



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 5×10^6 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 µL de SDS al 10% y 20 µL 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 µL 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°C , mezcle por inversión e incube en congelador -20°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 μL 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°C y 350 RPM.
20. Evalúe espectrofotométricamente la calidad del DNA genómico extraído en el Nanodrop ND-1000.
21. Prepare 200 μL de una *dilución de trabajo de DNA genómico* a 100 ng/ μL 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/ μL .
24. 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 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 μl de una mezcla de 3 μl de la Dilución de trabajo de DNA genómico a 100 ng/ μl con 3 μl 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 μL 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.
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.

