

## Comparación de dos métodos para aislar ADN genómico humano a partir de discos de papel filtro impregnados con sangre total

### Comparison of two methods to isolate human genomic DNA from filter paper disk impregnated with whole blood

Frida E. Sosa-Amay<sup>1</sup>, Hicler N. Rodríguez<sup>2</sup> y Juan C. Castro<sup>2</sup>

Recibido: noviembre 2016

Aceptado: diciembre 2016

#### RESUMEN

El aislamiento de ADN genómico humano ( $ADN_{gh}$ ) es requerido para una gran variedad de análisis genético-moleculares. Varios laboratorios con suficientes recursos aíslan el  $ADN_{gh}$  con kits comerciales, estos presentan ventajas, pero son caros y no siempre funcionan para diversos tipos de muestras biológicas. Por tanto, es necesario disponer de métodos alternativos con características similares, pero baratos y de "amplio espectro", es decir, que funcionen para diversos tipos de muestras biológicas. Por lo que, el objetivo de esta investigación fue comparar dos métodos para aislar  $ADN_{gh}$  a partir de discos de papel filtro impregnados con sangre total. Con un estilete se recolectaron muestras de sangre capilar de 10 individuos adultos y se procedió a impregnar la muestra en discos de papel filtro. Posteriormente, se aisló el  $ADN_{gh}$  con el QIAamp DNA Mini Kit y un método casero que usa el detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BHTMA) y solventes orgánicos. El  $ADN_{gh}$  obtenido con ambos métodos fue analizado por espectrofotometría y electroforesis para determinar su calidad y cantidad. También, la calidad se evaluó mediante amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Los resultados del análisis espectrofotométrico muestran que con el método casero se obtuvo  $ADN_{gh}$  de mayor calidad ( $A_{260}/A_{280} = 1,7 \pm 0,3$ ;  $A_{260}/A_{230} = 1,9 \pm 0,4$ ) que con el kit comercial ( $A_{260}/A_{280} = 1,5 \pm 0,5$ ;  $A_{260}/A_{230} = 1,6 \pm 0,2$ ). Asimismo, con el método casero se obtuvo 1,4 veces más  $ADN_{gh}$  que con el kit comercial. Finalmente, mediante los análisis electroforéticos y amplificación por la RCP se corroboró la alta calidad del  $ADN_{gh}$  obtenido con ambos métodos. En conclusión, con un método casero basado en el uso del BHTMA se logró aislar  $ADN_{gh}$  de alta calidad y cantidad apropiada para análisis moleculares que demostró ser superior en varios parámetros en comparación con un kit comercial.

**Palabras claves:** ácidos nucleicos, análisis genético-moleculares, BHTMA, purificación de ADN.

#### ABSTRACT

Isolation of human genomic DNA ( $hgDNA$ ) is required for a wide variety of genetic-molecular analysis. Various laboratories with sufficient resources isolate  $hgDNA$  with commercial kits, these have advantages, but are expensive and show limitations for different types of biological samples. Accordingly, it is necessary to have alternative methods with similar characteristics, but of low-cost and "broad spectrum", in other words, they can work for different types of biological samples. Therefore, the objective of this research was to compare two  $hgDNA$  isolation methods from filter paper disk impregnated with whole blood. With a stylet capillary blood samples were collected from 10 adult individuals and samples were impregnate into filter paper disk. Subsequently,  $hgDNA$  was isolated with the QIAamp DNA Mini Kit and a homemade method using the hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) detergent and organic solvents. The  $hgDNA$  obtained with both methods was analyzed by spectrophotometry and electrophoresis to determine its quality and

<sup>1</sup> Laboratorio de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Nina Rumi, San Juan Bautista, Loreto, Perú. frida.sosa@unapikitos.edu.pe

<sup>2</sup> Unidad Especializada de Biotecnología (UEB). Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna). UNAP. San Juan Bautista, Loreto, Perú.

quantity. Also, quality was evaluated by amplification with the polymerase chain reaction (PCR). Results of the spectrophotometric analysis display that highest quality  $_{hg}$  DNA was obtained with the homemade method ( $A_{260}/A_{280} = 1,7 \pm 0,3$ ,  $A_{260}/A_{230} = 1,9 \pm 0,4$ ) comparing with the commercial kit ( $A_{260}/A_{280} = 1,5 \pm 0,5$ ,  $A_{260}/A_{230} = 1,6 \pm 0,2$ ). Additionally, with the homemade method was obtained ~ 1,4 times more  $_{hg}$  DNA than the commercial kit. Finally, by electrophoretic analysis and PCR amplification was corroborated the high-quality  $_{hg}$  DNA obtained with both methods. In conclusion, with a homemade method CTAB-based was feasible to isolate high-quality and appropriate quantity  $_{hg}$  DNA for molecular analysis that have been proved to be superior in several parameters compared to a commercial kit.

**Key words:** nucleic acids, genetic-molecular analysis, CTAB, DNA purification.

## INTRODUCCIÓN

El análisis de la información genética en individuos es fundamental para esclarecer la maquinaria molecular y bioquímica que controla los procesos metabólicos, que a su vez determinan el estado de salud o enfermedad (Orellana y Guajardo, 2004) y la respuesta idiosincrática a los diferentes fármacos (Guzmán y Carmona-Fonseca, 2006; Martínez-Sellés *et al.*, 2005) y xenobióticos (Maciel *et al.*, 2009). Para acceder a la información genética, el aislamiento de ADN genómico humano ( $ADN_{gh}$ ) de alta calidad y cantidad apropiada es un paso fundamental.

Actualmente, disponemos de diversos kits comerciales para realizar esta primera etapa. Entre las ventajas que presentan es su simplicidad, rapidez, eficiencia, entre otros (Elphinstone *et al.*, 2003; Greco *et al.*, 2014; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008). Pero suelen presentar costos altos y suelen tener problemas para aislar ADN de diversos tipos de muestras biológicas. Además, un reciente estudio revela que la sensibilidad para amplificar un gen por la PCR varía significativamente entre las muestras de ADN genómico aislado con diferentes kits comerciales (Carbajal, 2016).

Consecuentemente, se requiere de otros métodos alternativos, más caseros, que se basen en el uso de reactivos que comúnmente se emplean en la mayoría de laboratorios y por ende de bajo costo (Castro *et al.*, 2012; Hernández Betancourt *et al.*, 2009). Por tanto,

el objetivo de esta investigación fue comparar dos métodos para aislar  $ADN_{gh}$  a partir de discos de papel filtro impregnados con sangre total.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Obtención de las muestras de sangre

Diez individuos mayores de 18 años fueron informados del objetivo del estudio y con su consentimiento se procedió a recolectar las muestras de sangre capilar de la yema del dedo medio con ayuda de un estilete estéril. La sangre obtenida fue impregnada (~40  $\mu$ L) en discos de papel filtro de 6 mm  $\varnothing$  (Whatman™ 903). Estas muestras fueron secadas y conservadas en bolsas ziploc 15 x 15 cm a temperatura ambiente (25 °C) por una semana en las instalaciones de la Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).

### Aislamiento del $ADN_{gh}$

Se aisló el  $ADN_{gh}$  de las 10 muestras empleando dos métodos, el primero se realizó siguiendo las instrucciones del QIAamp DNA mini Kit y el segundo fue un método casero (método BHTMA modificado) que emplea el detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BHTMA) y solventes orgánicos (Castro *et al.*, 2012). El segundo método se detalla a continuación: el papel filtro impregnado con sangre (0,25  $cm^2$ )

se puso en un microtubo y añadió 500  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción (Tris-HCl 300 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, BHTMA 2%, PVP-40 3%) y 5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (10 mg/mL). La muestra se homogenizó en un vortex (Scientific industries) y se incubó en baño María (Barnstead/Lab-Line Thermo scientific) a 70 °C por 30 min, se atemperó a 25 °C y agregó 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó en el vortex por 30 s y centrifugó en una microcentrífuga (Hettich Mikro 200) a 13 000 x g por 10 min a 4 °C. Se repitió una vez este paso de extracción con los solventes orgánicos. El sobrenadante obtenido (~400  $\mu\text{L}$ ) se transfirió a un microtubo, se adicionó 400  $\mu\text{L}$  de 2-propanol y 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M. Los componentes se homogenizaron por inversión suave de los microtubos (5 a 8 veces) e incubó a -20 °C por 20 min. Luego se centrifugó a 13 000 x g por 30 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el precipitado (ADN genómico) se lavó con 1 mL de etanol al 70% y centrifugó a 10 000 x g por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, se hizo evaporar el etanol a 40 °C por 5 min en un baño seco digital (Scientific USA). Finalmente, el ADN genómico fue resuspendido con 50  $\mu\text{L}$  de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 1 mM) y se almacenó a -20 °C.

### **Análisis de la calidad y cantidad del ADN<sub>gh</sub>**

Se hicieron mediante análisis espectrofotométrico y electroforético de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989). Para el análisis espectrofotométrico se realizaron las lecturas de absorbancia de las muestras de ADN<sub>gh</sub> a 230, 260 y 280 nm y determinó ratios de calidad ( $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ ) en un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La integridad del A ADN<sub>gh</sub> se verificó de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989), en geles de agarosa al 1 % en una cámara de electroforesis horizontal con tampón TBE 0,5x (Tris-HCl 110 mM pH 8,3; ácido bórico 90 mM; EDTA 2,5 mM). Las bandas de ADN<sub>gh</sub> en los geles de aga-

rosa con bromuro de etidio fueron observados en un transiluminador de luz UV y fotografiados con el sistema BioDocAnalyze (Biometra).

### **Amplificación por RCP**

Se empleó el Kit PlatinumTaq DNA Polymerase (Invitrogen). La reacción de RCP se realizó en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  y la concentración final de los componentes fueron: tampón de RCP 1X;  $\text{MgCl}_2$  3,0 Mm; dNTPs 2 mM de cada uno, cebadores (Cyp2D6f 5'-TGAGGAGGATGATCCCAA CGAG-3'; Cyp2D6r 5'-GGGTATCACCCAGGA GCCAG-3') 0,5  $\mu\text{M}$  de cada uno, 0,4 U de Platinum™ Taq DNA Polymerase, ADN genómico 20 ng y agua c.s.p. 20  $\mu\text{L}$ . Las reacciones se hicieron en un termociclador Mastercycler® ep realplex Real-time PCR System bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de tres etapas (desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 50 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1min), un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min y refrigeración a 4 °C. Los amplicones obtenidos fueron resueltos mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% y registrados fotográficamente como se describió previamente.

### **Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos fueron almacenados en una hoja de cálculo de Microsoft® Excel 2016. El archivo fue guardado con formato CSV (delimitado por comas) para su posterior procesamiento estadístico. Los análisis estadísticos (promedios y desviación estándar) se realizaron con el programa R v 3.0.0 (R Core Team, 2013).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con los dos métodos de extracción de ADN<sub>gh</sub> a partir de discos de papel filtro impregnados con sangre total se pudo obtener el material

genético, pero con ligeras diferencias en cuanto a la calidad y cantidad obtenida (tabla 1). En general, se observa que con el método casero (método BHTMA modificado) se obtuvo superiores ratios de calidad y mayor cantidad de ADN<sub>gh</sub>. Esto nos indica que el ADN<sub>gh</sub> obtenido con el método casero está menos contaminado con proteínas, compuestos hémicos y otros contaminantes (Greco *et al.*, 2014; Sambrook *et al.*, 1989) que comúnmente están presentes en las muestras de sangre total (Johns y Paulus-Thomas, 1989; McNally *et al.*, 1989).

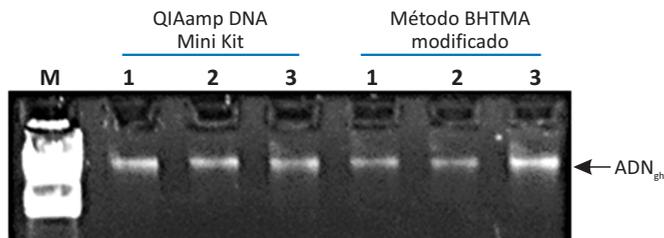
Mediante el análisis electroforético hemos podido corroborar que con ambos métodos de

aislamiento se pudo obtener el ADN<sub>gh</sub> intacto (figura 1); el cual se evidencia por la presencia de una sola banda intacta en el gel de agarosa, sin señales de degradación.

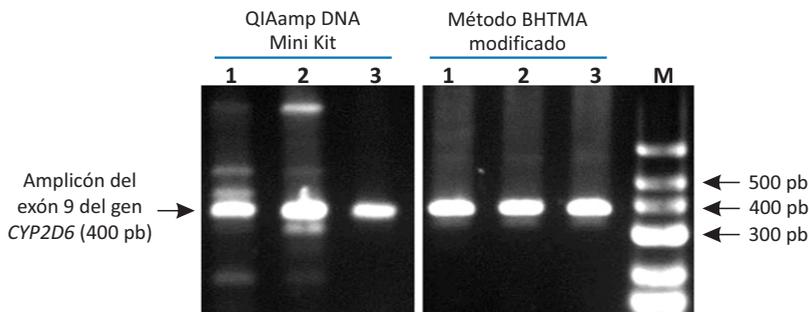
Finalmente, por una prueba adicional que nos ha permitido determinar la pureza apropiada del ADN<sub>gh</sub> obtenido con ambos métodos es que se amplificó exitosamente un segmento (400 pb) del exón 9 del gen *CYP2D6* (figura 2). El estudio de este gen es fundamental porque codifica la enzima citocromo P450, una enzima clave en el metabolismo de fármacos y otros compuestos xenobióticos a nivel del hígado (Montellano, 2005).

**Tabla 1.** Ratios de calidad y cantidad de ADN<sub>gh</sub> obtenidos con los dos métodos a partir de discos de papel filtro impregnados con sangre total.

Método	N	Ratios de calidad		Cantidad de ADN <sub>gh</sub> (μg/mL sangre)
		A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	
QIAamp DNA Mini Kit	10	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,2	5,9 ± 2,1
Método BHTMA modificado	10	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,4	8,1 ± 3,1



**Figura 1.** Análisis electroforético del ADN<sub>gh</sub> obtenido con dos métodos a partir de discos de papel filtro impregnados con sangre total de tres individuos. M: marcador de peso molecular (ADN del fago λ/*Hind* III).



**Figura 2.** Análisis electroforético de los amplicones del exón 9 del gen *CYP2D6* obtenido mediante RCP. M: marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler Low Range).

Es importante conducir estudios del gen *CYP2D6* junto con estudios bioquímicos apropiados para estimar con más exactitud el riesgo al fracaso del tratamiento farmacológico en pobladores amazónicos. Dado que ciertas variantes polimórficas del gen *CYP2D6* determinan la disminución de la actividad catalítica y en menor porcentaje puede presentarse la duplicación de genes que determinan el aumento en la actividad metabólica. Estos factores determinan las variaciones de las concentraciones plasmáticas de los fármacos en los individuos de las diferentes poblaciones. Esto permite clasificar a los individuos de una población con actividad del *CYP2D6* lenta o disminuida, intermedios, rápidos y ultrarrápidos con actividad incrementada (Brockmöller *et al.*, 2002; Marez *et al.*, 1997; Paar *et al.*, 1997; Sim e Ingelman-Sundberg, 2010).

## CONCLUSIONES

Con un método casero basado en el uso del BHTMA se logró aislar ADN<sub>gh</sub> de alta calidad y cantidad apropiada para análisis moleculares que demostró ser superior en varios parámetros en comparación con un kit comercial.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) por haber financiado la presente investigación (RR 0054-2014-UNAP). Asimismo, un especial agradecimiento a la Universidad Científica del Perú (UCP) en la persona de Lic. Educ. Juan Carlos Criollo Saldaña, por haber sido el nexo con los estudiantes étnicos de Beca 18 y en la persona de la Dra. Marianela Cobos Ruiz por haber brindado las facilidades de acceso al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la UCP para realizar los análisis espectrofotométricos en el UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). A la Lic. Educ. Martha Urquiza Cardoso y la Lic. Educ. Mary Urquiza Cardoso por

haber facilitado el acercamiento con las autoridades de la Comunidad de Túpac Amaru para la participación de la comunidad en la toma de muestra.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brockmöller J, Kirchheiner J, Schmider J, Walter S, Sachse C, Müller-Oerlinghausen B, Roots I. 2002. The impact of the *CYP2D6* polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72, 438-452.
- Carbajal A. 2016. Extracción y purificación de ADN. <http://www.labome.es/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>
- Castro JC, Cobos M, Saavedra RR, Correa SI. 2012. Aislamiento de ADN genómico de *Myrciaria dubia* (HBK) "camu camu" apropiado para análisis moleculares. *Cienc. Amaz.* 2, 7-16.
- Elphinstone MS, Hinten GN, Anderson MJ, Nock CJ. 2003. An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies. *Mol. Ecol. Notes* 3, 317-320.
- Greco M, Sáez CA, Brown MT, Bitonti MB. 2014. A Simple and Effective Method for High Quality Co-Extraction of Genomic DNA and Total RNA from Low Biomass *Ectocarpus siliculosus*, the Model Brown Alga. *PLoS ONE.* 9(7):e101190.
- Guzmán V, Carmona-Fonseca J. 2006. El citocromo P-450 y la respuesta terapéutica a los antimaláricos. *Rev. Panam. Salud Pública* 19, 9-22.
- Hernández Betancourt O, Debasa Padilla A, Quesada Leiva L. 2009. Purificación de ADN genómico humano para el diagnóstico del

- lupus eritematoso sistémico. *Rev. Arch. Méd. Camagüey.* 13(1):1-8.
- Johns MB, Paulus-Thomas JE. 1989. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol. *Anal. Biochem.* 180, 276-278.
- Maciel ME, Oliveira FK, Propst GB, Da Graça Bicalho M, Cavalli IJ, Ribeiro EM de SF. 2009. Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in South Brazilian Euro and Afro-descendants. *Genet. Mol. Biol.* 32, 723-728.
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo JG, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F. 1997. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 7, 193-202.
- Martínez-Sellés M, Castillo I, Montenegro P, Martín ML, Almendral J, Sanjurjo M. 2005. Estudio farmacogenético de la respuesta a flecainida y propafenona en pacientes con fibrilación auricular. *Rev. Esp. Cardiol.* 58, 745-748.
- McNally L, Shaler RC, Baird M, Balazs I, Forest PD, Kobilinsky L. 1989. Evaluation of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Isolated from Human Bloodstains Exposed to Ultraviolet Light, Heat, Humidity, and Soil Contamination. *J. Forensic Sci.* 34, 1059-1069.
- Montellano PRO de. 2005. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry.* Springer Science & Business Media.
- Orellana BM, Guajardo TV. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev. Médica Chile* 132, 85-94.
- Paar WD, Poche S, Gerloff J, Dengler HJ. 1997. Polymorphic CYP2D6 mediates O-demethylation of the opioid analgesic tramadol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 53, 235-239.
- Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata P. 2008. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 109-114.
- R Core Team. 2013. *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory press.
- Sim SC, Ingelman-Sundberg M. 2010. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum. Genomics* 4, 278.