

EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE PERIFÉRICA – MÉTODO FENOL-CLOROFORMO

➤ Reactivos y materiales para extracción – Fase 1

- Recipiente de descarte con solución de hipoclorito, agua y detergente.
- Pipetas de Pasteur
- Tubos Falcon identificados
- Tampón RSB 1x
- Nonidet (detergente que lisa las células)
- SDS (lisa los núcleos, rompe la porción lipídica de la membrana).
- Proteinasa K (rompe la porción proteica de la membrana).

❖ Extracción del ADN – Fase 1 (aprox. 1 hora)

1. Recolectar 12 mL de sangre en 2 tubos con EDTA (tubos tapa morada de 6 mL cada uno).
2. Centrifugar la sangre por 10 minutos a 2500 rpm y descartar el plasma.
3. Transferir los leucocitos para el tubo Falcon con pipeta Pasteur.
4. Adicionar Tampón RSD 1x con pipeta de Pasteur hasta completar el volumen final de 11 mL en el tubo (para cantidades de sangre >6 mL de sangre completar hasta 11 mL de RSB; 5-6 mL de sangre completar hasta 9 mL de RSB; <5 mL completar hasta 7 mL de RSB. *Menos de 5 mL de sangre puede ser insuficiente para obtener una masa de ADN mínimo requerida en este protocolo de 5µg y una concentración mínima de 50 ng/UL).*
5. Adicionar 60 uL de Nonidet p40 (6 gotas), homogenizar por 10 minutos hasta quedar translucido y de color cereza contra la luz.
6. Centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm e descartar el sobrante, volteando el tubo en el recipiente para descartar sangre.
7. Resuspender el pellet en 500 uL de tampón RSB 1x
8. Lisar los núcleos con 3 mL de SDS
9. Adicionar 80 uL de Proteinasa K, agitar por 10 minutos
10. Incubar por 2 – 3 horas o durante la noche a 37 °C en la estufa
11. Esperar 1 semana para realizar la fase 2 (puede realizarse la segunda fase, tan pronto como después de 3 horas o al día siguiente, obteniéndose igual buenos resultados).

➤ Reactivos y materiales para extracción – Fase 2

- Pipetas de Pasteur
- Tubos Falcon
- Fenol (purificación – precipita las proteínas)
- Solución de Cloroformo y alcohol isoamílico (purificación)
- Etanol al 100% frio (precipitación del ADN, conserva la estructura del ADN).

❖ Extracción del ADN – Fase 2 (aprox. 1 ½ - 2 horas):

1. Adicionar 3 mL de fenol saturado (pipeta de plástico), mezclar, suavemente invirtiendo el tubo, y homogenizar por 10 minutos. Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm.
2. Transferir la porción superior del tubo (transparente) con una pipeta Pasteur para otro tubo Falcon. Tener cuidado de no agitar la porción inferior que será descartada.
3. Adicionar 1,5 mL de fenol y 1,5 mL de cloroformo (con pipeta de vidrio). Mezclar la solución y homogenizar por 10 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm. Remover la porción inferior del tubo y descartar.
4. Adicionar 3 mL de cloroformo. Mezclar la solución y homogenizar por 10 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm. Remover completamente la porción inferior del tubo y descartar.
5. Adicionar 6 mL de etanol al 100% frio y mezclar levemente, hasta observar el apareamiento del precipitado de ADN.
6. Llevar el frasco para el congelador y dejar toda la noche.
7. Sacar el ADN y resuspender en 200 uL de H₂O o solución TE.
8. Dejar dentro de la solución a temperatura ambiente durante toda la noche.
9. Guardar la muestra en la caja de depósito, en un tubo criogénico de rosca en el congelador.