Con el objetivo de evaluar la calidad (pureza) del ADN extraído para el análisis preliminar de las muestras de sangre se usaron los primers del exón 5 del gen de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD): Directo 5-GTGCCCTTAGGTTGTGTG - Reverso 5-AAGGCCCTAGAAACAGAAAT. La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 de MJ Research. La mezcla de reacción contenía: buffer para PCR 1X, MgCl_2 2,75 mM, dNTPs 0,25 mM, Taq polimerasa 1U, primer 7 μM , ADN 30 ng y agua hasta completar un volumen final de 25 μl . Los productos de PCR se obtuvieron a partir de 200 ng de DNA después de 3 minutos de desnaturalización a 94°C y 35 ciclos consistentes en 40 segundos de desnaturalización a 94°C , 30 segundos de hibridación del cebador a 55°C y 2 minutos de extensión a 72°C . Los resultados fueron analizados por electroforesis

en gel de agarosa al 1,5% (p/v), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz ultravioleta. Esta investigación es clasificada como una investigación sin riesgo para las participantes, de acuerdo a la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud colombiano, en tanto no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada, de las variables biológicas, fisiológicas, sicologías o sociales de los individuos que participan en el estudio diferentes a las propias de una entrevista médica (Ministerio de Salud, 1993).

RESULTADOS

La cantidad promedio de ADN obtenido con el método de Gustafson es de 29 $\mu\text{g/ml}$ (8), mientras que luego de la modificación al mismo, se obtuvo un rendimiento promedio de 389 $\mu\text{g/ml}$. Ambos métodos ofrecen buenos resultados con relación a calidad del ADN obtenido para la amplificación mediante métodos de PCR.

DISCUSIÓN

Proceso muestra

Con el método de Gustafson la sangre se coloca en tubos de recolección en presencia de un anticoagulante ACD solución B (0,48 g% de ácido cítrico, 1,32 g% de citrato de sodio, 1,47 g% de glucosa; 1 ml de solución por cada 6 ml de sangre), en tanto que con el método salino se utiliza 7,2 mg de K₂ EDTA como anticoagulante. La sangre fresca o congelada se diluye con un volumen de PBS [(Fosfato buffer salino) 1 mM KH₂PO₄, 154 mM NaCl, 5,6 mM Na₂HPO₄ (Aldrich), pH 7,4] se mezcla invirtiendo el tubo suavemente, con la modificación las muestras se traspasan a tubos NUC de 15 ml y se lo llena hasta 14 ml con suero fisiológico o SSN al 0,9% (esta es una solución isotónica que tiene la función de lavar la sangre). Se agita manualmente y con suavidad hasta ver la solución homogénea, la sangre fresca se coloca

a centrifugar a 1300 g (gravidades) durante 15 minutos, con la modificación se centrifuga la muestra a 2500 rpm durante 10 minutos, con el método de Gustafson se aspira el plasma y con mucho cuidado se extrae la capa leucocitaria usando una pipeta Pasteur y se la transfiere a un tubo de polipropileno estéril, previo a esto se debe comprobar de que no tenga contaminación o restos celulares (eritrocitos) de lo contrario se adiciona el PBS y se coloca a centrifugar a 3400 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se vierte cuidadosamente el sobrenadante que contiene eritrocitos lisados, con la modificación al método se utiliza una solución de lisis de eritrocitos (T.L.E.), se agita manualmente y con suavidad hasta ver la solución homogénea y se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos. Al terminar ese proceso se debe observar una capa celular que por lo general es de color blanco de aproximadamente 2 cm, con la pipeta se desecha el sobrenadante, teniendo cuidado de no tocar la capa celular.

Digestión de proteínas

Según el protocolo de Gustafson, después de verificar una completa eliminación de eritrocitos, las células se resuspenden en 0,6 veces del volumen original de sangre con TE [10 Mm Tris-Cl (BRL), pH 8,0, 50 Mm EDTA (BMB)]. Se añade una pronasa a una concentración final de 500 $\mu\text{g/ml}$, se mezcla invirtiendo varias veces, se añade SDS al 10% a una concentración final de 0,5%, se invierten los tubos varias veces hasta que se observe la muestra viscosa, se deja incubando en un baño de agua a 37°C durante 2 horas. Con la modificación al tubo NUC que contiene la capa celular se añaden 3 ml con una solución de lisis de leucocitos, más 200 μl del detergente aniónico SDS (dodecil sulfato de sodio al 10%), más 50 μl de una solución de proteinasa K (viene en una presentación en polvo de 100 mg). Esta muestra se agita en vórtex durante 5 segundos hasta observar un aspecto homogéneo, luego se deja a incubación en baño de maría a 60°C durante la noche; puede estar más de 12 horas sin problema.

Tabla 1. Costos en pesos utilizando el método de Gustafson (1987)

Producto	Cantidad	Valor total
Tubo vacutainer con anticoagulante ACD solución B (0,48 g% de ácido cítrico/1,32 g% citrato de sodio/1,47 g% de glucosa)	1	563
PBS [(Fosfato buffer salino) 1mM KH ₂ PO ₄ , 154 mM NaCl, 5,6 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4]		500
Pipeta Pasteur	1	213
Tubo de polipropileno estéril	3	5220
TE (10mM Tris-Cl, pH 8,0, 50 mM EDTA)		1000
Proteinasa k 500 µg/ml		5000
SDS al 10%		13688
Fenol		4338
Cloroformo		400
Cloruro de sodio al 0,1 M		700
Etanol frío 95% (-20°C)		300
Total		\$36.922

Tabla 2. Costos en pesos utilizando el método de Gustafson (1987) modificado

Producto	Cantidad	Valor total
Tubos de recolección K2 EDTA (K2E) 7,2 mg	1	529
Tubos NUC de 15 ml	3	4698
NaCl 0,9%		252
T.L.E. [solución de lisis de eritrocitos: 5 ml de Tris (hidroximetil aminometano) 2M, pH 7,5; 2,5 ml MgCl ₂ 1M; 492,5 ml de H ₂ O destilada]		1162
T.L.L. (solución de lisis de leucocitos: 40 ml de NaCl 5M; 4 ml de EDTA 0,25M, pH 8,0; 2,5 ml de Tris 2M, pH 7,5; 453,5 de H ₂ O destilada)		1216
200 µl del detergente aniónico SDS (dodecil sulfato de sodio al 10%)		1000
50 µl de una solución de proteinasa K (viene en una presentación en polvo de 100 mg)		1000
1 ml de NaCl saturado (5,5 M)		150
4,7 ml de cloroformo		350
4 ml etanol		220
Pipetas de vidrio	1	500
Tubo de microcentrífuga		52
TE (1 ml de Tris 2M, pH 7,5; 8 µl de EDTA 0,25M)		400
Pipeta Pasteur	1	213
Total		\$11.742

Extracción medusa de ADN

Con el protocolo de Gustafson se adiciona fenol a la muestra y se agita suave y manualmente 150 ciclos por minuto durante 3 minutos. Se coloca a centrifugar a 3400 g durante 10 minutos a una temperatura de 23°C, al finalizar se extrae la fase acuosa (superior) y se traspasa a otro tubo de polipropileno. Se repite la extracción con fenol. Después se añade un volumen igual de cloroformo a la fase acuosa, se agita durante 3 minutos y se coloca a centrifugar a 3400 g durante 5 minutos, al finalizar se remueve la fase acuosa (superior) y se traspasa a otro tubo de polipropileno. Se determina el volumen de la muestra y se ajusta la concentración de cloruro de sodio al 0,1 M. Se agregan 2 volúmenes de etanol frío 95% (-20°C) y se mezcla invirtiendo la muestra, se coloca a incubar durante 15 minutos a -70°C o 20°C hasta observar un precipitado (medusa de ADN). A 4°C se coloca a centrifugar el ADN a 3400 g durante 10 minutos, se decanta el sobrenadante y con cuidado se drena el pellet y se lava con etanol al 70% y se liofiliza. Se resuspende el precipitado con un volumen de la sangre inicial 10 mM Tris/1 mM de EDTA hasta que no haya restos visibles de pellets. Para asegurar que el ADN se haya disuelto por completo, gire la muestra durante 30 minutos. Con el método salino para la extracción de la medusa de ADN se añade 1 ml de NaCl saturado (5,5 M), se agita en vórtex durante 5 segundos y se centrifuga a 3500 rpm durante 20 minutos. Después se traspasa el sobrenadante a un tubo NUC nuevo, se añaden 4,7 ml de cloroformo,

se agita manualmente durante 15 segundos y se centrifuga a 3500 rpm durante 20 minutos, después de este proceso se deben observar tres fases, puesto que el cloroformo o fenol y la solución salina amortiguadora no se mezclan, el ADN permanece en la parte superior, las proteínas se presentan como un precipitado en la interfase. Entonces se traspasa cuidadosamente la fase superior con la precaución de no tocar la fase intermedia e inferior a otro tubo NUC nuevo; a este se le añaden 4 ml de etanol el cual precipita el ADN, de tal manera que al agitar manualmente se observa la medusa de ADN. Posteriormente se pesca la medusa de ADN con pipetas de vidrio y se traspasa a un tubo de microcentrífuga, se deja secar. Para disolver el ADN se agregan 500 µl de una solución amortiguadora de TE (1 ml de Tris 2M, pH 7,5; 8 µl de EDTA 0,25M, pH 8,0; llevar hasta 100 ml de H₂O destilada y autoclavar), se agita en vórtex hasta observar la medusa disuelta. Los ADN son conservados a -80°C.

CONCLUSIÓN

Se concluye que las modificaciones que proponemos al método de Gustafson (1987) representan un ahorro económico del 70% y en tiempo de 6 horas aproximadamente. Al realizar la cotización para cada método se tuvo en cuenta únicamente una sola muestra de sangre. Además, el rendimiento en cuanto a la cantidad de ADN producida es superior.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baiget M, Gallano P, Tizzano E. Técnicas de biología molecular. Barcelona: Talleres Gráficos Vigor S.A.; 1995. p. 180.
2. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487-91.
3. Einsele H, Herbart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6):1353-60.
4. Löffler J, Herbart H, Schumacher U, et al. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 1997; 35(12):3311-2.
5. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002; 40(1):87-109.
6. Junqueira L., Carneiro J. *Biología celular y molecular*. 6.ed. Santiago, Chile: McGraw-Hill Interamericana de Chile Ltda.; 1998. p. 324.
7. Velasco R. Molecular markers and the DNA extraction. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 2005; 3(1):14-18.
8. Gustafson S, Proper J, Bowie W, et al. Parameters affecting the yield of DNA from human blood. *Analytical biochemistry* 1987; 165(2):294-299.