



## **Extracción de DNA con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (PCI) a partir de Células Mononucleares o Líneas Celulares B Linfoblásticas Criopreservadas.**

**Created:** May 08, 2008; **Last modified:** Jun 23, 2014, **Version:** 1.0

Este protocolo describe el procedimiento de extracción de DNA a partir de células mononucleares (CMN) o líneas celulares B linfoblásticas (LCBL) criopreservadas. Los crioviales utilizados en nuestro laboratorio contienen alrededor de  $5 \times 10^6$  c/ml. Este procedimiento continua siendo considerado el estándar de oro contra el cual se comparan los demás métodos de extracción de DNA.

### **Procedimiento**

1. Descongele las CMN según el protocolo de Descongelación y Recuperación de CMN criopreservadas y resuspenda el pellet celular en 1 mL de RPMI-1640.
2. Incube en thermomixer a 37°C y 350 rpm por al menos 3 horas.
3. Centrifugue a 15,000 g durante 5 minutos.
4. Descarte el sobrenadante y resuspenda el sedimento celular en 2 mL de Buffer de Lisis Leucocitaria (WCLB) frío.
5. Añada 20  $\mu$ L de SDS al 10% y 20  $\mu$ L de la solución de proteinasa K a 10 mg/mL y vortexee gentilmente.
6. Incube a 42°C bajo agitación constante (350 rpm) durante al menos 12 horas.
7. Añada 2 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 15,000 g durante 5 minutos.
9. Transfiera la fase acuosa a un nuevo microtubo de 2 mL.
10. Repita la extracción con PCI (pasos #7 a #9).
11. Transfiera la fase acuosa a un nuevo microtubo de 2 mL previamente etiquetado con identificador único.
12. Añada 20  $\mu$ L de NaCl 5 M (o la cantidad necesaria para obtener una concentración final de NaCl 0.1 M).
13. Añadir 1 mL de isopropanol al 100% a -20 °C, mezcle por inversión e incube en congelador -20°C por 30 minutos.





14. Centrifugue a 15,000 g durante 5 minutos.
15. Descarte el sobrenadante y agregue 1 mL de etanol al 70% y  $-20^{\circ}\text{C}$ , mezcle por inversión e incube en congelador  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.
16. Centrifugue a 15,000 g durante 5 minutos.
17. Descarte el sobrenadante y permita secar a los microtubos (15 a 30 minutos) dentro del Gabinete de Bioseguridad de Clase II del Laboratorio #1.
18. Resuspenda el DNA seco en 200  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 10mM, pH 8.0 para preparar la *solución nativa de DNA genómico*.
19. Incube el DNA en el termomixer durante 30 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  y 350 RPM.
20. Evalúe espectrofotométricamente la calidad del DNA genómico extraído en el Nanodrop ND-1000.
21. Prepare 200  $\mu\text{L}$  de una *dilución de trabajo de DNA genómico* a 100 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.
22. 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.
23. 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 ng/ $\mu\text{L}$ .
24. Almacene las soluciones nativas de DNA en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y las diluciones de trabajo DNA en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 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 identificara en su hoja de procesamiento por el número de caja (cuatro digitos), 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  $\mu\text{l}$  de una mezcla de 3  $\mu\text{l}$  de la Dilución de trabajo de DNA genómico a 100 ng/ $\mu\text{l}$  con 3  $\mu\text{l}$  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. 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.
6. Para preparar la Solución de Proteinasa K (10 mg/mL) agregue 10 mg de Proteinasa K en 1 mL de agua grado I libre de RNAsas. Prepare alícuotas de 60  $\mu\text{L}$  y almacene a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 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.
3. N.M. Lopera-Barrero, J.A. Povh, R.P. Ribeiro, P.C. Gomes, C.B. Jacometo, and T. Da Silva Lopes. Comparison of DNA extraction protocols: modified salt (NaCl) extraction. 2008. *Cien. Inv. Agr.* 35(1):77-86.

## Revision history

- 1.0 Original document.

