



Extracción de DNA con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (PCI) a partir de Concentrados Leucocitarios procedentes del Banco de Sangre.

Created: May 8, 2008; **Last modified:** Jan 15, 2009, **Version:** 1.0

Este protocolo describe el procedimiento de extracción de DNA a partir de sangre entera anticoagulada o a partir de concentrados leucocitarios derivados de bancos de sangre.

Procedimiento

1. Coloque 2 mL de concentrado leucocitario en un tubo cónico de 15 mL.
2. Añada 10 mL del Buffer de Lisis Eritrocitaria (RCLB) y mezcle.
3. Centrifugue a 380 G durante 10 minutos.
4. Descarte el sobrenadante y resuspenda el sedimento celular en 3 mL de Buffer de Lisis Leucocitaria (WCLB)
5. Añada 50 μ L de SDS al 10% y mezcle, agregue 50 μ L de la solución de proteinasa K a 10 mg/mL y mezcle.
6. Incube a 42°C bajo agitación constante durante al menos 8 horas.
7. Añada 3 mL de la Solución de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (PCI 24:1) y coloque en el termomixer a 550 rpm y 25 °C durante 10 minutos.
8. Centrifugue a 500 G durante 5 minutos.
9. Transfiera la fase acuosa a un nuevo tubo cónico de 15 mL.
10. Repita la extracción con PCI (pasos #7 a #9).
11. Transfiera la fase acuosa a un nuevo tubo cónico de 15 mL.
12. Añada 60 μ L de NaCl 5 M (o la cantidad necesaria para obtener una concentración final de NaCl 0.1 M).
13. Añadir 0.6 volúmenes de isopropanol al 100% a -20 °C).
14. Mezcle por inversión hasta formar un precipitado que flote en la superficie del tubo cónico.
15. Centrifugue a 500 G durante 5 minutos.





16. Descarte el sobrenadante y agregue 3 mL de etanol al 70% y -20°C , mezcle por inversión.
17. Centrifugue a 500 G durante 5 minutos.
18. Descarte el sobrenadante y agregue 3 mL de etanol al 70% y -20°C , mezcle por inversión.
19. Centrifugue a 500 G durante 5 minutos.
20. Retire el DNA precipitado con una pipeta Pasteur o capilar de microhematócrito doblado en forma de gancho.
21. Invierta el capilar y coloquelo en un microtubo de 1.5 mL previamente etiquetado con el identificador único y permítasele secar (15 a 30 minutos) dentro del Gabinete de Bioseguridad de Clase II del Laboratorio #1.
22. Resuspenda el DNA seco en 500 μL de Tris-HCl 10mM, pH 8.0 para preparar la *solución nativa de DNA genómico*.
23. Incube el DNA en el termomixer durante 30 minutos a 70°C y 300 RPM.
24. Evalúe espectrofotométricamente la calidad del DNA genómico extraído en el Nanodrop ND-1000.
25. Prepare 200 μL de una *dilución de trabajo de DNA genómico* a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para cada una de las soluciones nativa de DNA extraídas. Esta dilución de trabajo deberá prepararse en microtubos de 0.2 mL sin desprenderlos de la tira de 8 tubos. La anotación correspondiente a su localización deberá agregarse a la hoja de procesamiento de la muestra.
26. Una vez se hayan reunido las muestras procesadas en una semana se deberá evaluar y documentar la integridad del DNA extraído por electroforesis de DNA genómico.
27. Una vez se hayan reunido al menos 48 muestras se deberá evaluar y documentar la utilidad para PCR de las muestras empleando el protocolo de amplificación de KIR2DL4 y las diluciones de trabajo a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$.
28. Almacene las soluciones nativas de DNA en congelación a -80°C y las diluciones de trabajo DNA en congelación a -20°C .

Notas

1. Las diluciones de trabajo deben prepararse en microtubos de PCR de 0.2 mL en tiras. Debido a las limitaciones de espacio cada tira de 8 microtubos deberá llevar al frente una letra (A, B, C, D, E, F,





- G, H, I, J, K y L). Para cada tira los tubos individuales llevarán números del 1 al 8. Al completar las 12 tiras de 8 tubos la caja de almacenamiento (cajas de puntas p10 desocupadas) será etiquetada por los cuatro lados y en su parte superior con un número consecutivo de 4 dígitos comenzando por el 0001. Cada dilución de trabajo se identificará en su hoja de procesamiento por el número de caja (cuatro dígitos), la letra correspondiente a la tira de tubos y el número de tubo específico para la muestra (p.Ej., 0001C5).
2. Para evaluar la integridad del DNA genómico por electroforesis se cargan 5 μ l de una mezcla de 3 μ l de la Dilución de trabajo de DNA genómico a 100 ng/ μ l con 3 μ l de buffer de carga (naranja O) en un gel de agarosa al 1% y se corre durante 45 minutos a 150 VDC. El DNA de buena calidad deberá permanecer por encima del marcador de 4 KB, el DNA fragmentado aparecerá como una mancha que se extiende desde el pozo hasta el frente de migración.
 3. Para evaluar la utilidad del DNA extraído y descartar la presencia de inhibidores de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se deberá someter a cada muestra (diluciones de trabajo) al protocolo de amplificación de KIR2DL4. Los oligonucleótidos para KIR2DL4 generan un fragmento de 1.8 Kbp en presencia de DNA de buena calidad y en ausencia de inhibidores. Refiérase al protocolo de evaluación correspondiente.
 4. Es preferible procesar concentrados leucocitarios frescos o refrigerados. Las muestras congeladas interfieren con el éxito del procedimiento y limitan la cantidad y la calidad del DNA extraído.
 5. Deberá evitarse el empleo de mezcladores vortex durante este procedimiento debido a que fragmentan el DNA extraído.
 6. Para preparar el Buffer de Lisis Leucocitaria (WCLB 10mM de Tris-HCl, 10mM EDTA y 50 mM NaCl) coloque 0.5 mL de Tris-HCl 1M, pH 7.6 en una probeta de 50 mL y añada 1 mL de EDTA, pH 8.0. Agregue 0.1461 g de NaCl y afore a 50 mL con agua destilada. Almacene en un tubo cónico de 50 mL.
 7. Para preparar el Buffer de Lisis Eritrocitaria (RCLB 10mM de Tris-HCl, 5mM MgCl₂ y 10 mM NaCl) coloque 0.5 mL de Tris-HCl 1M, pH 7.6 en una probeta de 50 mL y añada 0.0508 g de MgCl₂ • 6H₂O. Agregue 0.0292 g de NaCl y afore a 50 mL con agua destilada. Almacene en un tubo cónico de 50 mL.
 8. Para preparar la Solución de Proteínas K (10 mg/mL) agregue 10 mg de Proteína K en 1 mL de agua grado I libre de RNAsas. Prepare alícuotas de 60 μ L y almacene a -20° C.

Referencias

1. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal. Biochem.* 162: 156–159.





2. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (2006). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on". *Nature Prot.* 1: 581–585.

Revision history

- 1.0 Original document.

