



Red Biobancos

Instituto de Salud Carlos III

Red Nacional
de Biobancos

Spanish National
Biobank Network

PNT Suero

Grupo de Trabajo en Banco de Cerebros

| REVISIÓN | REALIZADO | FECHA | APROBADO | FECHA | ENTRADA EN VIGOR |
|-----------------|------------------------------|------------|-----------|------------|------------------|
| 00 | Grupo de Derivados Hemáticos | 26/05/2011 | Dirección | 26/06/2015 | 19/07/2011 |
| Modificaciones: | | | | | |

Madrid 2011

Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos

La presente publicación está financiada por Subprograma de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), dentro la Acción Estratégica en Salud 2009, RD09/0076/00113

Alberto Orfao
*Coordinador del
Grupo de Trabajo*

Manuel M Morent.
*Coordinador de la Red
Nacional de Biobancos - ISCIII*

Red Nacional de Biobancos - ISCIII
www.redbiobancos.es

AUTORES

Este documento ha sido elaborado con la participación de las siguientes personas e instituciones:

Coordinador:

Alberto Orfao de Matos -Banco Nacional de ADN

Adjunto coordinador:

Rosa Pinto Labajo –Banco Nacional de ADN

Colaboraciones:

Juan Pascual Sánchez.-Hospital Marqués de Valdecilla

Eugeni Aragall –Fundación Instituto de Investigación Germans Trías i Pujol

Eduarne Pedrosa Berrio -Fundación Instituto de Investigación Germans Trías i Pujol

Antía Solloso Banobre –Complejo Hospitalario de la Coruña

Manuel Posada de la Paz –Instituto de Enfermedades Raras-/SCii

Elisabet Ars Criach –Fundación Puigvert

Irene Vieitez González –Complejo Hospitalario Universitario de Vigo

Jacobo Martínez Santamaría –Centro Superior de Investigación en Salud Pública

Elena Bellmunt –Hospital Universitario y Politécnico La Fe

Pablo Isidro Marrón –Hospital Universitario Central de Asturias

Raquel Coya Guerrero –Biobanco Vasco/H. Cruces

Rocío Aguilar Quesada –Banco ADN Humano de Andalucía

Rosario Martínez Marín –Hospital Virgen de la Arrixaca

Teresa Escámez –Hospital Virgen de la Arrixaca

OBJETO

El objetivo de esta guía de trabajo consiste en la elaboración de un documento donde se recogen diferentes protocolos de trabajo (PNTs) utilizados en varios biobancos integrados en la Red Nacional del ISCIII para la obtención de ácidos nucleicos a partir de diferentes tipos de muestra.

Los protocolos han sido clasificados según su principio de actuación y en cada uno de ellos se especifica para qué tipo de muestras estarían indicados, así como el rendimiento aproximado y la calidad de las muestras que deberían obtenerse

Dado que cada biobanco ha desarrollado sus protocolos en función del tipo de muestras que procesa y del equipamiento disponible, no se pretende unificar todos los procedimientos en un solo protocolo, sino más bien dar a conocer sus características, su posible idoneidad para los distintos tipos de muestra y la posible aplicación a los diferentes biobancos en función del equipamiento del que dispongan y su grado de exigencia en cuanto a la calidad y cantidad (máximo rendimiento, pureza y funcionalidad) de los productos a obtener.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1.1. LISIS CEULAR. | 11 |
| 1.2. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS. | 11 |
| 1.2.1. Precipitación mediante sales y alcoholes: | 11 |
| 1.2.2. Extracción con solventes orgánicos: | 11 |
| 1.2.3. Adsorción en columna de sílice: | 11 |
| 1.2.4. Separación magnética: | 11 |
| 2.- PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO | 12 |
| 2.1- MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR SALES..... | 13 |
| 2.1.1. Principio. | 13 |
| 2.1.2. Alcance..... | 13 |
| 2.1.3 Protocolo General..... | 13 |
| 2.1.4. Especificaciones para Diferentes Tipos de Muestra..... | 14 |
| 2.1.5. Listado de los Protocolos basados en Precipitación por Sales. | 15 |
| 2.1.6. Rendimiento. | 15 |
| 2.1.7. Calidad de las Muestras..... | 16 |
| 2.2.- MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON SOLVENTES ORGÁNICOS. | 17 |
| 2.2.1. Principio..... | 17 |
| 2.2.2. Alcance..... | 17 |
| 2.2.3. Protocolo General..... | 17 |
| 2.2.4. Especificaciones para distintos Tipos de Muestra | 17 |
| 2.2.5. Protocolo de Solventes Orgánicos que se ha Utilizado en el Desarrollo de esta Guía..... | 18 |
| 2.2.6. Rendimiento. | 18 |
| 2.2.7. Calidad de las Muestras..... | 18 |
| 2.3- MÉTODO DE ADSORCIÓN EN COLUMNAS DE SÍLICE. | 18 |
| 2.3.1. Principio..... | 18 |
| 2.3.2. Alcance..... | 18 |
| 2.3.3. Protocolo General..... | 19 |
| 2.3.4. Especificaciones para Diferentes Tipos de Muestra..... | 19 |
| 2.3.5 Listado de los Protocolos basados en Adsorción en Columnas de Sílice..... | 19 |

Estos protocolos son utilizados por Biobancos participantes en el desarrollo de esta guía.
..... 19

2.3.6. Rendimiento. 20

2.3.7. Calidad de las Muestras..... 20

2.4- MÉTODO DE PURIFICACIÓN POR UNIÓN A MICROESFERAS MAGNÉTICAS. 21

2.4.1. Principio..... 21

2.4.2. Alcance..... 21

2.4.3. Protocolo General..... 21

2.4.4. Especificaciones para Diferentes Tipos de Muestra..... 22

2.4.5. Listado de Protocolos Basados en Unión a Esferas Magnéticas..... 22

2.4.6. Rendimiento. 22

2.4.7. Calidad de las Muestras..... 22

ANEXOS 24

1. INTRODUCCIÓN

El procedimiento general de extracción de ácidos nucleicos consiste en tres etapas consecutivas: disgregación de las células o tejidos (lisis celular), inactivación de las nucleasas intracelulares y en separación de los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares.

La lisis celular depende en gran medida del tipo de muestra que se va a procesar. Mientras que en muestras como sangre, células, ciertos tipos de tejidos o saliva puede alcanzarse una eficiente lisis celular en tiempos relativamente cortos, en otros tipos de muestras como tejidos incluidos en parafina la lisis celular requiere un tratamiento previo mucho más laborioso.

1.1. LISIS CELULAR.

Durante la lisis celular se procede a la destrucción de las estructuras formadas por lípidos y proteínas permitiendo la liberación de los ácidos nucleicos del núcleo celular. La lisis se lleva a cabo mediante una solución salina que suele contener detergentes que desnaturalizan las proteínas y/o proteasas. Una vez separados los ácidos nucleicos de las proteínas y lípidos se lleva a cabo su purificación.

1.2. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

Los métodos de purificación presentan una gran variabilidad y están desarrollados en función de las propiedades físico-químicas de las moléculas de ADN y ARN. Algunos de estos métodos de extracción y purificación utilizados en los biobancos integrados en la Red Nacional de Biobancos del ISCIII y descritos con mayor detalle a lo largo de esta guía de trabajo, se resumen a continuación:

1.2.1. Precipitación mediante sales y alcoholes:

Tras la lisis celular y la eliminación de las proteínas de la muestra, se precipitan los ácidos nucleicos añadiendo isopropanol o etanol. Este método permite la obtención de ADN de gran pureza y presenta la ventaja de que las soluciones utilizadas son muy seguras para la salud del personal técnico que realiza la extracción.

1.2.2. Extracción con solventes orgánicos:

En este protocolo el lisado celular se mezcla con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico para la separación de los ácidos nucleicos y las proteínas. Este método permite obtener un alto rendimiento pero es frecuente que restos de solventes orgánicos contaminen la muestra. Además, el uso de estas sustancias tóxicas para la salud hace necesario que todo el proceso se lleve a cabo en una campana de extracción de productos químicos.

1.2.3. Adsorción en columna de sílice:

En presencia de ciertas sales los ácidos nucleicos quedan retenidos por adsorción en columnas de sílice. Posteriormente las columnas se lavan con soluciones salinas que eliminan las partículas que no se han unido y finalmente los ácidos nucleicos son eluidos con agua o una solución con una baja concentración de sales.

1.2.4. Separación magnética:

En este método las muestras lisadas se mezclan con esferas magnéticas con capacidad de unirse a los ácidos nucleicos. Tras una serie de lavados para conseguir la máxima purificación del material genético las esferas son retiradas de la solución mediante un separador magnético.

Referencias:

- Nucleic Acid Isolation and Purification Manual*. www.roche-applied-science.com.
- DNA Isolation Methods*. World of Forensic Science, 2006. Gale Cengage.

2.- PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.

La elaboración de esta guía de trabajo se ha realizado teniendo en cuenta la información aportada por varios de los biobancos integrados en la Red Nacional del ISCIII referente a los protocolos utilizados para la extracción de ADN genómico.

Estos protocolos se han clasificado en función de su **principio de actuación** para la obtención de muestra. Se ha desarrollado para cada método un **protocolo general** que refleja las líneas de procesamiento comunes en todos los protocolos utilizados en los biobancos con este **principio de actuación**. Teniendo en cuenta que los protocolos utilizados en los biobancos pueden presentar particularidades se recomienda seguir las especificaciones propias de cada protocolo. Para cada uno de los métodos se describe el **alcance** así como el **rendimiento** y **calidad** de las muestras de ADN obtenidas.

El **alcance** definido en cada método señala para qué tipo de muestras se utiliza este protocolo en los biobancos que han participado en la elaboración de esta guía

El **rendimiento** indica el valor obtenido aportado por los datos experimentales de los diferentes biobancos que los utilizan.

La **calidad** de las muestras obtenidas está determinada por la pureza, integridad y funcionalidad de las mismas.

Pureza:

La pureza de la muestra está relacionada con el valor de máxima absorbancia de los ácidos nucleicos detectada a una longitud de onda de 260 nm.

La relación de las absorbancias A260/A280 permite conocer si el ADN obtenido está contaminado por la presencia de compuestos aromáticos ya que éstos absorben a una longitud de onda de 280 nm. Esta relación es muy estable y en general se considera que el ADN es de calidad óptima cuando la relación 260/280 es mayor de 1.8. Una relación A260/280 > 2.1 es indicativa de una presencia considerable de ARN en la muestra. Por el contrario, si esta relación es baja (A260/280 < 1.6) la muestra está contaminada por proteínas o fenoles. En el caso de contaminación por proteínas será necesario llevar a cabo un tratamiento adicional para eliminar las proteínas presentes en la solución de ADN (por ejemplo, adición de proteinasa K). Si la contaminación se debe a la presencia de fenoles es necesario limpiar la muestra con cloroformo, alcohol isoamílico y etanol.

La relación de absorbancia A260/230 se utiliza como medida adicional para determinar la pureza del ADN puesto que a 230 nm se detecta la máxima absorbancia de sales presentes en la solución, carbohidratos u otros posibles contaminantes. En general se considera que el ADN es puro cuando el ratio A260/230 se sitúa en torno 1.5-2.2. Un ratio menor de 1.5 podría ser indicativo de presencia de contaminantes en la muestra. No obstante, hay que tener en cuenta que esta medida no aporta una información tan exacta como la relación A260/280 y que puede verse distorsionada por una baja concentración de ADN en la muestra puesto que se estaría sobervalorando la concentración de sales presentes en el tampón de resuspensión.

Integridad:

La electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/v), permite la valoración de la integridad de la muestra de ADN. Si una muestra es íntegra presentará una banda de ADN única perfectamente definida en la parte superior del gel de agarosa. Una muestra de ADN degradada presentará una estela o "smear" a lo largo del gel que será más pronunciada cuanto mayor sea la degradación de la muestra.

Funcionalidad:

El hecho de que una enzima de tipo ADN polimerasa pueda actuar sobre una muestra de ADN como molde de la reacción de PCR es indicativo de que la pureza de la muestra es óptima. Además, dependiendo del tamaño del fragmento amplificado se puede evaluar el grado de integridad de la muestra.

Al final del documento se incluyen como anexos dos tablas en las que se refleja el rendimiento y la calidad de las muestras obtenidas con cada uno de los protocolos utilizados en los distintos centros que han participado en la elaboración de esta guía.

Tabla 1. Se muestran los datos del rendimiento obtenido con cada protocolo para cada tipo de muestra.

Tabla 2. Se muestran los datos referentes a la calidad obtenida con cada protocolo para cada tipo de muestra. Para cada muestra se indican los datos correspondientes a la pureza (**P**), integridad (**I**) y funcionalidad (**F**) del ADN una vez purificado.

2.1- MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR SALES.

2.1.1. Principio.

En primer lugar se procede a una lisis celular con un detergente aniónico que solubiliza los componentes celulares e inhibe la acción de las nucleasas intracelulares. A continuación se desnaturalizan y se eliminan las proteínas por precipitación salina. El ADN en solución se precipita con isopropanol y se lava con etanol para finalmente ser resuspendido en un tampón estabilizante para ADN.

2.1.2. Alcance.

Este método se utiliza para la obtención de ADN de los siguientes tipos de muestra:

Sangre periférica: volúmenes de entre 3 ml hasta 20 ml (las cantidades de reactivos de este métodos son escalables en función del volumen de muestra).

Células mononucleares de sangre periférica (CMSPs): las preparaciones de CMSPs pueden tener un volumen variable de entre 0,1-2 ml de medio y pueden ser procesados entre 1 y 3×10^7 células.

Células: el número de células que puede ser procesado depende del tipo celular y del modo de obtención de las células (p.ej: cultivos celulares, células purificadas por citometría de flujo, ...). En cualquier caso, puede procesarse un amplio rango de células, desde 1×10^6 hasta 50×10^6 , siempre y cuando se escalen proporcionalmente las cantidades de soluciones de reactivos.

Saliva: pueden procesarse 2 ml de saliva mezclados con 2 ml de preservante Oragene®.

Tejidos: se pueden procesar cantidades muy variables de tejido desde 5 mg a 1 g de tejido fresco congelado. Este protocolo también puede ser aplicado para la obtención de ADN de tejido fijado en formol e incluido en parafina (abreviado como FFPE del inglés "*formaline-fixed paraffin-embedded*").

2.1.3 Protocolo General.

Paso 1. Se añade solución de lisis a la muestra. En este paso es necesario asegurar una lisis celular eficiente, por lo que si la muestra se observa homogénea se puede continuar con el paso siguiente del protocolo; por el contrario, si se observa la presencia de cuerpos celulares en la solución se recomienda una incubación a 37°C o 65°C hasta una homogeneización completa de la muestra. En cualquier caso, las muestras son estables en solución de lisis durante al menos 2 años a temperatura ambiente, de modo que el proceso puede pararse en este paso, manteniendo las muestras en oscuridad, y continuar en días posteriores.

Paso 2. Si se pretende obtener una muestra libre de ARN se procede a la adición de RNAsa con una incubación a 37°C de entre 15- 45 min. Este paso no es necesario en muestras de sangre periférica en las que la contaminación por ARN es prácticamente indetectable. Sí que es aconsejable en otro tipo muestras como células, saliva o tejidos. No obstante, la cantidad de RNAsa a añadir es proporcional al tipo y cantidad de muestra de partida, recomendándose seguir las indicaciones del protocolo específico correspondiente para cada tipo de muestra.

Paso 3. Se añade una solución salina que permite la precipitación de las proteínas citoplasmáticas y nucleares de la muestra. Se procede a una agitación vigorosa de la muestra (con vórtex) durante 20-30 segundos. A continuación, se lleva a cabo una centrifugación a la velocidad y tiempo necesarios para asegurar la precipitación total de las proteínas. Las proteínas

precipitadas se observarán en el fondo del tubo como un botón de color marrón. El sobrenadante debe observarse sin turbidez o presencia de partículas o trazas de color marrón; si no fuese así, debe procederse a una incubación de la muestra durante 5 minutos en hielo repitiendo de nuevo la centrifugación.

- Paso 4.** El sobrenadante que contiene el ADN en solución se transfiere a un nuevo tubo con isopropanol. La muestra se mezcla con el isopropanol invirtiendo el tubo suavemente aproximadamente 50 veces. En este paso se puede observar la aparición de la hebra de ADN. No obstante, la observación de esta hebra va a depender de la cantidad de muestra de ADN procesada.
- Paso 5.** Se procede a la centrifugación de la muestra para precipitar el ADN en el fondo del tubo. El ADN se observará como un precipitado de color blanquecino.
- Paso 6.** Con mucho cuidado, se elimina el sobrenadante por decantación y el tubo con el precipitado de ADN se coloca invertido sobre una hoja limpia de papel absorbente para eliminar al máximo el remanente de isopropanol.
- Paso 7.** Se añade Etanol al 70%, se tapa el tubo y se invierte con suavidad varias veces para lavar el precipitado de ADN.
- Paso 8.** La muestra se centrifuga y el etanol se elimina por decantación o extracción mediante punta de pipeta (con mucho cuidado puesto que el ADN puede despegarse del fondo del tubo). Debemos asegurarnos de que el precipitado de ADN sigue observándose en el fondo o en las paredes del tubo.
- Paso 9.** El exceso de etanol se elimina mediante inversión del tubo sobre una hoja limpia de papel absorbente o dejando secar el tubo al aire durante unos minutos hasta que no se observen restos de etanol. No obstante, es importante evitar que el precipitado quede demasiado seco porque de este modo se dificulta su posterior resuspensión.
- Paso 10.** Se procede a la hidratación del ADN con una solución tamponada adecuada, o bien con tampón TE (Tris HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) o agua estéril.
- Paso 11.** Se recomienda realizar una incubación durante aproximadamente 1 hora a 65°C para facilitar la resuspensión del ADN. Tras esta incubación, el ADN en solución se deja agitando a temperatura ambiente hasta que se comprueba con punta de pipeta que el ADN se encuentra completamente resuspendido, sin presencia de grumos o restos viscosos en la solución.

Nota: las cantidades de las diferentes soluciones utilizadas en este protocolo pueden variar dependiendo del tipo y cantidad de muestra de partida. Dado que se utilizan diferentes kits basados en el método de precipitación por sales se recomienda seguir las instrucciones específicas de cada kit respecto a cantidades de reactivos, los tiempos de incubación así como los tiempos y velocidades de centrifugación indicados de forma específica para cada tipo de muestra.

2.1.4. Especificaciones para Diferentes Tipos de Muestra.

Muestras de sangre total: para este tipo de muestras es necesaria la realización previa de una lisis selectiva de glóbulos rojos.

Para ello se añaden tres volúmenes de una solución de lisis de glóbulos rojos al volumen inicial de sangre total a lisar. La muestra se mezcla por inversión y se deja actuar durante 5 minutos invirtiendo el tubo con suavidad varias veces durante la incubación. Si la muestra se ha lisado completamente se observará un cambio de color hacia una tonalidad bastante más oscura. Posteriormente se procede a una centrifugación para precipitar los leucocitos de la muestra que quedan pegados en el fondo del tubo mientras que el sobrenadante que contiene los glóbulos rojos lisados se elimina por decantación. Es conveniente dejar un pequeño volumen de líquido residual de 200-400 µl para resuspender los leucocitos mediante un vigoroso vórtex de aproximadamente 20 segundos. A continuación, se procede a la lisis celular de los leucocitos correspondiente al **paso 1** del protocolo general descrito anteriormente.

Esta lisis adicional de eritrocitos también puede realizarse sobre muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) si se observa presencia de glóbulos rojos en la muestra.

Muestras de saliva: previamente al procesamiento de las muestras de saliva recogidas en un recipiente con preservante Oragene® se recomienda una incubación de la muestra a 50°C durante 1-2 horas con objeto de optimizar el rendimiento final de ADN obtenido. Este tiempo de incubación puede incrementarse si se considera necesario para aumentar el rendimiento final de muestra.

Muestras de tejido: las muestras de tejido deben ser homogeneizadas para que las células queden más expuestas a la acción de los reactivos. Existe una gran variedad de métodos de disrupción de tejido desde sonicación, hasta trituradores mecánicos, utilización de mortero, adición de esferas de vidrio y fuerte agitación entre otros métodos. En algunos protocolos de extracción de ADN la solución de lisis celular se añade una vez homogeneizada la muestra, mientras que en otros la homogeneización de la muestra se lleva a cabo en la propia solución de lisis. Debido a que el proceso de disrupción del tejido conlleva la liberación de proteasas y otras enzimas involucradas en procesos de degradación de distintos componentes celulares, es habitual la utilización de inhibidores enzimáticos para evitar la degradación celular durante el proceso. Asimismo, trabajar en frío y de una manera rápida con este tipo de muestras minimiza el riesgo de degradación enzimática.

En el caso de preparaciones de tejidos FFPE es necesario eliminar la parafina de la muestra en el mayor grado posible previamente a la extracción de ADN. Para ello se realizan lavados de la muestra con xilol (o algún otro tipo de solución de desparafinación) y etanol.

Nota: las especificaciones indicadas son comunes a todos los métodos de extracción de ADN que se describen en esta guía de trabajo

2.1.5. Listado de los Protocolos basados en Precipitación por Sales.

Estos protocolos son utilizados por Biobancos participantes en el desarrollo de esta guía.

-**Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988).** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**:1215.

-**Gentra® Puregene® Handbook** for purification of archive-quality DNA from: human whole blood, bone marrow, buffy coat, buccal cells, body fluids, cultured cells, tissue, mouse tail, yeast, bacteria. Qiagen. (Hilden, Germany). www.qiagen.com.

-**Qiagen Genomic DNA Handbook** for blood, cultured cells, tissue, mouse tails, yeast, bacteria. Qiagen. (Hilden, Germany). www.qiagen.com.

-**Flexigene® DNA Handbook** for purification of DNA from: human whole blood, buffy coat, cultured cells. Qiagen. (Hilden, Germany). www.qiagen.com.

-**RealPure "SSS" kit.** Durviz s.l.u (Valencia, España). www.durviz.com.

-**DNA Isolation Kit for Mammalian Blood.** Roche. (Basel, Switzerland). www.roche.com.

-**Tissue DNA Extraction kit-AGF.** AutoGen. (Massachusetts, USA). www.autogen.com.

-**Oragene DNA Saliva Extraction-AGF.** AutoGen. (Massachusetts, USA). www.autogen.com.

2.1.6. Rendimiento.

El rendimiento esperado para cada uno de los protocolos anteriores es el siguiente:

-**Miller et al., (1988):** el rendimiento esperado es de aproximadamente 25 µg ADN/ ml de sangre total.

-Gentra® Puregene® Handbook: el rendimiento obtenido en muestras de sangre total oscila entre 25-50 µg ADN/ ml de sangre, estableciéndose el rendimiento medio en torno a 35 µg ADN/ ml de sangre.

En muestras de saliva el rendimiento medio se sitúa alrededor de 55 µg ADN /ml de saliva siempre y cuando se haya recogido la cantidad de saliva adecuada (\approx 2ml) en el contenedor correspondiente.

En muestras de células el rendimiento es de entre 5 y 7 µg ADN/ 10^6 células, aunque este valor puede resultar muy variable dependiendo del tipo celular.

-Qiagen Genomic DNA Handbook: el rendimiento obtenido está en el rango de 25-35 µg ADN/ ml de sangre.

-Flexigene® DNA Handbook: el rendimiento medio obtenido es de aproximadamente 37 µg ADN/ ml sangre y en torno a 13 µg ADN/ 10^6 células en muestras de células mononucleares de sangre periférica.

-RealPure “SSS” kit: el rendimiento obtenido oscila entre 15-45 µg ADN/ ml de sangre, estableciéndose el rendimiento medio en torno a 35 µg ADN/ ml de sangre.

-DNA Isolation Kit for Mammalian Blood: el rendimiento obtenido oscila entre 2-5 µg ADN/ 10^6 células (generalmente se estima que 1 ml de sangre total contiene una media de 7×10^6 leucocitos). Este kit también se ha utilizado con muestras de médula ósea obteniéndose un rendimiento similar al de sangre.

-Tissue DNA Extraction kit-AGF: el rendimiento medio obtenido para tejido fresco congelado es de aproximadamente 3,5 µg ADN/ mg tejido.

En tejido fijado y parafinado el rendimiento medio se estima en torno a 30 µg ADN/ 3 cortes de tejido de 8 µm. Estas cantidades pueden resultar muy variables dependiendo del tipo de tejido procesado.

-Oragene DNA Saliva 2 Extraction-AGF: el rendimiento medio es de aproximadamente 140 µg ADN/ ml de saliva.

2.1.7. Calidad de las Muestras

Pureza:

La pureza del ADN obtenida con el método de precipitación por sales es muy alta alcanzándose valores de absorbancia para la relación A260/280 superiores a 1.8 en la mayoría de los casos para todos los tipos de muestras referidos anteriormente.

La relación A260/230 alcanza valores mayores a 1.5 y cercanos a 2.0 en la mayoría de los casos (incluidas muestras de tejidos fijados y parafinados). Sin embargo, en muestras de saliva se ha observado una relación inferior a 1.5 en algunos casos, sin que se vea afectada la integridad o funcionalidad de la muestra.

Integridad:

Las muestras de ADN obtenidas con este protocolo se pueden considerar muestras de una integridad muy alta puesto que habitualmente se observan como una única banda definida en gel de agarosa. Como excepciones hay que señalar: **1)** muestras de saliva, puesto que en algunos casos puede observarse un leve “smear” a lo largo de la carrera junto con la presencia de una banda íntegra mayoritaria en la parte superior del gel, y **2)** muestras de ADN procedentes de tejidos fijados y parafinados en las que se observa un pronunciado “smear” a lo largo del gel de agarosa.

Funcionalidad:

En la mayor parte de los protocolos utilizados las muestras permiten la amplificación de un fragmento de ADN de gran tamaño ($>$ 17 kb). En las muestras de ADN obtenidas con el método descrito por Miller *et al.*, (1988) se ha comprobado la amplificación de fragmentos de 8,4 kb que permiten una buena secuenciación del ADN. La funcionalidad de las muestras de ADN obtenidas con el protocolo Tissue DNA Extraction kit-AGF se ha comprobado mediante la amplificación de fragmentos de 795 pb, 453 pb y 227 pb tanto en tejido fresco congelado como en tejido fijado y parafinado.

2.2.- MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON SOLVENTES ORGÁNICOS.

2.2.1. Principio.

Este protocolo permite la purificación de ADN mediante la adición de fenol y cloroformo lo que da lugar a la aparición de 2 fases: una fase acuosa superior que contiene los ácidos nucleicos y una fase orgánica que contiene las proteínas disueltas en el fenol y los lípidos disueltos en el cloroformo. Para la purificación de ADN el fenol debe tener un pH≈7-8. Posteriormente se precipita el ADN de la fase acuosa con isopropanol o etanol absoluto y se lava con etanol al 70% para eliminar sales y pequeñas moléculas orgánicas que podrían aún estar presentes en la muestra. Por último el ADN se resuspende en un tampón apropiado.

2.2.2. Alcance

Este método puede ser utilizado para la obtención de ADN de diferentes tipos de muestra como sangre periférica, células o tejidos. En los biobancos integrados en la Red Nacional del ISCIII este método se aplica para la obtención de ADN a partir de sangre y tejido fresco congelado.

2.2.3. Protocolo General.

- Paso 1.** Se procede al lisado celular de la muestra. La lisis se lleva a cabo en función del tipo de muestra que se va a procesar pero es necesario que antes de la adición del fenol la lisis sea completa y el lisado resultante sea homogéneo.
- Paso 2.** Se añade un volumen de fenol al volumen de lisado y la mezcla se agita por inversión del tubo unos 20 segundos.
- Paso 3.** La muestra se centrifuga a 12,000 g durante 3 minutos. Tras la centrifugación se observan dos fases: la fase acuosa superior y la fase orgánica. La interfase entre ambas se observa como una capa blanquecina que irá disminuyendo de espesor a medida que la muestra se encuentre más limpia de proteínas y contaminantes.
- Paso 4.** La fase acuosa que contiene el ADN se transfiere a un tubo limpio con cuidado de no tocar la interfase ni la fase orgánica que son desechadas. A la fase acuosa se le añade un volumen idéntico de una solución combinada de fenol y CIA en proporción 1:1. La mezcla se homogeniza por agitación.
- Paso 5.** La mezcla se centrifuga de nuevo a 12,000 g durante 3 minutos. De nuevo se forman las dos fases si bien debe apreciarse una reducción considerable de la interfase. Los pasos 4 y 5 deben repetirse si la interfase aún aparece visible.
- Paso 6.** La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo y se mezcla con un volumen de cloroformo (el cloroformo secuestra los restos de fenol que hayan quedado en la muestra). La fase acuosa y el cloroformo se mezclan por inversión unos 20 segundos.
- Paso 7.** Se realiza una centrifugación a 12,000 g durante 3 minutos. La fase acuosa se precipita en un tubo limpio con 2 volúmenes de isopropanol. La incubación durante 5-10 minutos de la mezcla, aunque es opcional, puede favorecer la precipitación del ADN.
- Paso 8.** Se realiza una centrifugación a 12,000 g durante 10 minutos para precipitar el ADN. Se desecha el isopropanol y el precipitado de ADN debe observarse en el fondo del tubo.
- Paso 9.** El precipitado se lava con 500 µl de etanol al 70%. La muestra se centrifuga a 12,000 g durante 10-15 min. Opcionalmente se puede realizar un segundo lavado con etanol para maximizar la purificación de la muestra.
- Paso 10.** Se elimina el etanol y se deja secar el precipitado de ADN. Finalmente el ADN es resuspendido en un volumen adecuado de tampón TE o agua destilada.

Nota: solución CIA: mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 24:1

tampón TE : Tris HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM

2.2.4. Especificaciones para distintos Tipos de Muestra

(Ver epígrafe con el mismo título en el apartado **2.1.4.** descrito en la páginas 7 y 8 de esta guía).

2.2.5. Protocolo de Solventes Orgánicos que se ha Utilizado en el Desarrollo de esta Guía.

Sambrook, Fritsch, Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd Edition. Vol. 3, pages E3-E4. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

2.2.6. Rendimiento.

El rendimiento obtenido con este protocolo en muestras de sangre total se sitúa en torno a 30-70 µg ADN/ ml de sangre. En tejidos el rendimiento resulta mucho más variable dependiendo del tipo de tejido y de la cantidad de muestra de partida. No obstante, la extracción con solventes orgánicos permite obtener un rendimiento muy alto de ADN por lo que es un método indicado cuando la cantidad de muestra de partida es limitada.

2.2.7. Calidad de las Muestras.

Pureza: cuando se utiliza este método de extracción de ADN es determinante trabajar con mucho cuidado para evitar la contaminación de la solución de ADN por restos de fenol o cloroformo. La aparición de restos de fenol o cloroformo pueden afectar a las relaciones de absorbancia indicativas de la pureza de la muestra.

Las muestras obtenidas con este método presentan una relación A260/280 con valores en torno a >1.7, aunque es relativamente frecuente observar en la relación A260/230 valores inferiores a 1.5.

Integridad: las muestras se observan como una banda definida en la parte superior del gel de agarosa tras la migración electroforética indicando una integridad óptima del ADN.

Funcionalidad: la mayoría de las muestras obtenidas con este método son capaces de amplificar mediante reacción de PCR fragmentos de ADN de gran tamaño (> 17 kb). En aquellas muestras en las que no se amplifican bandas >17 kb, es posible amplificar fragmentos de ADN de un tamaño aproximado de 7 kb.

2.3- MÉTODO DE ADSORCIÓN EN COLUMNAS DE SÍLICE.

2.3.1. Principio.

El principio de extracción de este tipo de método se basa en la capacidad de adsorción de los ácidos nucleicos en una columna de sílice ante la presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas. Los contaminantes de la muestra son eliminados con posteriores lavados de la columna y finalmente el ADN es eluído con H₂O o un tampón de resuspensión de baja fuerza iónica a pH neutro o ligeramente alcalino.

2.3.2. Alcance.

Cuando se utiliza una columna para la purificación de ácidos nucleicos es importante no saturar la capacidad de la columna de unir ácidos nucleicos debido a un exceso de muestra. De hecho, el rendimiento y la calidad del ADN (o ARN) obtenido con este método depende en gran medida de la cantidad y calidad de la muestra de partida.

Este método puede ser utilizado para la obtención de ADN de los siguientes tipos de muestra:

Sangre periférica: existen kits con columnas de sílice con diferentes capacidades de retención de tal manera que se pueden procesar volúmenes que oscilan entre 0,02 ml y 10 ml de sangre.

Células mononucleares de sangre periférica (CMSPs): las preparaciones de CMSPs pueden tener un volumen variable puesto que se pueden procesar desde 5×10^6 leucocitos hasta cantidades de 1×10^8 leucocitos, siempre y cuando se opte por el kit con la capacidad de carga de la columna más adecuado a la cantidad de muestra de partida.

Células: el número de células que pueden ser procesadas depende en gran medida del tipo celular, por lo que si se utiliza este método por primera vez, se recomienda no cargar la columna con más de 1×10^7 células

Saliva: muestras recogidas en torundas o en recipiente con preservante Oragene®.

Tejidos para tejido fresco congelado se aconseja no superar los 25 mg de muestra por columna aunque la cantidad de partida depende mucho del tipo de tejido que se va procesar. Tejidos fijados y parafinados también pueden ser procesados por este método previa desparafinación de la muestra. Si es la primera vez que se procesa una muestra de tejido FFPE se aconseja no utilizar más de 3 cortes de un grosor de 10 µm.

2.3.3. Protocolo General.

- Paso 1.** En primer lugar se lleva a cabo la lisis de la muestra. En este proceso de lisado es habitual la adición de proteinasa K a la muestra seguido de una incubación con calor hasta que se completa la lisis (no debe observarse presencia de cuerpos celulares). Puesto que no todos los kits desarrollados con esta técnica funcionan de la misma manera se aconseja seguir las instrucciones específicas de cada kit para el tipo concreto de muestra que se vaya a procesar
- Paso 2.** Si se desea obtener una muestra libre de ARN se debe añadir RNAsa a la solución de lisado. En muestras de sangre la contaminación por ARN resulta despreciable por lo que éste es un paso que habitualmente no se lleva a cabo. En otros tipos de muestra donde la presencia de ARN puede ser alta se recomienda añadir RNAsa siguiendo las indicaciones del kit que vaya a ser utilizado.
- Paso 3.** Se añade a la muestra una solución de unión de ácidos nucleicos a la columna. Puede ser una solución provista por el kit o etanol absoluto. La mezcla se aplica a la columna de sílice que se encuentra adaptada a un tubo vacío y mediante centrifugación el ADN queda retenido en la columna mientras que las proteínas y otros contaminantes de la muestra son arrastrados con la solución de lisado al tubo.
- Paso 4.** Sobre la columna, que se ha transferido a un nuevo tubo, se añade una solución de lavado para eliminar el resto de contaminantes de la muestra que son arrastrados en esta solución por centrifugación. Este paso suele repetirse dos veces para asegurar una buena pureza de la muestra.
- Paso 5.** Se transfiere la columna a un nuevo tubo y se lleva a cabo una nueva centrifugación a la máxima velocidad posible (durante 1-2 minutos) para asegurar una eliminación completa de los restos de la solución de lavado de la columna previamente a la elución del ADN.
- Paso 6.** La columna se transfiere a un nuevo tubo con tapa y se lleva a cabo la separación del ADN de la columna de sílice añadiendo H₂O o un tampón de baja fuerza iónica. El tampón de resuspensión debe aplicarse en el centro de la columna y con un volumen suficiente para asegurar que se reparte uniformemente por toda la superficie de sílice. Se aconseja un tiempo de incubación de la columna con el tampón de resuspensión de 4-5 minutos para aumentar el rendimiento de ADN. Por último, se realiza una centrifugación que permite la colección del ADN en solución en el tubo y se desecha la columna.

Nota: si aplicamos el volumen de resuspensión mínimo para asegurar su reparto por toda la columna, la solución de ADN obtenida resultará más concentrada. Por el contrario, si se desea un volumen mayor de solución de ADN la muestra estará más diluida. Si se desea obtener una cantidad intermedia de ADN en una solución que no resulte demasiado diluida se puede realizar la elución de la columna dos veces, cada una de ellas con la mitad del volumen de resuspensión final de la muestra. Por ejemplo, si se quiere realizar la elución con 100 µl finales se llevará a cabo una primera elución con 50 µl y tras la centrifugación de la muestra, manteniendo la columna en el mismo tubo, se llevará a cabo un segundo paso de elución con otros 50 µl de solución de resuspensión.

2.3.4. Especificaciones para Diferentes Tipos de Muestra.

(Ver epígrafe con el mismo título en el apartado **2.1.4.** descrito en la página 7 y 8 de esta guía).

2.3.5. Listado de los Protocolos basados en Adsorción en Columnas de Sílice.

Estos protocolos son utilizados por Biobancos participantes en el desarrollo de esta guía.

-**Manual PerfectPure™ DNA Blood Kit.** For genomic DNA purification from whole blood and buffy coat samples. 5Prime. (Hamburg, Germany & Gaithersburg, USA). www.5Prime.com.

-**Genomic DNA from Blood.** Macherey-Nagel. (Düren, Germany). www.mn-net.com.

-**QiAamp®DNA Mini and Blood Mini Handbook** for DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots, body fluids, cultured cells, swabs, tissue. Qiagen. (Hilden, Germany). www.qiagen.com.

-**QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook** for purification of genomic DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Qiagen. (Hilden, Germany). www.qiagen.com.

2.3.6. Rendimiento.

El rendimiento esperado para cada uno de los protocolos utilizados es el siguiente:

-**Manual PerfectPure™ DNA Blood Kit:** el rendimiento obtenido oscila entre aproximadamente 25-40 µg ADN/ ml sangre.

-**Genomic DNA from Blood:** con este protocolo se alcanza un rendimiento medio de aproximadamente 30 µg ADN/ ml de sangre.

-**QIAamp®DNA Mini and Blood Mini Handbook:** para muestras de sangre este método permite obtener un rendimiento de 25-35 µg ADN/ ml de sangre.

Para muestras de saliva extraídas con preservante Oragene® se obtiene un rendimiento de 15-25 µg ADN/ ml de saliva. Para muestras de saliva obtenidas por torunda se obtienen alrededor de 15-25 µg ADN/ torunda.

En muestras de células se han obtenido valores en torno 1,5-5 µg ADN/ 10⁶ células; la extracción de ADN a partir de células fijadas en solución de Carnoy (etanol absoluto, cloroformo, ácido acético glacial en proporción 6:3:1) ha permitido obtener cantidades de 1-4 µg ADN/ 10⁶ células.

Para muestras de tejido el rendimiento esperado es de en torno a 0,2-1,2 µg ADN/ mg de tejido, aunque este valor depende mucho del tipo y cantidad de la muestra de tejido que se procese.

Este método también se ha utilizado con una pequeña porción de coágulo (≈ 200 µl) como muestra de partida obteniéndose un rendimiento de aproximadamente 20 µg por extracción.

-**QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook:** se han obtenido valores de 37 µg ADN/ mg de tejido y de 25-35 µg de ADN/ bloque de 10 µm de grosor aunque como es habitual en tejidos estas cantidades dependen en gran medida del tipo de muestras y de la cantidad y calidad de la muestra de partida.

2.3.7. Calidad de las Muestras.

Pureza: este método permite obtener muestras de una gran pureza. Si bien la composición de las distintas soluciones empleadas conlleva una considerable variabilidad de la relación A260/230.

Las muestras obtenidas con este método presentan una relación A260/280 >1.7 salvo cuando se obtiene ADN a partir de células fijadas en solución de Carnoy en las que el valor medio A260/280 se observa en torno a 1.65. La relación A260/230 presenta valores >1 en la mayoría de los casos.

Integridad: las muestras obtenidas a partir de sangre, células y tejido fresco congelado presentan una integridad muy alta con la presencia de una banda de ADN definida en la parte superior del gel de agarosa. En muestras de ADN procedente de saliva y células fijadas con solución de Carnoy, es frecuente la aparición de un “smear” en la muestra, si bien la banda en la parte superior del gel sigue siendo predominante. En muestras obtenidas a partir de tejidos FFPE se observa un “smear” pronunciado a lo largo del gel de agarosa reflejando una mayor degradación del ADN.

Funcionalidad: las muestras que presentan una banda definida en la parte superior del gel de agarosa son capaces de amplificar por una reacción de PCR un fragmento > 17.5 kb. En muestras de ADN de saliva o de células fijadas en medio de Carnoy no siempre se logra amplificar fragmentos >17.5 kb. No obstante, en la mayoría de los casos se logra amplificar fragmentos de ADN de aproximadamente 5- 7 kb. No se ha comprobado mediante PCR la funcionalidad de muestras de tejido fresco congelado, aunque dado que tanto la integridad como la pureza obtenidas con este tipo de muestras son altas, probablemente se logren amplificar por PCR fragmentos de ADN de gran tamaño.

Las muestras procedentes de tejidos FFPE suelen amplificar fragmentos de aproximadamente 300 pb y se ha comprobado que son funcionales en una reacción de qPCR que amplifica fragmentos de 100-150 pb.

2.4- MÉTODO DE PURIFICACIÓN POR UNIÓN A MICROESFERAS MAGNÉTICAS.

2.4.1. Principio.

Este método utiliza esferas magnéticas cuya superficie está recubierta con polímeros naturales o sintéticos que presentan una alta afinidad por los ácidos nucleicos. Las esferas magnéticas se añaden al lisado de la muestra lo que permite su unión a las moléculas de ADN. Cuando se sitúa un imán en la pared del tubo, éste permite el agrupamiento en dicha pared de las esferas con el ADN unido, mientras que los contaminantes de la muestra en solución son eliminados por pipeteo o decantación. Después de varios ciclos de resuspensión y lavado en los que las esferas quedan retenidas por el imán, el ADN es eluído en un tampón adecuado.

2.4.2. Alcance.

Este método se utiliza para la obtención de ADN de los siguientes tipos de muestra:

Sangre periférica: pueden procesarse volúmenes de entre 5 y 10 ml de sangre periférica.

Células mononucleares de sangre periférica (CMSPs): las preparaciones de CMSPs pueden tener un volumen variable de entre 0,1-2 ml de medio.

Cultivos celulares: pueden procesarse hasta 1.2×10^7 células.

Líquido amniótico: pueden procesarse volúmenes de entre 1-3 ml.

Saliva: pueden procesarse 2 ml de saliva mezclados con 2 ml de preservante Oragene®.

Tejido fresco congelado: se aconseja no superar los 10 mg de muestra por extracción.

2.4.3. Protocolo General.

Paso 1. Se añade tampón de lisis a la muestra junto con la proteasa reconstituida y se realiza una incubación durante 5 minutos para asegurar que la lisis ya se ha completado. Si se trata de tejidos, se añade proteinasa K en una concentración final de 250 µg/ ml de tampón de lisis y se lleva a cabo una incubación a 56°C con agitación a 600 rpm hasta que la lisis de las células sea completa. En muestras de saliva con preservante Oragene® no se adiciona el tampón de lisis pero la muestra con el preservante se incuba durante toda la noche a 55°C. El material no lisado puede ser separado mediante una breve centrifugación.

Paso 2. A la muestra lisada se le añaden las esferas magnéticas y un tampón que favorece la unión de las esferas magnéticas con el ADN. Se mezcla bien y se deja en incubación durante 5-10 minutos.

Paso 3. Se aplica al tubo que contiene la mezcla de lisado y esferas un separador magnético durante 2-4 minutos de modo que las esferas magnéticas unidas al ADN queden aglutinadas en la parte del tubo en contacto con el separador magnético y el resto de la solución es eliminada.

Paso 4. El tubo se retira del separador magnético y se le añade un tampón de lavado. La mezcla se agita para que todas las esferas sean accesibles al tampón de lavado.

Paso 5. Se aplica de nuevo el separador magnético durante 1-3 minutos y se elimina el tampón de lavado.

Paso 6. Se realizan dos nuevos lavados siguiendo el mismo procedimiento descrito en el paso 5. Al eliminar el tampón de lavado en el último paso no se retira el tubo del separador magnético de modo que las esferas quedan agrupadas en la parte del tubo en contacto con el separador.

Paso 7. Se añade una nueva solución de lavado sobre las esferas magnéticas agrupadas y se realiza una incubación durante 1 minuto. Tiempos más prolongados de incubación o la dispersión de las bolas magnéticas durante la misma pueden dar lugar a un rendimiento más bajo reflejado en la obtención de una menor cantidad de ADN.

Paso 8. Se elimina la solución de lavado y se añade el volumen adecuado de tampón de resuspensión (también puede utilizarse tampón TE a pH 8.0 o H₂O a pH 8.0). Se retira el separador para mezclar bien las esferas con el tampón de resuspensión de ADN. La solución se incuba durante 10 minutos con agitación a temperatura ambiente para eluir el ADN de las esferas. Esta incubación puede realizarse a 55°C para optimizar la elución del ADN.

Paso 9. Se aplica el separador magnético al tubo durante aproximadamente 3 minutos para separar las esferas magnéticas de la suspensión de ADN. La solución de ADN se pasa a un tubo limpio con cuidado de no arrastrar las esferas magnéticas. Si aún se observase presencia de esferas magnéticas en la solución de ADN se repite de nuevo este último paso.

2.4.4. Especificaciones para Diferentes Tipos de Muestra.

(Ver epígrafe con el mismo título en el apartado 2.1.4. descrito en la página 7 y 8 de esta guía).

2.4.5. Listado de Protocolos Basados en Unión a Esferas Magnéticas

Estos protocolos son utilizados por Biobancos participantes en el desarrollo de esta guía

-**Chemagic DNA Blood Kit.** Chemagen. (Baesweiler, Germany). www.chemagen.com.

-**Chemagic DNA Tissue Kit.** Chemagen. (Baesweiler, Germany). www.chemagen.com.

-**Chemagic DNA Buffy Coat Kit special.** Chemagen. (Baesweiler, Germany). www.chemagen.com.

-**Genomic DNA Isolation from 4 ml Saliva.** Chemagen. (Baesweiler, Germany). www.chemagen.com.

-**Chemagic Amniotic Fluid Kit special.** Chemagen. (Baesweiler, Germany). www.chemagen.com.

-**Chemagic DNA Cell Kit special.** Chemagen. (Baesweiler, Germany). www.chemagen.com.

2.4.6. Rendimiento.

El rendimiento obtenido para muestras de sangre total se sitúa en un rango de entre 25 y 33 µg ADN/ ml de sangre. Para células mononucleares de sangre periférica se obtiene un rendimiento aproximado de 25 µg ADN/ ml de sangre.

Con muestras de saliva se obtiene un rendimiento de aproximadamente 25 µg ADN/ ml de saliva.

Para muestras de cultivos celulares el rendimiento obtenido se sitúa en valores de en torno a 8-16 µg ADN/ 10⁶ células. Estos valores pueden variar según el tipo celular que se procese.

En muestras de líquido amniótico se alcanza un rendimiento en torno a 0,5-3 µg ADN/ ml de muestra.

Para tejidos frescos se ha observado un rendimiento de alrededor a 2-6 µg ADN/ mg de tejido. El resultado puede variar en función de la naturaleza del tejido que se procese.

2.4.7. Calidad de las Muestras.

Pureza: si se detecta la presencia de esferas magnéticas en la muestra las relaciones de absorbancia pueden resultar afectadas por lo que se recomienda aplicar de nuevo el separador magnético a la solución de ADN durante unos 3 minutos para eliminar las esferas que pudiesen quedar en de la muestra de ADN.

En general con este método las relaciones de absorbancia A260/280 presentan valores entre >1.7 y 2.1. Mientras que en la mayoría de los casos la relación A260/230 es >1.5.

Integridad: tras la migración del ADN mediante electroforesis se observa una banda definida en la parte superior del gel de agarosa indicativa de una integridad óptima del ADN

Funcionalidad: la mayoría de las muestras obtenidas con este método permiten la amplificación de fragmentos de ADN de elevado tamaño molecular (>17.5 kb) mediante reacción de PCR.

ANEXOS

Tablas RENDIMIENTO obtenido:

1A. Se muestran los datos del rendimiento obtenido para cada tipo de muestra con los métodos de extracción de ADN basados en precipitación por sales y extracción con solventes orgánicos.

| | | MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | | PRECIPITACIÓN CON SALES | | | | | | | SOLVENTES ORGÁNICOS |
| | | Miller <i>et al.</i> (1988) | Genra® Puregene® | Quiagen Genomic DNA | Flexigene® DNA | RealPure “SSS” | DNA Isolation Kit for Mammalian Blood | Tissue DNA Extractor kit-AGF | Oragene DNA Saliva Extraction-AGF |
| TIPO DE MUESTRA | sangre periférica | ≈ 25 µg ADN / ml de sangre | ≈ 35 µg ADN / ml de sangre | 25-35 µg ADN / ml de sangre. | ≈ 37 µg ADN / ml sangre | ≈ 35 µg ADN / ml de sangre | 2-5 µg ADN / 10 ⁶ células | | 30-70 µg ADN / ml de sangre |
| | CMSPs | | | | ≈ 13 µg ADN / 10 ⁶ células | | | | |
| | células | | 5-7 µg ADN / 10 ⁶ células | | | | | | |
| | médula ósea | | | | | | 2-5 µg ADN / 10 ⁶ células | | |
| | células fijadas en Camoy | | | | | | | | |
| | saliva | | ≈ 55 µg ADN / ml de saliva | | | | | | ≈ 140 µg ADN / ml de saliva. |
| | tejido fresco congelado | | | | | | | ≈ 3,5 µg ADN / mg tejido | muy variable |
| | tejidos FFPE | | | | | | | ≈ 30 µg ADN / 3 cortes de 8 µm | |
| | líquido amniótico | | | | | | | | |
| | coágulo | | | | | | | | |

1B. Se muestran los datos del rendimiento obtenido para cada tipo de muestra con los métodos de extracción de ADN basados en adsorción en columnas de sílice y unión a esferas magnéticas.

| | | MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| | | ADSORCIÓN EN COLUMNAS DE SÍLICE | | | | UNIÓN A ESFERAS MAGNÉTICAS | | | | | |
| | | Manual PerfectPure™ DNA Blood Kit | Genomic DNA from Blood | QiAamp®DNA Mini and Blood Mini | QIAamp® DNA FFPE Tissue | Chemagic DNA Blood Kit | Chemagic DNA Tissue Kit | Buffy Coat Kit special | Genomic DNA Isolation from Saliva | Chemagic Amniotic Fluid Kit special | Chemagic DNA Cell Kit special |
| TIPO DE MUESTRA | sangre periférica | 25-40 µg ADN/ ml sangre | ≈ 30 µg ADN/ ml de sangre | 25-35 µg ADN/ ml de sangre | | 25-33 µg ADN/ ml de sangre | | | | | |
| | CMSPs | | | | | | | ≈ 25 µg ADN/ ml de sangre | | | |
| | células | | | 1,5-5 µg ADN/ 10 ⁶ células | | | | | | | 8-16 µg ADN/ 10 ⁶ células |
| | médula ósea | | | | | | | | | | |
| | células fijadas en Carnoy | | | 1-4 µg ADN/ 10 ⁶ células | | | | | | | |
| | saliva | | | 15-25 µg ADN/ ml o torunda | | | | | ≈ 25 µg ADN/ ml de saliva | | |
| | tejido fresco congelado | | | 0,2-1,2 µg ADN/ mg de tejido | | | 2-6 µg ADN/ mg de tejido | | | | |
| | tejidos FFPE | | | | ≈ 37 µg ADN/ mg 25-35 µg ADN/ 10 µg | | | | | | |
| | líquido amniótico | | | | | | | | | 0,5-3 µg ADN/ ml de muestra | |
| | coágulo | | | ≈ 20 µg /200 µl | | | | | | | |

Tablas CALIDAD observada en las muestras:

2A. Se muestran los datos de la calidad observada en cada tipo de muestra con los métodos de extracción de ADN basados en precipitación por sales y extracción con solventes orgánicos.

| | | MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------|---|--|---|--|---|---|------------------------------------|----------------------------------|---|
| | | PRECIPITACIÓN CON SALES | | | | | | SOLVENTES ORGÁNICOS | | |
| | | Miller et al. (1988) | Gentra® Purgene® | Quiagen Genomic DNA | Flexigene® DNA | RealPure "SSS" | DNA Isolation Kit for Mammalian Blood | Tissue DNA Extraction kit-AGF | Qiagen DNA Saliva Extraction-AGF | Fenol/ Cloroformo |
| TIPO DE MUESTRA | sangre periférica | P: A260/280 : 1.8-2 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 8,4kb, secuenciación alta calidad | P: 260/280 : >1.7-2.1; A260/230 : >1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación >17 kb | P: 260/280 : >1.7-2.1; A260/230 : >1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación >17 kb | P: 260/280 : >1.8; A260/230 : > 2 I: banda definida parte superior gel | P: 260/280 : >1.7-2.1; A260/230 : >1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación >17 kb | P: A260/280 : >1.8; A260/230 : >1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación >17 kb | | | P: A260/280 > 1.7; A260/230 < 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación >17 kb en la mayoría muestras . Siempre amplificación de 7 kb |
| | CMSPs | | | | P: 260/280 : >1.8; A260/230 : >1.9 I: banda definida parte superior gel | | | | | |
| | células | | P: 260/280 : >1.7-2.1; A260/230 : >1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación >17 kb | | | | | | | |
| | médula ósea | | | | | | P: 260/280 : >1.8; A260/230 : >1.5 I: banda definida parte superior gel PCR: amplificación >17 kb | | | |
| | células fijadas en Camoy | | | | | | | | | |
| | saliva | | P: 260/280 : >1.7-2.1; A260/230 : <1.5 I: banda definida con leve smear F: PCR amplificación >17 kb en la mayoría muestras . Siempre amplificación de 7 kb | | | | | P: 260/280 : >1.7; A260/230 : >1.4 | | |
| | tejido fresco congelado | | | | | | P: 260/280 : >1.9; A260/230 : >1.8 I: banda definida parte superior gel PCR: amplificación bandas : 795, 453 y 227 pb | | | P: 260/280 : >1.7; A260/230 : < 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación >17 kb en la mayoría muestras . Siempre amplificación de 7 kb |
| | tejidos FFPE | | | | | | P: 260/280 : >1.9; A260/230 : > 2 I: smear pronunciado F: PCR amplificación bandas : 795, 453 y 227 pb | | | |
| | líquido amniótico | | | | | | | | | |
| coágulo | | | | | | | | | | |

P: pureza
I: integridad
F: funcionalidad

2B. Se muestran los datos de la calidad observada en cada tipo de muestra con los métodos de extracción de ADN basados en adsorción en columnas de sílice y unión a esferas magnéticas.

| | | MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------------|--|--|---|--|--|--|-----------------------------------|--------------------------------------|--|
| | | ADSORCIÓN EN COLUMNAS DE SÍLICE | | | | | UNIÓN A ESFERAS MAGNÉTICAS | | | | |
| | | Manual PurePre™ DNA Blood Kit | Genomic DNA from Blood | QIAamp® DNA Mini and Blood Mini | QIAamp® DNA FFPE Tissue | Chemagic DNA Blood Kit | Chemagic DNA Tissue Kit | Chemagic DNA Buffy Coat Kit special | Genomic DNA Isolation from Saliva | Chemagic Amniotic Fluid Kits special | Chemagic DNA Cell Kits special |
| TIPO DE MUESTRA | sangre periférica | P: A60/280 > 1.9; A20/280 > 2.1 | P: A26/Q280 > 1.7; A20/280 > 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb | P: A26/Q280 > 1.7; R/40280 > 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb | | P: A26/Q280 > 1.7-2.1; A20/280 > 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb | | | | | |
| | CMSPs | | | | | | | P: A26/Q280 > 1.7-2.1; A20/280 > 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb | | | |
| | células | | | P: A26/Q280 > 1.7; R/40280 > 1 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb | | | | | | | P: A26/Q280 > 1.7-2.1; A20/280 > 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb |
| | médula ósea | | | | | | | | | | |
| | células fijadas en Camoy | | | P: A26/Q280 > 1.5; R/40280 > 1 I: banda en parte superior gel con smear F: PCR amplificación > 17 kb | | | | | | | |
| | saliva | | | P: A26/Q280 > 1.7-2.1; A20/280 > 1 I: banda definida con smear F: PCR amplificación > 17 kb | | | | P: A26/Q280 > 1.7-2.1; A20/280 > 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb | | | |
| | tejido fresco congelado | | | P: A26/Q280 > 1.7-2 I: banda definida parte superior gel | | | P: A26/Q280 > 1.7-2.1; A20/280 > 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb | | | | |
| | tejidos FFPE | | | | P: 260/280 > 1.7-2.1; R/40280 > 2 I: smear, pero no ruido F: PCR amplificación > 30 pb; qPCR amplificación > 100-500 pb | | | | | | |
| | líquido amniótico | | | | | | | | | | P: A26/Q280 > 1.7-2.1; A20/280 > 1.5 I: banda definida parte superior gel F: PCR amplificación > 17 kb |
| coágulo | | | P: A26/Q280 > 1.7; A20/280 > 1.5 | | | | | | | | |

P: pureza
I: integridad
F: funcionalidad

Red Nacional de Biobancos

Spanish National
Biobank Network



Red Biobancos

Instituto de Salud Carlos III