

ARTICULO ORIGINAL

DNA-UMSAgen, EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR: MÉTODO RÁPIDO Y ECONÓMICO

Ricardo Amaru*, Hortencia Miguez*, Rosario Peñaloza*, Gina Torres*, Julio Silvestre*, Heriberto Cuevas*.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El estudio del ácido desoxirribonucleico (DNA) es imprescindible para la medicina moderna; por ello, se ha diseñado diferentes técnicas para su extracción, cuyos costos son altos y de tiempo prolongado. En este trabajo se describe un método modificado de extracción de DNA (DNA-UMSAgen) basado en la técnica de Miller.

MÉTODOS

Las células mononucleares fueron obtenidas de sangre venosa periférica de un sujeto voluntario, para realizar 40 extracciones de DNA; 20 con el método modificado DNA-UMSAgen y otros 20 con el método clásico. Posteriormente se evaluó la concentración, calidad y utilidad de estos DNA extraídos.

RESULTADOS

La pureza del DNA extraído por el método DNA-UMSAgen es de 1,88 similar al de la técnica clásica 1,91, las concentraciones obtenidas son 20,4 ug/106 cel y 56ug/106 cel respectivamente. La evaluación por electroforesis en agarosa y la amplificación del exon 12 del gen JAK2 por PCR fue satisfactoria.

CONCLUSIÓN

El método DNA-UMSAgen es una alternativa de extracción de DNA genómico, rápido y económico, adecuado para países en vías de desarrollo.

PALABRAS CLAVES

Rev. Cuadernos 2006; 51 (2): 11-15 /DNA, extracción, espectrofotometría, PCR, electroforesis en agarosa

ABSTRACT

INTRODUCTION

DNA is the genetic material of the cell. Actually for its study, laboratory techniques are available that require its extraction free of impurities. This paper describes the DNA-UMSAgen method as an alternative for DNA extraction which is based on the Miller technique.

METHODS

The mononuclear cells were obtained of venous peripheral blood of a voluntary subject, for to realize 40 DNA's extractions; 20 with the modified method DNA-UMSAgen and other 20 with the classic method. Later there was evaluated the concentration, quality and utility of these extracted DNA.

RESULTS

The DNA purity extracted by the DNA-UMSAgen method is 1,88 similar to the classic technique 1,91, the concentration obtained were 20,4 ug/106 cells and 56ug/106 cells respectively. The evaluation by agarose gel electrophoresis and the amplification of the exon 12 of the JAK2 gen by PCR was successful.

CONCLUSION

The DNA-UMSAgen extraction method is a very acceptable fast, easy and inexpensive alternative method for underdeveloped countries for DNA extraction.

KEY WORDS

DNA, extraction, spectrophotometry, PCR, agarose gel electrophoresis.

* Unidad de Biología Celular, Departamento de Ciencias Funcionales, Facultad de Medicina, UMSA, La Paz, Bolivia

INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es el material genético de las células eucarióticas cuya manipulación y análisis es imprescindible para el estudio de las bases moleculares en las enfermedades; actualmente diversos métodos de biología molecular permiten extraer DNA desde virus hasta células humanas^{2,3}.

Para la extracción del DNA se requiere aislar proteínas, polisacáridos y lípidos; además, el material utilizado en el proceso de extracción debe estar libre de DNasa asociado a manipulación cuidadosa para evitar su degradación^{3,4}.

A diferencia del método clásico, el método modificado DNA-UMSAgen no utiliza proteínasa K ni fenol cloroformo para la extracción del DNA. El presente trabajo describe un método modificado de extracción de DNA genómico a partir de la técnica de Miller (5) que es rápido y económico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las células mononucleares fueron separadas por gradiente de concentración en Histopaque 1077 (Sigma - Aldrich, Reino Unido) a partir de 10 ml sangre venosa periférica de un sujeto voluntario, posteriormente las células mononucleares fueron alicuotadas a una concentración de 1×10^6 en tubos Eppendorf y conservadas a -20°C .

REACTIVOS

- NLB (nuclear lysis buffer)
10 mM Tris-HCl pH 8,2
(Tris-hidroximetilaminometano)
0,4 M Na Cl (Cloruro de sodio)
2 mM Na₂ EDTA pH 8,0 (Acido Etilendiamino tetraacético sal disódica)
Disolver 23,37 g de Na Cl en 900ml de agua destilada, agregar 10ml de Tris-HCl 1M pH 8,2 y 10 ml de Na₂ EDTA pH 8 enrasar a 1 litro con agua destilada.
- SDS 10% p/v (dodecil sulfato de sodio)
Disolver 100 g de SDS en 1 litro de agua destilada a 20°C en baño maría.
Mezclar 300 ml de NLB con 20ml de SDS al 10%, antes de usar.
- Na Cl 6M (cloruro de sodio saturado)

Disolver 350,64 g de NaCl en 800 ml de agua destilada después de agitar por 30 minutos enrasar a 1 litro con agua destilada.

- Acetato de sodio 3M
CH₃COONa (acetato de sodio)
Disolver 24,6 g de acetato de Na en 100 ml de agua destilada.
- Solución de lisis para glóbulos rojos 10X
NH₄Cl (cloruro de amonio)
KHCO₃ (bicarbonato ácido de potasio)
Na₂ EDTA pH 8,00 (Acido Etilendiamino tetraacético sal disódica)
Disolver 82,9 g de NH₄Cl, 10 g KHCO₃ y 370 mg de Na₂ EDTA en 800 ml de agua destilada y enrasar a 1litro. Pasar por filtro de 0,45um y diluir 1:10 antes de usar.

EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO CON EL MÉTODO DNA-UMSAgen.

- Resuspender el sedimento de células (1×10^6) en 900 µl de NLB-SDS.
- Agregar 300 µl de cloruro de sodio 6 M, luego agitar en vortex por un minuto.
- Agregar 600 µl de cloroformo.
- Mezclar por inversión durante 5 minutos hasta observar una solución homogénea.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos.
- Recuperar la fase superior en otro tubo Eppendorf.
- Agregar 600 µl de cloroformo - alcohol isoamílico 24:1.
- Mezclar por inversión durante 5 minutos hasta observar una solución homogénea.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos.
- Recuperar la fase superior en otro tubo Eppendorf.
- Agregar 30 µl de acetato de sodio 3M.
- Agregar 1ml de alcohol absoluto frío (conservado a -20°C).
- Mezclar hasta la visualización del DNA precipitado.
- Sacar el DNA precipitado con una aguja hipodérmica G21 y depositarlo en otro tubo Eppendorf.
- Resuspender en 1ml de etanol al 70% (conservado a -20°C)
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- Desechar el sobrenadante y dejar secar el DNA a medio ambiente.
- Resuspender en 100 µl de agua tridestilada.
- Dejar una noche a temperatura ambiente para

su disolución completa.

- Conservar a 4°C.

EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO CON EL MÉTODO CLÁSICO.

- Resuspender el sedimento de células (1 x 10⁶) en 480 µl de TNE 1x.
- Agregar 100 µl de SDS 10% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml).
- Incubar en baño maría a 37 °C por 12 horas.
- Centrifugar a 4.000 rpm por 5 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf.
- Agregar 600 µl de fenol-cloroformo (1:1). Mezclar por 5 minutos hasta su homogenización.
- Centrifugar a 4.000 rpm por 5 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf.
- Agregar 600 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por 5 minutos hasta su homogenización.
- Centrifugar a 4.000 rpm por 5 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf.
- Agregar 50 µl de acetato de sodio 3 M.
- Agregar 1 ml de etanol absoluto frío (-20°C). Agitar gentilmente y esperar su precipitación.
- Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos.
- Desechar el sobrenadante. Agregar 1ml de etanol al 70% conservado a -20°C.
- Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos.
- Desechar el sobrenadante.
- Secar el DNA a medio ambiente.
- Agregar 100 µl de agua tridestilada y dejar por una noche a temperatura ambiente para su disolución completa.
- Conservar a 4°C.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL DNA.

La concentración de DNA se determinó por espectrofotometría UV a 260 nm en una solución diluida de DNA 1/50. El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia } 260\text{nm} \times 50 \times \text{dilución}}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{l DNA}$$

ANÁLISIS CUALITATIVO DEL DNA

La calidad del DNA se evaluó mediante la

separación electroforética en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio, migrado a 80 V por 60 minutos. En la migración se utilizó el marcador de pares de bases: Marker II. Se consideró DNA de alta calidad, a la presencia de bandas iguales o superiores a 23.000 bp.

ANÁLISIS DE PUREZA DE DNA

La pureza del DNA se calculó mediante la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm; considerando DNA de alta pureza a valores igual a 1.8 ± 0.1.

AMPLIFICACIÓN DE DNA

El DNA genómico se amplificó mediante la técnica del PCR (reacción en cadena de polimerasa) utilizando primers del exon 12 del gen Jak2 de acuerdo a protocolo establecido⁶. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Se realizaron 40 extracciones de DNA genómico a partir de 1 x 10⁶ células mononucleares, 20 por el método DNA-UMSAgen y 20 por el método clásico.

Las concentraciones de DNA fueron 20.4 µg y 56 µg por 10⁶ células mononucleares por el método DNA-UMSAgen y Clásico respectivamente (cuadro 1 y 2). La pureza del DNA extraído fue 1.88 para el método DNA-UMSAgen y 1.91 por el método clásico (cuadro 1 y 2).

CUADRO 1

Extracción de DNA por el método DNA-UMSAgen

Muestra	DNA µg/10 ⁶ cel	Pureza Abs 260/280
1	19,5	1,85
2	15,5	2
3	38,5	1,9
4	20	1,9
5	17	1,88
6	16,5	1,8
7	13	1,88
8	10	1,86
9	9,8	1,85
10	49,5	2

11	56	1,8
12	6,7	1,8
13	13	1,88
14	10	1,86
15	9	1,85
16	21	1,88
17	19	1,85
18	20	1,9
19	17	1,88
20	27	1,96
x	20,40	1,88

CUADRO 2.

Extracción de DNA por el método clásico

Muestra	DNA µg/10 ⁶ cel	Pureza Abs 260/280
1	27	1,95
2	27	2
3	26	2
4	21	1,88
5	93,5	1,9
6	93,5	2
7	16,2	1,85
8	80	1,9
9	95,5	1,9
10	39,5	1,8
11	73,2	2
12	52,5	1,9
13	17	1,86
14	93	2
15	16	1,85
16	80	1,9
17	95	1,9
18	39	1,8
19	52	1,9
20	83	1,9
x̄	56	1.91

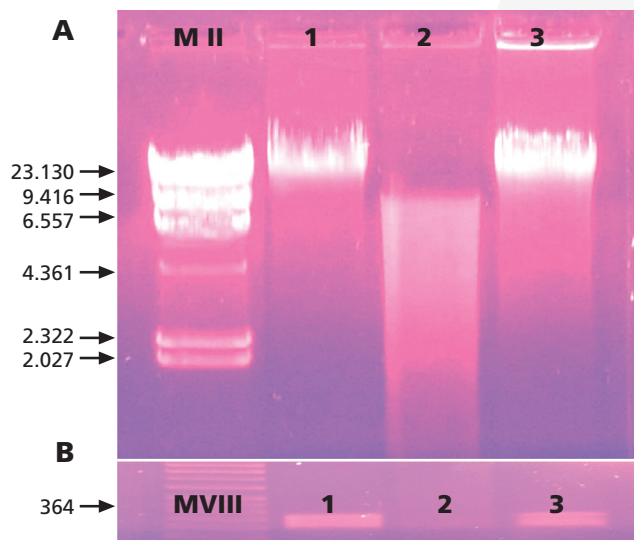
Los resultados de la concentración del DNA extraído por ambos métodos son estadísticamente diferentes y en referencia a la pureza y calidad ambos métodos son adecuados (cuadro 3, figura 1).

Cuadro 3. Comparación de la concentración y pureza de DNA extraído por los métodos DNA-UMSAgen y clásico.

	DNA µg/10 ⁶ cel		Pureza Abs 280/260	
	DNA-UMSAgen	Clásico	DNA-UMSAgen	Clásico
x̄	20,4	55,99	1,88	1,91
SD	13,2	31,2	0,06	0,06
p	0,0000		0,12	

FIGURA 1.

Migración de DNA extraído con método DNA-UMSAgen y Clásico.



- A. Migración electroforética de 3 µg de DNA en agarosa 0.8% con bromuro de etidio. MII, Marker II; columna 1, método DNA-UMSAgen; columna 2, DNA degradado; columna 3, método clásico.
- B. Migración electroforética de Amplificación del exon 12 del gen JAK2 por PCR en agarosa 2% con bromuro de etidio. MVIII Marker VIII; columna 1, método DNA-UMSAgen; columna 2, DNA degradado; columna 3, método clásico.

El estudio de costos para el método DNA-UMSAgen es de un dólar y para el método clásico es de dos dólares.

El tiempo de extracción utilizado por el método DNA-UMSAgen es de 2 horas, mientras para el método clásico es de 24 horas.

DISCUSIÓN

El DNA genómico es utilizado en laboratorios de Biología Molecular para determinar la etiología y las características genéticas de diferentes patologías.

Desde la primera extracción del DNA hasta la fecha se han diseñado diversos métodos de extracción; en los últimos años se hicieron populares los Kits

patentados que simplifican la extracción, pero disminuyen la calidad del DNA con costos cada vez mayores.

En el método DNA-UMSAgen no se utiliza la proteinasa K, (enzima de alto costo); en su lugar se utiliza el NLB (del anglosajón: "nuclear lysis buffer") que reduce el tiempo del procedimiento de 12 horas (método clásico) a 5 minutos. Además no se utiliza el fenol, una sustancia catalogada como muy tóxica para el manipulador y para el medio ambiente. Al recuperar el DNA precipitado con una aguja hipodérmica, nos permite obtener DNA de alta calidad (de mayor número de pares de bases) dejando DNA de menor número de pares de bases en la solución; probablemente por ello la concentración del DNA sea inferior en relación con el método clásico.

El método DNA-UMSAgen simplifica los pasos, ahorra tiempo y dinero, obteniendo DNA de alta calidad tal como lo demuestran los estudios de espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. Los costos de extracción se reducen en aproximadamente 50% en relación con el método clásico y más de 200% en relación con otros métodos patentados.

La cantidad de extracción de DNA con DNA-UMSAgen es menor en relación con el método clásico, pero suficiente para realizar técnicas como Southern blot, PCR, etc. La pureza es ligeramente superior con DNA-UMSAgen aunque no estadísticamente significativo.

El método DNA-UMSAgen con las ventajas ya descritas, requiere ser validado para su utilización a nivel internacional.

REFERENCIAS.

1. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 1953;171:737.
2. Jones SW, Dobson ME, Francesconi SC, Schoske R, Crawford R. DNA Assays for Detection, Identification, and Individualization of Select Agent Microorganisms Croat Med J 2005; 46: 522.
3. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory Manual. Ed. 1982. Cold Spring Harbor. New York.
4. Luque J, Herraiz A. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Ed. 2001. Harcourt. Madrid.
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res 1988;16:1215.
6. Baxter EJ, Scott Im, Campbell PJ, et al. Adquired mutation of the tyrosine kinase JAK-2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005; 365:3313.