



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

COMPARACIÓN DE 5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE
ADN GENÓMICO DE SANGRE

AUTORA

María Mercedes Vásquez Bonilla

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

COMPARACIÓN DE 5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO
DE SANGRE

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

Ph.D Jacobus Henri de Waard

Autora

María Mercedes Vásquez Bonilla

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Comparación de 5 métodos de extracción de ADN genómico de sangre, a través de reuniones periódicas con el estudiante María Mercedes Vásquez Bonilla, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Jacobus Henri de Waard
Doctor en Microbiología Molecular
PAS: NV517KJB3

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Comparación de 5 métodos de extracción de ADN genómico de sangre, del estudiante María Mercedes Vásquez Bonilla, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Emilia Vásquez Domínguez

Máster Universitario de Investigación en Biología Molecular, Celular y Genética

CI: 1709009243

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

María Mercedes Vásquez Bonilla

CI: 1003952981

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jacobus H. de Waard, por el continuo apoyo, motivación y un inmenso aporte de conocimientos en este proyecto que fue muy necesario. También, me gustaría agradecer al Dr. Marco Coral y a la M.Sc. Emilia Vásquez, por su firme apoyo al escribir esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano por brindarme un apoyo incondicional y un estímulo continuo durante mis años de estudio. A mi madre, ya que sin ella no habría sido capaz de creer en mí y cumplir mis objetivos con éxito, todo esto gracias a su insuperable amor.

RESUMEN

Las técnicas en biología molecular requieren una extracción de ADN rápida con buena cantidad y calidad. En el presente trabajo se emplearon 50 preparaciones de capa leucocitaria, las cuales fueron divididas en cinco lotes de diez muestras respectivamente. Se compararon cinco métodos de aislamiento: un método comercial a partir de columnas de sílice (kit Roche), un método con resina quelante (Chelex-100), un método clásico usado en los laboratorios fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) y dos métodos caseros desarrollados en investigaciones anteriores con la aplicación de *silica* en polvo y columnas de sílice. La determinación de la cantidad y calidad de ADN se efectuó a través de espectrofotometría. El ADN extraído también se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y mediante qPCR. Los resultados mostraron un alto nivel de variación para concentraciones y purzas de ADN; la mayor concentración (50.70 ng/μl) se obtuvo con Chelex-100 (Bio-Rad), a pesar de que el ADN no era puro. La mayor pureza de la muestra de ADN se consiguió empleando el kit de extracción *High Pure PCR Template Preparation* (Roche); sin embargo, no fue el mejor en la concentración de ADN (31.40 ng/μl). A pesar de las grandes diferencias en la pureza de ADN, todos los métodos presentaron productos de amplificación mediante qPCR excepto Chelex-100 y PCI. Los métodos caseros aislaron mayor cantidad de ADN con un nivel menor de pureza sin la presencia de químicos tóxicos, como el método del kit de Roche. En conclusión, la elección de un método adecuado para aislar ADN de una muestra en particular cumple un papel importante para la calidad del ADN y sus aplicaciones posteriores.

ABSTRACT

Molecular biology techniques require rapid DNA extraction with good quantity and quality. In the present work 50 preparations of buffy coat were used, which were divided into five batches of ten samples respectively. Five methods of isolation were compared: a commercial method from silica columns (Roche kit), chelating resin (Chelex-100), a classical method used in the laboratories phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI) and two homemade methods developed previously with the application of silica powder and silica columns. The quantity and quality DNA determination were carried out through spectrophotometry. The extracted DNA was also analyzed by agarose gel electrophoresis and by qPCR. The results showed a high level of variation for DNA concentrations and purities. The highest concentration (50.70 ng/ μ l) was obtained with Chelex-100 (Bio-Rad), although the DNA was not pure. The highest purity of the DNA sample was achieved using the High Pure PCR Template Preparation (Roche) extraction kit; however, it was not the best in the DNA concentration (31.40 ng/ μ l). Despite the large differences in DNA purity, all methods presented amplification products using qPCR except for Chelex-100 and PCI. Homemade methods generally isolated more DNA with a lower level of purity without the presence of toxic chemicals, just like the Roche kit method. The choice of a suitable method to isolate DNA from a sample plays an important role for the quality of DNA and its subsequent applications.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Objetivos	5
1.3.1. objetivo general	5
1.3.2. objetivos específicos	5
1.4. Justificación	5
2. Capítulo II. Marco teórico	6
2.1. Sangre como fuente de ADN	6
2.2. Aislamiento de ADN a partir de sangre	7
2.3. Métodos de aislamiento de ADN	7
2.3.1. fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI)	7
2.3.2. chelex-100	8
2.3.3. kit de extracción High Pure PCR Template Preparation (Roche)	9
2.3.4. columnas de sílice	10
2.3.5. <i>silica</i>	10
2.3.6. determinación de la cantidad y calidad de ADN aislado	11
2.3.7. PCR en tiempo real (qPCR)	13
3. Capítulo III. Procedimientos	14
3.1. Materiales y métodos	14
3.1.1. recepción de muestras de sangre	14
3.1.2. aislamiento de capa leucocitaria libre de eritrocitos	14
3.1.3. preparación de muestras para cada método	14
3.1.4. método con <i>silica</i>	14
3.1.5. extracción de ADN con columnas de sílice	16
3.1.6. extracción de ADN con el Kit de extracción High Pure PCR Template Preparation (Roche)	16
3.1.7. extracción de ADN con Chelex-100	17

3.1.8. extracción de ADN con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (PCI)	17
3.2. Evaluación de la cantidad, calidad e integridad del ADN extraído.....	18
3.2.1. cuantificación del ADN.....	18
3.2.2. electroforesis en gel.....	18
3.2.3. PCR en tiempo real	18
3.2.4. evaluación estadística de los resultados	19
4. Capítulo IV. Resultados y discusión.....	20
4.1. Extracción de ADNg de diferentes muestras	20
4.2. Comparación de la cantidad y pureza de ADN utilizando cinco métodos	21
4.3. Reproducibilidad.....	28
4.4. Integridad de ADN, análisis en gel de agarosa	33
4.5. Calidad de ADN, análisis por PCR en tiempo real	34
4.5.1. amplificación de ADN aislado con <i>silica</i>	35
4.5.2. amplificación de ADN aislado con columnas de sílice	36
4.5.3. amplificación de ADN aislado con el kit de Roche	36
4.5.4. amplificación de ADN aislado con Chelex-100	37
4.5.5. amplificación de ADN aislado con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI)	38
4.6. Comparación total	41
5. Conclusiones y recomendaciones	43
5.1. Conclusiones	43
5.2. Recomendaciones	45
REFERENCIAS	46
ANEXOS.....	60

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

La extracción de biomoléculas como el ADN es una de las actividades más cruciales realizadas en biología molecular, por ser el punto de partida para procesos posteriores como la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o técnicas de hibridación (Bermingham & Luettich, 2003). Existen diferentes métodos para efectuar el aislamiento de ADN genómico (ADNg). El grado de pureza y calidad del ADN aislado depende de las aplicaciones para las cuales se usará después. Algunas aplicaciones posteriores son susceptibles a cierto grado de contaminación, incluida la presencia de proteínas desnaturalizadas (Green & Sambrook, 2012). Por ejemplo, dentro de la secuenciación es necesario ADN puro, ya que la presencia de contaminantes puede influenciar en las lecturas de la secuencia (Salter, Cox, Turek, Calus, Cookson, Moffatt, Turner, Parkhill, Loman, & Walker, 2014). Para ciertas aplicaciones, hervir microorganismos en un *buffer* es suficiente para liberar ADN y usarlo en una reacción de PCR (Englen & Kelley, 2000).

La cantidad y la calidad del ADN obtenido por diferentes métodos de extracción son variables, convirtiéndose en un factor importante el tipo de método que se utilizará. Es por esto, que los métodos de extracción de ADN siguen algunos procedimientos comunes destinados a lograr una disrupción efectiva de las células, la desnaturalización de los complejos de núcleo proteínas, la eliminación de contaminantes biológicos o químicos y, finalmente, la precipitación del ADN (Ghaheeri, Kahrizi, Yari, Babaie, Suthar, & Kazemi 2016).

El método más simple y rápido para aislar ADN es el método de "*boiling*" que puede ser aplicado en bacterias. Este método emplea un *buffer* con una temperatura de 100°C a la cual se colocan bacterias; esto provoca una lisis celular y libera una cantidad suficiente de ADN para ser usado posteriormente en la PCR (Peng, Yu, Deng, Jiang, Wang, Zhang, & Zhou, 2013). El ADN extraído con este método no puede ser usado para otras aplicaciones como secuenciación o hibridación. Una alternativa al método de *boiling*, es el método

de fácil manejo Chelex-100, que consiste en hervir la muestra en un *buffer* en presencia de esta resina quelante de intercambio iónico. Este método es usado frecuentemente en medicina forense para el aislamiento de ADN de hisopos bucales, cabello y tarjetas de tinción de sangre (Walsh, Metzger, & Higuchi, 1991).

La lisis celular es el primer paso en la extracción de ADN, y se considera el más importante, ya que de este dependen los procedimientos posteriores de acuerdo con la cantidad de ADN obtenido (Thatcher & Ogonna, 2015). En general, esta se usa para romper la estructura celular, permitiendo así la separación del ácido nucleico deseado de los restos celulares (C. Zhou & Ling, 2011). La etapa de lisis varía de acuerdo con el material de trabajo, por lo que, una de las opciones durante esta etapa es la degradación enzimática. Usualmente se emplea la enzima proteinasa K, ya que aumenta la eficiencia de lisis y produce la inactivación de las nucleasas celulares como la ARNasa y ADNasa con la presencia de calor (d'Angelo, Santillo, Sevi, & Albenzio, 2007). Luego del paso de lisis, continúa el proceso de purificación del ADN, en donde se garantiza que se encuentre libre de inhibidores o contaminantes que puedan interferir con las técnicas que serán aplicadas luego de su obtención. En principio, existen dos métodos para purificar el ADN, la recolección del ADN en fase acuosa usando solventes orgánicos (extracción líquido-líquido), y el método de extracción en fase sólida empleando una matriz de sílice (Takić Miladinov, 2016).

Entre los métodos de extracción líquido-líquido se encuentra el método del bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) desarrollado por Doyle & Doyle (1987). Este método fue utilizado con éxito para extraer ADNg de alta calidad de una amplia variedad de fuentes, especialmente de plantas (Umesha, Manukumar, & Raghava, 2016). Otra forma de aislamiento de ADN se realiza mediante la separación de fases con el método de fenol-cloroformo descrito por Barker en 1998 (Pereira, Chaves, Bastos, Leitão, & Guedes-Pinto, 2011).

En cuanto a los métodos de aislamiento en fase sólida, en los años ochenta se desarrolló un método que llevaba el nombre de "glass milk". Este consistía en

una matriz basada en partículas de sílice (dióxido de silicón) usada para el aislamiento de ADN (J.-F. Li, Li, & Sheen, 2010), cuyo nombre comercial fue *GeneClean II* y fue usado para purificar fragmentos de ADN de geles de agarosa (Vogelstein & Gillespie, 1979). El aislamiento de ácidos nucleicos por esta técnica se realizaba en la presencia de compuestos caotrópicos que causaban la unión del ADN a las partículas de sílice facilitando la purificación, para después lavar con etanol (Seo, Sato, Kuroki, & Kishida, 2013) y posteriormente eluir de esta matriz en agua o en *buffer* Tris-EDTA (TE). Se ha demostrado que también se puede utilizar vidrio pulverizado para el aislamiento de ADN. El material de partida se obtiene de la molienda de los desechos de vidrio del laboratorio; siendo la sílice el componente principal del polvo de vidrio molido (Attal, Cajero-Juarez, & Houdebine, 1995). La extracción de ADN que utiliza polvo de vidrio es rápida (menos de 20 minutos para una muestra) y confiable. Entre las etapas de lavado se debe centrifugar para la formación de *pellet* entre la matriz y el ADN, para luego eliminar el líquido de lavar. El principio de aislamiento basado en la interacción de ácido nucleico con sílice se encuentra presente en las perlas magnéticas (*Magnetic Beads*), ya que están recubiertas con este material. En este método no se necesita centrifugar la muestra, debido a que el magneto lleva a las partículas con ADN contra la pared del tubo que se usa para aislarlo; por ende, permite descartar los líquidos que se usan en la purificación (Quy, Van, Hieu, Tra, Nam, Hai, Thai Son, Nghia, Anh, Hong, & Luong, 2013).

En los años noventa los kits de extracción de ácidos nucleicos fueron introducidos en el mercado y actualmente son la forma más popular para aislar ADN (El Bali, Diman, Bernard, Roosens, & De Keersmaecker, 2014). Entre ellos se encuentran los kits de extracción basados en columnas comerciales, como DNeasy (Qiagen, Australia) o Wizard (Promega, Australia). El principio de estos kits es similar a la extracción con sílice, con la diferencia de que usan un portador fijo (matrices de sílice), lo que permite lavar pasando las soluciones de lavado a través de la columna. El uso de columnas presentan ciertas desventajas debido a su alto precio y muchas veces se desconocen las soluciones que se emplean para purificar el ADN (Healey, Furtado, Cooper, & Henry, 2014).

1.2. Planteamiento del problema

En las últimas décadas se ha evidenciado un notable aumento en el desarrollo tecnológico para la extracción de ADN. En el mercado se encuentran disponibles varios sistemas de extracción de ácidos nucleicos listos para usar, y están adaptados para diferentes tipos de materiales de partida. La característica principal de los productos comerciales o kits es que son fáciles de usar, permiten obtener un ADN de alta calidad y de gran tamaño. Sin embargo, los kits comerciales son una opción costosa. Además, ciertos kits aíslan una menor cantidad de ADN debido a la superficie limitada de la columna y existe la posibilidad de que los fabricantes suspendan la comercialización de los productos (Yalçinkaya, Yumbul, Mozioglu, & Akgoz, 2017). Otro método que emplea resinas comerciales es el protocolo de Chelex-100, que aunque previene una contaminación cruzada al no usar múltiples tubos de transferencia, presenta mayor inestabilidad durante el almacenamiento a medio y largo plazo (Fernández-Soto, Velasco Tirado, Carranza Rodríguez, Pérez-Arellano, & Muro, 2013). Esto genera un consumo de tiempo y recursos en casos de necesidad de procesamiento de un alto número de muestras (Carpi, Di Pietro, Vincenzetti, Mignini, & Napolioni, 2011).

Actualmente, todavía se siguen usando métodos de extracción que usan químicos orgánicos como el fenol y el cloroformo, a pesar de conocer las desventajas que presenta el uso de estos métodos en cuanto a eficiencia, bajo rendimiento y la posibilidad de ruptura del ADN. Este tipo de métodos requieren trabajo y tiempo, y arrastran los inhibidores de la PCR, al extraerlos junto con el ADN (Wink, 2011). Finalmente, otro de los factores a considerarse es la naturaleza tóxica del fenol y el cloroformo, que continúa siendo una preocupación importante, pues se debe tener cuidado al manipular estos químicos (Hansen, Bruggeman, & Wolffs, 2013).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar 5 métodos de extracción de ADN, entre ellos dos métodos desarrollados “*in house*”

1.3.2. Objetivos específicos

- Comparar la cantidad y pureza del ADN extraído con métodos desarrollados “*in house*” *silica* y columnas de sílice, y los métodos de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, Chelex-100 y un kit comercial de columnas de sílice (Roche)
- Valorar la reproducibilidad de los métodos, medida en términos de pureza
- Confirmar la calidad y presencia de ADN amplificable de cada método mediante qPCR

1.4. Justificación

La disponibilidad de ADNg puro es la clave del éxito para la mayoría de los experimentos de biología molecular. Es por esto que continuamente, se realizan varias modificaciones de protocolos existentes y se generan nuevos procedimientos. Un buen procedimiento de extracción de ADNg debe ser rápido, barato y simple (no laborioso y peligroso), produciendo una buena cantidad de ADN intacto de pureza razonable utilizando pequeñas cantidades del material de partida (Agbagwa, Datta, Patil, Singh, & Nadarajan, 2012).

Además, los métodos de extracción no solo deben obtener ADN de manera eficiente, sino permitir la eliminación de inhibidores potenciales como las moléculas orgánicas e inorgánicas de los extractos. También deben minimizar las pérdidas de ácido nucleico a lo largo de las etapas de purificación, evitando la interferencia en los procesamientos posteriores.

En el presente trabajo se comparó el desempeño de 5 métodos de aislamiento de ADN. Dos métodos caseros desarrollados anteriormente con la aplicación de

partículas de vidrio o polvo de vidrio y columnas de sílice, junto con métodos tradicionales que aún se emplean en los laboratorios como fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI), Chelex-100 y un kit de columnas de sílice (kit Roche).

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1. Sangre como fuente de ADN

La sangre como muestra biológica es una de las fuentes más comunes para obtener ADN (Zhou, Wu, Zhao, Shen, Liu, Xu, & Jin 2015). Sin embargo, debido a la presencia de hemoglobina en los eritrocitos, el problema de la pureza es más crítico, ya que es un inhibidor fuerte de la Taq polimerasa. Apenas un 1 μ l de sangre que se encuentre en una reacción de 100 μ l puede inhibir completamente la PCR. Por lo tanto, es importante que el método de aislamiento elimine efectivamente la hemoglobina y otras proteínas contaminantes presentes en la muestra (Erlich, 2015).

Para la extracción de ADN, la sangre completa contenida en tubos Vacutainer con anticoagulantes, se fracciona por centrifugación en 3 componentes principales: plasma superior, capa lustrosa media que contiene leucocitos y capa inferior con eritrocitos (Boyd, Tennant, Melendez, Toema, Galen, Geddes, & Levine, 2015), como se muestra en la figura 1. La cantidad de glóbulos blancos/leucocitos en la sangre es muy variable entre las muestras. Existe una variación intraindividual conocida como variabilidad fisiológica. Este tipo de variabilidad puede ser estimulada por factores como la dieta, la medicación, la infección o la actividad. Esto puede causar un aumento o una disminución en la concentración de glóbulos blancos en el torrente sanguíneo, lo que causa diferencias en la concentración o el rendimiento del ADN extraído de estas células (Graziano, El-Mogy, & Haj-Ahmad, 2013).

Las muestras de la capa leucocitaria ofrecen una opción para purificar grandes cantidades de ADNg a partir de volúmenes de muestra relativamente pequeños; es por esto, que la extracción de ADNg de humanos u otros mamíferos se realiza normalmente a partir de los leucocitos de sangre periférica (Ji, Samper, Chen, Hui, Lye, Mustafa, Lee, Cong, Heng, & Lim, 2007). Para obtener mejores

resultados, la sangre debe ser almacenada a 4°C durante menos de 5 días o congelarse a -80°C el día de la recolección para períodos más prolongados (Song, Fahs, Feldman, Shah, Gu, Wang, Machado, Wunderink, & Chen, 2013).

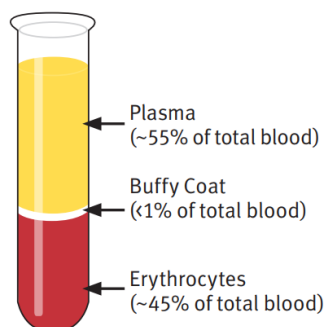


Figura 1. Muestra de sangre con anticoagulante fraccionada por centrifugación.

Tomado de (SP&A Application Laboratory, 2012).

La capa leucocitaria, que contiene la mayoría de los glóbulos blancos y las plaquetas, está situada entre el plasma y los eritrocitos.

2.2. Aislamiento de ADN a partir de sangre

Los primeros pasos durante el aislamiento de ADN a partir de sangre completa o de la capa leucocitaria son los mismos para la mayoría de los métodos de extracción. Primero se lisan los glóbulos rojos presentes en la muestra. En general, al añadir el mismo volumen de agua estéril se produce una lisis de estas células. Luego de transcurrir la etapa de lisis, la muestra se centrifuga y el sedimento (glóbulos blancos) es la partida de la extracción de ADN. La siguiente etapa consiste en digerir las proteínas presentes en la pared de las células, lo cual permite la liberación de ADN. Esta preparación cruda, que contiene ADN, proteínas, lípidos y otros contaminantes está lista para su purificación (Ghatak, Muthukumar, & Nachimuthu, 2013).

2.3. Métodos de aislamiento de ADN

2.3.1. Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI)

En este método, las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y los residuos celulares se eliminan mediante la extracción de ADN de la fase acuosa con la mezcla orgánica de fenol y cloroformo (Tan & Yiap, 2009).

El fenol-cloroformo-alcohol isoamílico se mezcla con la preparación cruda de ADN mediante vórtex, lo cual permite la desnaturalización de las proteínas que se disuelven en la fase orgánica (Nelson & Krawetz, 1992). Después de centrifugar se forma una capa acuosa superior que contiene ADN y una capa orgánica que contiene las proteínas precipitadas. En la etapa siguiente, para separar la fase acuosa, se utiliza una alta concentración de sal con etanol para precipitar el ADN, luego dos lavados de ADN precipitado con etanol. Finalmente, la muestra se resuspende en un *buffer* adecuado que contiene EDTA (Javadi, Shamaei, Mohammadi Ziazi, Pourabdollah, Dorudinia, Seyedmehdi, & Karimi, 2014). Ver figura 2.

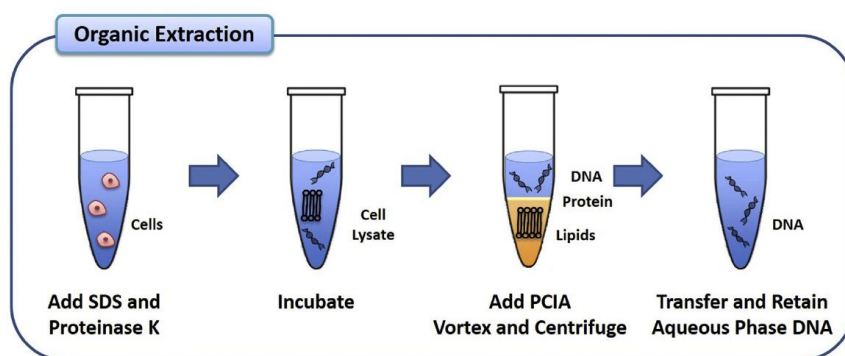


Figura 2. Extracción orgánica utilizando fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Tomado de (Patrinos, Ansorge, & Danielson, 2017).

El ADN se extrae de la fase acuosa, mientras que los lípidos y las proteínas se disuelven en la fase orgánica o en la interfaz orgánica.

2.3.2. Chelex-100

Chelex es una resina compuesta de polímeros de estireno-divinilbenceno que contienen iones iminodiacetato pareados que actúan en grupos quelantes en los iones metálicos polivalentes de unión. Tiene una alta selectividad para iones divalentes (Shewale & Liu, 2014). La extracción de ADN con Chelex-100 implica la incubación de la muestra con la suspensión de Chelex-100 y la ebullición para romper las células, liberando ADN (Vandewoestyne, Van Hoofstat, Franssen, Van Nieuwerburgh, & Deforce, 2013). La alta temperatura desnaturaliza el ADN y destruye las proteínas celulares. Los residuos celulares y la resina Chelex-100 se sedimentan por centrifugación, dejando el ADN monocatenario en el sobrenadante, como se observa en la figura 3. El protocolo de extracción de

Chelex-100 se puede llevar a cabo en un solo tubo, lo que reduce el riesgo de contaminación de la muestra. La utilidad de este método está limitada por el hecho de que solo el ADN monocatenario se recupera debido a las condiciones de desnaturalización de la extracción (Butler, 2005), por ende es apto únicamente para PCR.

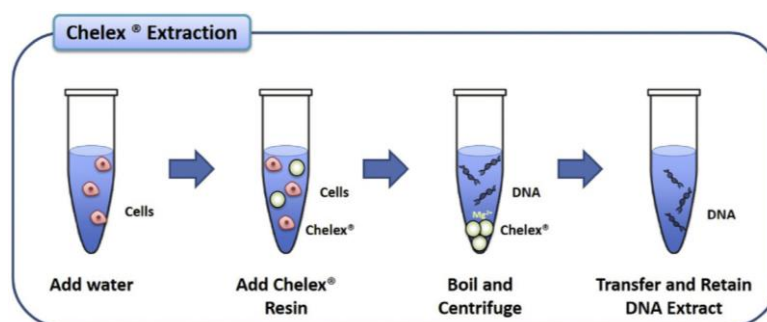


Figura 3. Extracción mediante resina quelante (Chelex-100).

Tomado de (Patrinos, Ansorge, & Danielson, 2017).

El ADN se libera al hervir e inactivar las enzimas degradantes, al quelar los cationes divalentes esenciales, como el Mg^{2+} .

2.3.3. Kit de extracción High Pure PCR Template Preparation (Roche)

Este tipo de extracción se basa en la metodología de columnas de sílice. Las células o el tejido sanguíneo se lisan mediante una corta incubación con un tampón de lisis especial en presencia de la sal caotrópica guanidina-HCl y proteinasa K, que inactiva inmediatamente todas las nucleasas. Después de una incubación a $60^{\circ}C$, la suspensión pasa por una columna con un filtro de sílice. Los ácidos nucleicos celulares se unen selectivamente a las fibras de vidrio especiales pre-empaquetadas en el tubo de filtro de purificación (Smith, Diggle, & Clarke, 2003). El ácido nucleico unido se purifica en una serie de pasos rápidos de lavado con NaCl, Tris-HCl y etanol y se centrifuga para eliminar los componentes celulares contaminantes. Finalmente, se eluye el ADN de la membrana de sílice con agua pura o un *buffer* bajo en sales. Este método elimina la necesidad de extracciones con disolventes orgánicos y precipitación de ADN (Podnecky, Elrod, Newton, Dauphin, Shi, Chawalchitiporn, Baggett, Hoffmaster, & Gee 2013).

2.3.4. Columnas de sílice

El principio de las columnas con matriz de sílice está basado en una fase sólida que absorbe el ácido nucleico dependiendo del pH y el contenido de sal del *buffer* (Esser, Marx, & Lisowsky, 2005). Las columnas de sílice se encuentran comercialmente disponibles.

El paso inicial en un proceso de extracción en fase sólida empieza una vez que la muestra se haya lisado utilizando el tampón correspondiente sobre la columna. El ácido nucleico deseado se absorbe en la columna con la ayuda de una solución de unión que contiene un alto pH y concentración de sal. Otros compuestos, como la proteína, también pueden tener un fuerte enlace específico con la superficie de la columna. Estos contaminantes se pueden eliminar en la etapa de lavado utilizando un tampón que contiene un agente competitivo. Para la etapa de elución, se introduce el tampón TE o el agua para liberar el ácido nucleico deseado de la columna, de modo que pueda recogerse en un estado purificado (Gjerde, Hoang, & Hornby, 2009). Ver figura 4.

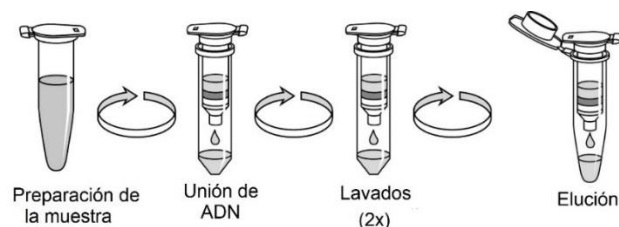


Figura 4. Purificación de ADN en minicolumna.

Adaptado de (MACHEREY-NAGEL, S.F).

Método de extracción de ADN en fase sólida en el que el ADN se une a la columna de sílice. Posteriormente, el ADN se eluye utilizando un tampón de elución adecuado.

2.3.5. Silica

El método de partículas de vidrio de *silica* se basa en la unión del ADN a la superficie del sustrato (*silica*) en presencia de una alta concentración de sal. Las sales caotrópicas se usan para lisar las células antes de la extracción del ácido nucleico y también permiten la eliminación de las proteínas histonas del ADN y inactivan las nucleasas (Boyle & Lew, 1995). La *silica* se puede lavar

repetidamente, ya que las partículas de vidrio retienen el ADN unido y permiten la eliminación de otros inhibidores presentes en la muestra (Rothe & Nagy, 2016). Este método recupera el ADN de alto peso molecular y, por lo tanto, no puede recuperar moléculas de ADN de las muestras que están presentes en una forma altamente fragmentada (<100 pb) (Kemp, Winters, Monroe, & Barta, 2014).

A medida que disminuye la concentración de sal, el etanol se agrega a la solución de lavado para retener el ácido nucleico en la *silica* y eliminar compuestos que puedan interferir con los procesos posteriores (Haydock & Barker, 2012). Ver figura 5.

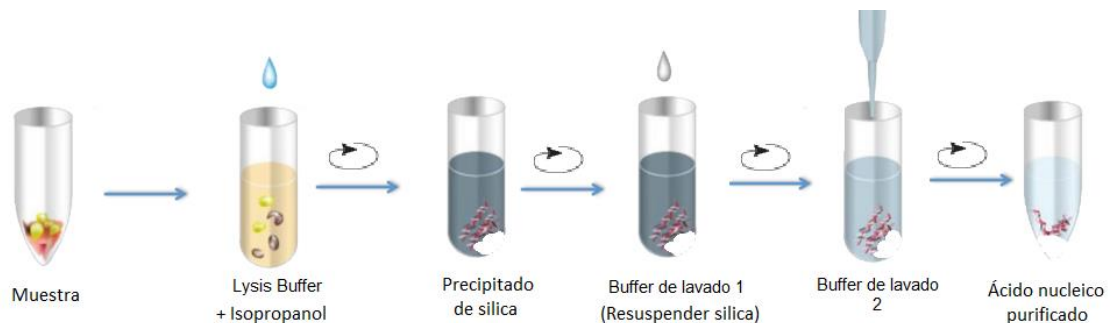


Figura 5. Flujo de trabajo de extracción de ADN mediante el uso de *silica*. Modificado de (Noki Technologies, S.F).

2.3.6. Determinación de la cantidad y calidad de ADN aislado

Después del aislamiento de ADN, es necesario realizar un control de calidad en cuanto al tamaño de los fragmentos aislados, cantidad y pureza. Los métodos comúnmente utilizados para medir la concentración de ADN se realizan a través de un gel de agarosa (electroforesis) y las mediciones de absorbancia UV (espectrofotometría UV) (Sedlackova, Repiska, Celec, Szemes, & Minarik, 2013).

2.3.6.1. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel se usa rutinariamente para la detección y análisis del tamaño de proteínas y ácidos nucleicos (Drabik & Bodzoń-Kułakowska, 2016). La separación mediante este método utiliza una corriente eléctrica para

propulsar biomoléculas cargadas a través de una matriz de gel poroso a una velocidad en función de la carga, el tamaño y la forma de las moléculas (Sanderson, Araki, Lilley, Guerrero, & Lewis, 2014). El porcentaje de agarosa dependerá del tamaño del ácido nucleico que desee visualizar, por lo que el rango de separación lineal variará (Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012).

Cargar el ADN en un gel de agarosa y separarlo mediante la aplicación de voltaje adecuado, permite determinar la cantidad de ADN y el tamaño de los fragmentos aislados. La intensidad de la banda se evalúa en un gel de agarosa y se compara con un estándar de ADN de concentración conocida (Shokere, Holden, & Ronald Jenkins, 2009). Tamaños grandes sirven para la clonación de ADN, tamaños pequeños casi siempre sirven para una PCR (Kuhn, Böllmann, Krahl, Bryant, & Martienssen, 2018).

2.3.6.2. Espectrofotometría UV

La medición espectrofotométrica es la herramienta analítica más popular en el campo del análisis de una variedad de compuestos tanto en mezclas simples como complejas (Ahmad Bhawani, Fong, & Mohamad Ibrahim, 2015). La espectroscopía UV se utiliza para evaluar la pureza del ADN midiendo el espectro de absorbancia de una muestra entre 200 y 320 nm, y calculando las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . La cantidad de ADN (concentración) y la calidad (pureza e integridad) varían según el tipo de célula y el método de extracción de ADN (Olson & Morrow, 2012).

Los ácidos nucleicos absorben la luz a 260 nm a través de los residuos de adenina. Las proteínas absorben la luz a 280 nm a través de los residuos de triptófano, mientras que el fenol absorbe la luz ultravioleta a 270-275 nm (Khare, Raj, Chandra, & Agarwal, 2014). Una unidad de absorbancia en longitud de onda de 260 nm es equivalente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de doble hebra (Gallagher, 2001).

2.3.7. PCR en tiempo real (qPCR)

La PCR puede ser usada para determinar la calidad de ADN midiendo la cantidad de ADN amplificable en una preparación y relacionando con la cantidad de ADN aislado. Esto se puede lograr con una PCR convencional para luego determinar el producto en un gel de agarosa y medir la cantidad mediante espectrofotometría. Un método más rápido es con qPCR (Garibyan & Avashia, 2013).

El colorante fluorescente SYBR Green I posee la propiedad de ser un sistema de detección en qPCR independiente de la secuencia, debido a su capacidad para unirse a todas las moléculas de ADN de doble cadena; por lo tanto, al usar como tinte SYBR Green I en la reacción de PCR se simplifica el diseño experimental y se puede usar para amplificar un determinado gen (De Preter, Speleman, Combaret, Lunec, Laureys, Eussen, Francotte, Board, Pearson, De Paepe, Van Roy, & Vandesomepele, 2002).

En la qPCR la fluorescencia se mide después de cada ciclo y la intensidad de la señal fluorescente refleja la cantidad momentánea de amplicones de ADN en la muestra en ese momento (Broeders, Huber, Grohmann, Berben, Taverniers, Mazzara, Roosens, & Morisset, 2014). En los ciclos iniciales, la fluorescencia es demasiado baja para poder distinguirla del fondo. Sin embargo, el punto en el que la intensidad de fluorescencia aumenta por encima del nivel detectable corresponde proporcionalmente al número inicial de moléculas de ADN de plantilla en la muestra. Este punto se denomina ciclo de cuantificación (C_q) y permite la determinación de la cantidad absoluta de ADN objetivo en la muestra según una curva de calibración construida con muestras estándar diluidas en serie concentraciones conocidas o números de copias (Kralik & Ricchi, 2017; McKiernan & Danielson, 2017).

3. Capítulo III. Procedimientos

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Recepción de muestras de sangre

Para este estudio se utilizaron muestras de sangre de bovinos de raza Jersey; este material se recibió de otro estudio que se encuentra realizando en la UDLA. La muestra de sangre periférica (entre 8 a 10 ml) se recibió en tubos BD Vacutainer con EDTA K2.

3.1.2. Aislamiento de capa leucocitaria libre de eritrocitos

Cada tubo Vacutainer se centrifugó durante 10 minutos a 2100 x g (34000 rpm) para separar la capa leucocitaria. A continuación, la capa leucocitaria separada se transfirió a un microtubo de 1,5 ml y se agregó 1 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH-8) para lisar los glóbulos rojos, luego se centrifugó a 10.000 x g durante 20 segundos para la formación de *pellet* con la presencia de glóbulos blancos. Este procedimiento se realizó dos veces y el sedimento se resuspendió con 350 µl de tampón TE.

3.1.3. Preparación de muestras para cada método

Al tubo que contenía los 350 µl de leucocitos en TE se añadió 10 µl de Proteinasa K (20 mg/µl) (Sigma, EE. UU.) y SDS hasta una concentración final de 0.5%; luego, se incubó durante toda la noche a 56°C. Después de la incubación, se resuspendió la solución homogénea y se tomaron 3 veces 100 µl de cada muestra y se colocaron en 3 microtubos (1.5 ml) para garantizar una muestra homogénea con suficiente material para ser usado en tres métodos de aislamiento de ADN.

3.1.4. Método con *silica*

3.1.4.1. Preparación de *silica*

Se preparó polvo fino de *silica* con pipetas Pasteur de laboratorio limpias y rotas, con la ayuda de un mortero se trituraron las pipetas hasta que se obtuvo un polvo fino. El polvo se colocó en un tubo falcon (50 ml) hasta la marca gradual de 10

ml y se llenó el tubo con agua hasta la marca de 50 ml, se agitó mediante vórtex para suspender el polvo de *silica* por 2 minutos y se dejó sedimentar durante 15 minutos. Luego, se recogió los primeros 25 ml del sobrenadante y se trasladó a otro tubo falcon; se evitó tomar los 25 ml de la capa baja ya que contiene las partículas de polvo de *silica* más grandes. Este procedimiento se repitió tres veces.

El polvo fino de *silica* se centrifugó a 4000 x g durante 5 minutos y se eliminó el agua. El sedimento de *silica* se secó durante la noche a 50°C. Se pesó el tubo y se calculó el rendimiento de las partículas de *silica* (peso del tubo vacío - el peso del tubo con partículas de sílice). También se puede usar *silica* comercial (S5631 Sigma. *Silicon dioxide* 0,5-10 µm).

3.1.4.2. Extracción de ADN con *silica*

Todo el procedimiento se realiza en un solo microtubo. Se agregó 100 µl de tampón TE en el microtubo que contiene 100 µl de la capa leucocitaria. Después, se añadió 240 µl de *Lysis Buffer* (40 mg de *silica* por ml en 6 M Guanidina-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100 (v/v), pH 4.4) se mezcló bien y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente; seguidamente se adicionaron 100 µl de isopropanol, se mezcló bien y se centrifugó a 5.000 x g durante 10 segundos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 µl de *Buffer* de lavado 1 (5 M Guanidina-HCl, 20 mM Tris HCl, pH 7.5), se realizó un breve vórtex y se centrifugó a 5.000 x g durante 1 minuto. Luego, se lavó la *silica* con 500 µl de *Buffer* de lavar 2 (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5) (este procedimiento se realizó dos veces). Se eliminó completamente el *Buffer* de lavado 2 y el ADN precipitado junto con la *silica* se secó a 56°C durante 10 minutos. Se resuspendió la *silica* en 200 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) y se eluyó el ADN a 65°C durante 10 minutos. La muestra se almacenó a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 segundos y se determinó la concentración y pureza del ADN en el equipo *Nanodrop 2000 Thermo Scientific*.

3.1.5. Extracción de ADN con columnas de sílice

Para este método se emplearon columnas adquiridas comercialmente marca *Ecospin*, *Epochlife Science*. Las soluciones que se aplicaron para purificar el ADN son las mismas que se emplearon en el método de partículas de *silica*. Se añadió 100 µl de TE a un microtubo de 1,5 ml donde se encuentra 100 µl de la muestra de capa leucocitaria. Se añadió 240 µl de *Lysis Buffer* (6 M Guanidina-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100 (v/v), pH 4.4), se mezcló por vórtex y se incubó durante 10 minutos; luego, se agregó 100 µl de isopropanol y se mezcló. El líquido se transfirió a la parte superior del *spin column* y se centrifugó a 8000 x g durante 1 minuto. Después se retiró el tubo de filtro del tubo de colección y se desechó el líquido, el tubo de filtro se volvió a colocar dentro del tubo de colección y se agregó 500 µl de *Buffer* de lavado 1 (5 M Guanidina-HCl, 20 mM Tris HCl, pH 7.5) al tubo de filtro y se centrifugó a 8000 x g durante 1 minuto. El tubo del filtro fue removido para desechar el líquido y luego se regresó el tubo de filtro a su lugar. Para los lavados se agregó 500 µl de *Buffer* de lavado 2 (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5) (este procedimiento se realizó dos veces), se centrifugó a 8000 x g durante 1 minuto. Después, se eliminó el líquido del tubo colector y se centrifugó a velocidad máxima durante 10 segundos para eliminar los remanentes de *Buffer* de lavado 2. El tubo colector se descartó y el tubo de filtro se colocó en un microtubo estéril de 1,5 ml; para eluir el ADN del filtro se añadió 200 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH-8) precalentado (70°C) se centrifugó a 8000 x g durante 1 minuto. Por último, el ADN extraído se cuantificó en el equipo *Nanodrop 2000 Thermo Scientific*.

3.1.6. Extracción de ADN con el Kit de extracción High Pure PCR

Template Preparation (Roche)

Se siguió el protocolo establecido por el fabricante. Se añadió 100 µl de TE a un microtubo de 1.5 ml donde se encuentra 100 µl de la muestra de capa leucocitaria, se añadió 240 µl de *Binding Buffer*, se incubó durante 10 minutos; luego, se agregó 100 µl de isopropanol. Esta mezcla se carga en la columna y

se centrifuga. Para la etapa de lavados, primero se usaron 500 µl de *Inhibitor Removal Buffer* y para el segundo lavado se agregó 500 µl de *Washing Buffer*; después para eluir el ADN se añadió 200 µl de *Elution Buffer* precalentado (70°C). Finalmente, el ADN extraído se cuantificó en el equipo *Nanodrop 2000 Thermo Scientific*.

3.1.7. Extracción de ADN con Chelex-100

Al microtubo que contiene la capa leucocitaria se añadió 300 µl de Chelex-100 (Bio-Rad) al 10% y se mezcló bien mediante vórtex. Seguidamente, se colocó el microtubo en el termobloque a 95°C durante 8 minutos, para luego centrifugar el microtubo a 10.000 rpm durante 2 minutos. Finalmente se transfirió el sobrenadante que contiene el ADN (350 µl) a un nuevo microtubo. El ADN extraído se cuantificó en el equipo *Nanodrop 2000 Thermo Scientific*.

3.1.8. Extracción de ADN con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (PCI)

Se añadió 100 µl de tampón TE al microtubo que contiene la capa leucocitaria. Luego, se agregó 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló por inversión y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se extrajo y se trasladó a un nuevo microtubo; se colocó un volumen igual de PCI (25:24:1), se mezcló bien por inversión y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo y se añadió la misma cantidad de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos. Se trasladó el sobrenadante a un microtubo nuevo y se añadió 2.5 veces de etanol al 100% y el 10% de cloruro de sodio (NaCl) 2M del volumen de la muestra, se mezcló el microtubo por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se secó al aire a 65°C durante 10 minutos. El precipitado de ADN_g se resuspendió en 200 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH-8). La muestra se almacenó a 4°C durante toda la noche y se determinó la concentración y pureza del ADN en el equipo *Nanodrop 2000 Thermo Scientific*.

3.2. Evaluación de la cantidad, calidad e integridad del ADN extraído

3.2.1. Cuantificación del ADN

La cantidad de ADN se determinó con la absorción a 260 nm donde la densidad óptica (OD) de 1.0 es equivalente a 50 ug/ml de ADN. También se mide la absorción a 280 nm y a 230 nm para determinar la presencia de contaminantes. La absorción utilizada de 260-280 nm debe estar dentro del rango de 1.6-2.0 para que el aislamiento sea óptimo en términos de pureza. Las soluciones que tienen esta relación por debajo de 1.6 están contaminadas por proteínas o fenol; en cambio, si la relación de 260-280 nm es mayor a 2, es el resultado de contaminación por ARN (Mohammadi G & Saberivand A., 2009). Mientras que la relación 260-230 nm, el rango aceptado es de 2.0 a 2.2, los valores por debajo de este rango pueden indicar contaminación por fenol, sal, proteína o polisacáridos (Desjardins & Conklin, 2010).

3.2.2. Electroforesis en gel

La integridad y el tamaño del ADN extraído por cada método se evaluó mediante electroforesis en gel. Específicamente, se analizó 10 µl de cada extracto de ADN en un gel de agarosa al 1,5% que contenía *Safe View* con tampón TBE 0,5X y se visualizó mediante iluminación UV.

3.2.3. PCR en tiempo real

La presencia de ADN amplificable se evaluó en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX384™ (Bio-Rad *Laboratories*, Inc.). La amplificación se realizó en un volumen de reacción de 25 µl que contenía 12.5 µl de iQ SYBR Green (Bio-Rad). La supermix contiene 50 U/ml de ADN polimerasa iTaq, 0.4 mM de cada dNTP, 6 mM mgCl₂, 40 mM Tris-HCl pH 8.4, 100 mM KCl, 20 nM fluoresceína y estabilizadores (Bio-Rad), 10 µl (50 ng) de ADN y 0.5 µl (10 µM) de cebadores del gen de la proteína de la leche bovina *Kappa caseína K-casein-Forward* 5'CACGTCACCCACACCCACATTTATC3' y *K-casein-Reverse* 5'TAATTAGCCCATTTTCGCCTTCTCTGT3' (M. Gouda, Kh. Galal, & A. Abdelaziz, 2013). Se aplicaron los siguientes parámetros de amplificación: una

desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, 60 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, hibridación a 60°C durante 30 segundos, extensión a 95°C durante 5 segundos y una extensión final a 95°C durante 5 segundos. Al finalizar los ciclos de amplificación, se produjo la curva de fusión a una temperatura a 65°C durante 5 segundos con un incremento de temperatura de 0.5 grados hasta alcanzar una temperatura de 95°C. Además, los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 15 minutos usando tinción con *Safe View* (abm).

3.2.4. Evaluación estadística de los resultados

Cada método de aislamiento fue repetido 3 veces con 10 soluciones de capa leucocitaria. Se midió la concentración de ADN, la pureza a través de dos mediciones espectrofotométricas (O.D. A260/A280, O.D. A260/A230) y la reproducibilidad, de 5 métodos de extracción.

Para evaluar si hubo cambios significativos en los resultados obtenidos aplicando los tres métodos de laboratorio en una misma muestra, se utilizaron las pruebas estadísticas de muestras relacionadas, ANOVA de medidas repetidas y la prueba no paramétrica de Friedman. Para evaluar la reproducibilidad entre los métodos con diferentes muestras se utilizaron las pruebas estadísticas de muestras no relacionadas, ANOVA y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se utilizaron ambos modelos de análisis paramétrico y no paramétrico debido a que el tamaño pequeño de la muestra no permite ni admitir ni rechazar que los datos siguen una distribución conocida.

Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico JASP 0.9.2.0 (interfaz basada en R). Todos los análisis se hicieron con un nivel de confianza del 95%. Se aceptó una significancia estadística para todo el análisis con un valor p inferior a 0.05.

4. Capítulo IV. Resultados y discusión

4.1. Extracción de ADN de diferentes muestras

Se usaron 50 muestras de capa leucocitaria, las cuales se dividieron en cinco lotes de diez muestras respectivamente; en todos los lotes se realizó un tratamiento previo con proteinasa K (20 mg/ml), 0.5% SDS y 20 μ l de TE, para así obtener una solución homogénea de aproximadamente 400 μ l. La combinación de proteinasa K y SDS permite mejorar el rendimiento de los métodos de extracción de ADN y afirman que la etapa de pretratamiento produce mejores resultados que la extracción directa (Sidorova, Biderman, Nikulina, & Sudarikov, 2012).

Los extractos se dispensaron en tres alícuotas de un solo uso de 100 μ l y se congelaron a -20 °C para evitar la repetición de congelación y descongelación antes de los análisis posteriores, como se muestra en la figura 6. En cada lote se aplicaron tres diferentes métodos, lo que garantizó que cada método de extracción se repita 3 veces sobre 10 diferentes muestras.

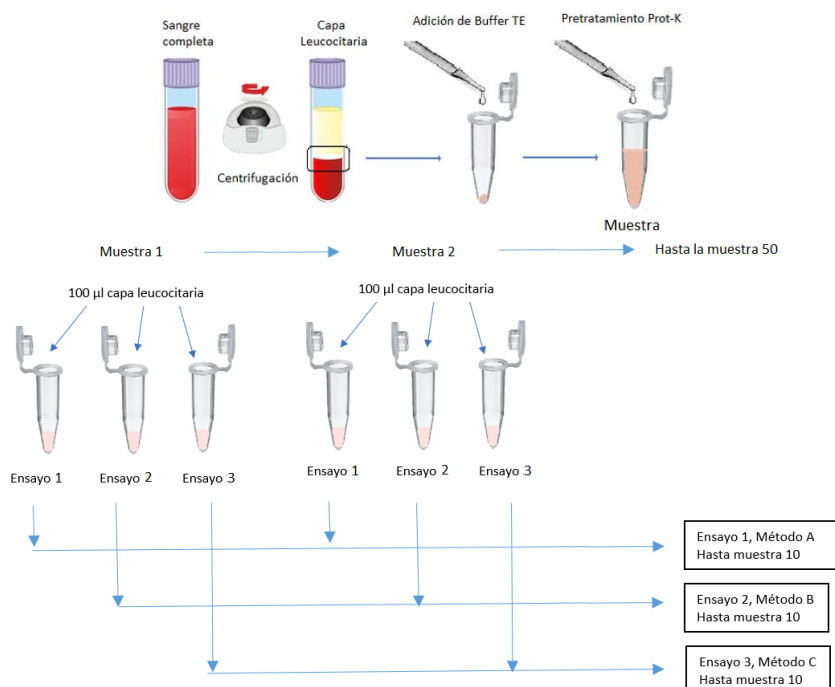


Figura 6. Separación de la capa leucocitaria, pretratamiento y distribución.

Colocación de las muestras sobre los 5 métodos de extracción (A, B, C, D, E), 50 muestras fueron divididas en 3 alícuotas, un total de 150 muestras. En grupos de 10 fueron extraídos con método ABC, BCD, CDE, DEA, EAB.

4.2. Comparación de la cantidad y pureza de ADN utilizando cinco métodos

Para evaluar los diferentes métodos se analizaron: 1) la cantidad de ADN aislado (rendimiento), 2) pureza a través de la relación A260/A280 y A260/A230 (sección 4.1), y 3) la reproducibilidad de cada método (sección 4.3).

En resumen, como se explicó en la sección 4.1, se emplearon 5 lotes con 10 preparaciones de capa leucocitaria. Cada lote fue evaluado con 3 métodos de extracción en una manera que cada método se empleó con tres lotes diferentes. En el lote 1 (3 veces 10 preparaciones de capa leucocitaria) se evaluaron tres métodos *silica*, kit Roche y Chelex-100. Con el lote 2 se evaluaron los métodos kit Roche, Chelex-10 y PCI; en el lote 3 se utilizó PCI, Chelex-100, y columnas de sílice; para el lote 4 los métodos aplicados fueron PCI, columnas de sílice y *silica*; por último, en el lote 5 se usaron columnas de sílice, *silica* y el kit de Roche, como se observa en la tabla 1.

Tabla 1.

Distribución de los métodos de aislamiento aplicados a 10 preparaciones de leucocitos, anteriormente tratados con proteinasa K y homogenizados.

Lotes	Distribución de métodos				
Lote 1	A	B	C		
Lote 2		B	C	D	
Lote 3			C	D	E
Lote 4	A			D	E
Lote 5	A	B			E

Nota: A=silica, B= kit Roche, C= Chelex-100, D= PCI, E= columnas de sílice.

En los anexos 1-5, se resumen las concentraciones de ADN y los valores de pureza obtenidos en las relaciones A260/A280 y A260/A230 correspondiente a las muestras de ADN extraídos en cada lote con los diferentes métodos.

Para evaluar si existen diferencias significativas en los métodos de extracción, en cuanto a la concentración de ADN, se realizaron las pruebas ANOVA de medidas repetidas y la prueba no paramétrica de Friedman. A pesar de que se

utilizaron dos métodos, un paramétrico y un no paramétrico, se obtuvieron resultados similares.

Lote 1. Extracción con *silica*, kit Roche y Chelex-100. Las diferencias entre los valores obtenidos por los tres métodos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$) basados en la prueba de Friedman.

El kit de Roche demostró ser el método con mejor desempeño en pureza de acuerdo con la relación A260/A280, pero presentó menor desempeño en cuanto a la cantidad de ADN. Sin embargo, en la relación A260/A230 los valores no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto de *silica* ($p = 1.00$) que tuvo un mejor desempeño en cuanto a la concentración del ADN. Los métodos de *silica* y Chelex-100 aislaron altas cantidades de ADN y no presentaron diferencia significativa entre los mismos ($p = 1.00$); además, obtuvieron valores más bajos en la absorbancia A260/A280. La pureza varía en *silica* siendo la más baja en la relación A260/A280, pero puede llegar a ser la segunda mejor en la relación A260/A230 y puede equipararse con el valor obtenido por el kit de Roche, como se muestra en la tabla 2 y figura 7.

Tabla 2.

Resumen de concentración (ng/μl) y pureza (A260/A280 y A230/A280) del ADNg de capa leucocitaria según cada método probado.

Lote 1									
Método	Concentración de ADN (ng/μl)			A260/A280			A260/A230		
	Media	DS	Rango	Media	DS	Rango	Media	DS	Rango
<i>Silica</i>	50.31	14.91	30.30 - 76.23	1.49	0.14	1.27 - 1.70	1.73	1.01	0.60 - 3.65
Kit Roche	30.96	20.01	10.40 - 74.90	1.82	0.05	1.72 - 1.93	2.04	0.19	1.69 - 2.27
Chelex- 100	49.73	22.33	22 - 86.65	1.56	0.18	1.34 - 1.90	0.28	0.07	0.17 - 0.36

Nota: DS= desviación estándar

Kit	37.64	26.7	13.23 –	1.98	0.0	1.88 – 2.15	2.12	0.1	1.88 –
Roche		0	92.73		8			4	2.28
Chelex-	57.87	32.3	29.27 –	1.59	0.2	1.15 – 2.06	0.21	0.0	0.14 –
100		6	135.73		9			6	0.33
PCI	12.45	17.1	2.97 – 58.95	3.01	3.2	1.85 –	1.35	0.4	0.69 –
		8			2	12.18		2	1.89

Nota: DS= desviación estándar

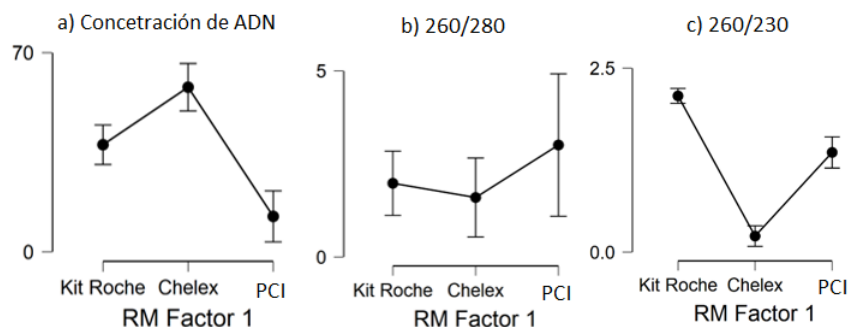


Figura 8. Comparación de diferentes métodos con el mismo lote de muestras.

Representación de las medias de: a) concentración de ADN, b) relación A260/A280 y c) relación A260/A230 según los métodos de kit Roche, Chelex-100 y PCI. Las barras representan los intervalos de confianza al 95%.

Lote 3. Extracción con Chelex-100, PCI y columnas de sílice. La concentración de ADN obtenida en todos los métodos ($p = 0.003$) presentó diferencias significativas, mientras que las relaciones A260/A280 ($p = 0.301$) y A260/A230 ($p = 0.061$) no presentaron diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Friedman.

La resina Chelex-100 demostró ser el método con mejor desempeño en la concentración de ADN. En comparación con PCI presentó diferencia significativa ($p = 0.003$). Sin embargo, en las relaciones de pureza A260/A280 y A260/A230 resultó ser el más bajo. Los métodos PCI y columnas de sílice no presentaron una diferencia estadísticamente significativa, tanto en la concentración de ADN como en las relaciones de pureza ($p = 1.00$) de acuerdo a la prueba de Bonferroni. Ambos métodos, presentaron un intervalo de confianza mayor en cuanto a pureza. Ver tabla 4 y figura 9.

Las bajas relaciones A260/A230 presentes dentro de este lote (tabla 4) para el ADN extraído, pueden deberse a la presencia contaminantes de origen

desconocido, que absorbe fuertemente a 230 nm. Además, las relaciones de pureza también pueden verse afectadas por el pH y la fuerza iónica del eluyente de ADN (M. Neary, J. Neary, Lund, Garry, Holt, Mohun, & Breckenridge 2014).

Tabla 4.

Resumen de concentración (ng/μl) y pureza (A260/A280 y A230/A280) del ADN_g de capa leucocitaria según cada método probado.

Lote 3									
Método	Concentración de ADN			A260/A280			A260/A230		
	(ng/μl)								
	Media	DS	Rango	Media	DS	Rango	Media	DS	Rango
Chelex-100	44.50	21.9 2	13.20 - 95.50	1.73	0.3 6	1.20 - 2.23	0.19	0.0 4	0.13 - 0.29
PCI	9.97	12.7 6	2.25 - 43.20	2.27	0.7 0	0.15 - 2.44	1.06	0.3 9	0.61 - 1.89
Columnas de sílice	14.29	12.2 0	0.27 - 34.13	1.86	0.4 0	0.88 - 2.33	1.50	2.3 8	-1.40 - 6.10

Nota: DS= desviación estándar

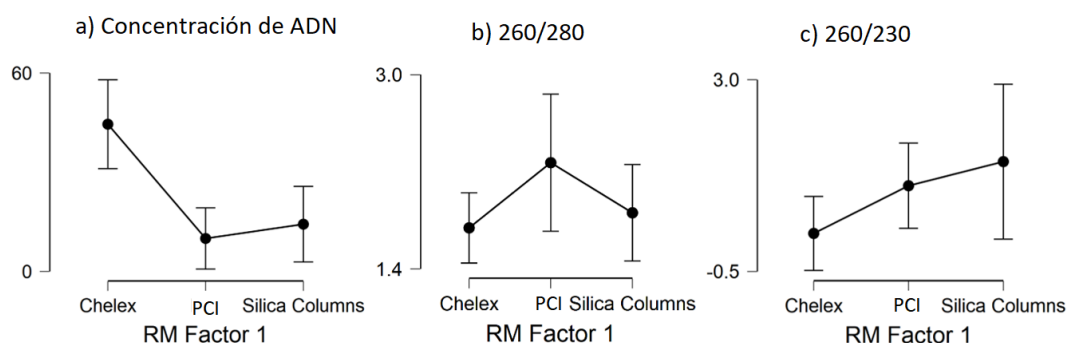


Figura 9. Comparación de diferentes métodos con el mismo lote de muestras.

Representación de las medias de: a) concentración de ADN, b) relación A260/A280 y c) relación A260/A230 según los métodos de Chelex-100, PCI y columnas de sílice. Las barras representan los intervalos de confianza al 95%.

Lote 4. Extracción con columnas de sílice, sílica y kit Roche. Los valores obtenidos por los tres métodos en la concentración de ADN y las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.467$, $p = 0.373$ y $p = 0.242$) respectivamente, según la prueba no paramétrica de Friedman.

El método de *silica* tuvo mejor desempeño en la concentración del ADN y presentó diferencia significativa con el kit de Roche ($p = 0.022$); mientras que, en la relación A260/A280, el kit de Roche obtuvo el mejor desempeño con valores que se encuentran dentro del rango óptimo (sin la presencia de proteínas), presentando diferencia significativa con *silica* ($p < 0.001$). En cambio, para la relación A260/A230 debido a la variabilidad de los datos todos los métodos se vieron afectados en el ancho del intervalo de confianza pudiendo dar un resultado menos preciso, como se muestra en la tabla 5 y figura 10.

Tabla 5.

Resumen de concentración (ng/μl) y pureza (A260/A280 y A230/A280) del ADNg de capa leucocitaria según cada método probado.

Lote 4									
Método	Concentración de ADN (ng/μl)			A260/A280			A260/A230		
	Media	DS	Rango	Media	DS	Rango	Media	DS	Rango
	Columnas de sílice	19.27	17.71	2.75 - 65.27	1.76	0.24	1.17 - 2.03	1.92	1.66
<i>Silica</i>	43.88	8.2	36.30 - 59.40	1.65	0.05	1.59 - 1.74	2.43	0.84	1.75 - 4.64
Kit Roche	25.60	16.00	3.85 - 60.37	1.84	0.07	1.66 - 1.91	3.32	1.73	1.99 - 7.99

Nota: DS= desviación estándar

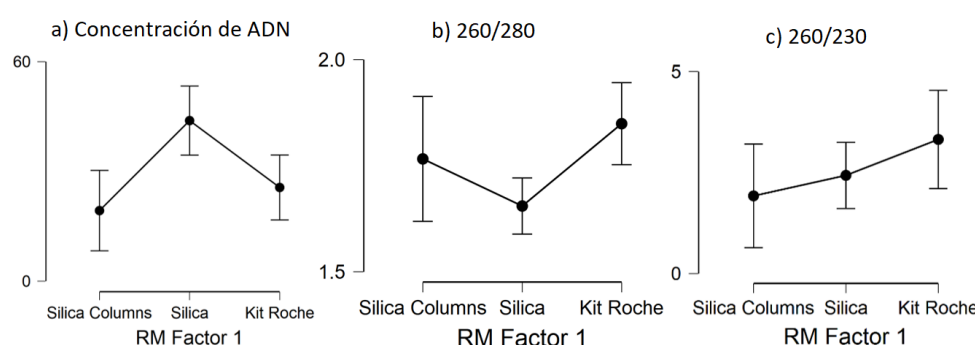


Figura 10. Comparación de diferentes métodos con el mismo lote de muestras.

Representación de las medias de: a) concentración de ADN, b) relación A260/A280 y c) relación A260/A230 según los métodos de columnas de sílice, *silica* y kit Roche. Las barras representan los intervalos de confianza al 95%.

Lote 5. Extracción con *silica*, PCI y columnas de sílice. Los valores obtenidos por los tres métodos presentaron diferencias significativas en la concentración

de ADN y la relación A260/A280 ($p < 0.001$); mientras que, en la relación A260/A230 no se evidencia diferencia significativa ($p = 0.905$) según la prueba no paramétrica de Friedman.

Silica demostró ser el método con mejor desempeño en la concentración del ADN y presentó diferencia significativa con el método de PCI ($p < 0.001$), el cual es el más bajo estadísticamente. Para la relación A260/A280 el método de PCI posee valores que se encuentran en el rango óptimo (sin la presencia de proteínas), presentó diferencia estadísticamente significativa de *silica* ($p < 0.001$) y puede equipararse al valor obtenido con las columnas de sílice. Los resultados obtenidos para la relación A260/A230, presentan una gran heterogeneidad que se ve representada en el tamaño de los intervalos de confianza, como se muestra en la tabla 6 y figura 11.

Tabla 6.

Rangos de concentración (ng/μl) y pureza (A260/A280 y A230/A280) del ADNg de capa leucocitaria según cada método probado.

Lote 5									
Método	Concentración de ADN (ng/μl)			A260/A280			A260/A230		
	Media	DS	Rango	Media	DS	Rango	Media	DS	Rango
<i>Silica</i>	49.39	20. 86	28.57 – 94.20	1.47	0.1 6	1.15 – 1.72	1.76	1.6 3	0.43 – 5.96
PCI	13.88	16. 66	0.87 – 55.50	1.83	0.1 1	1.61 – 1.98	1.49	0.5 6	0.41 – 2.04
Columnas de sílice	29.31	21. 15	1.40 – 66.17	1.79	0.2 1	1.44 – 2.14	6.91	18. 87	-3.97 – 59.52

Nota: DS= desviación estándar

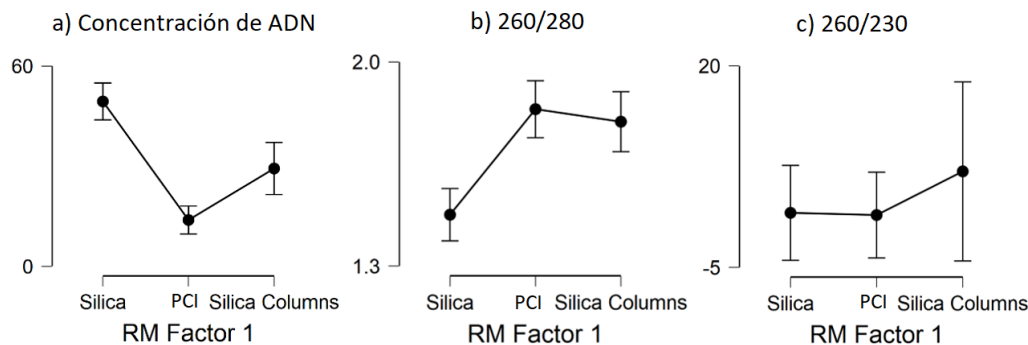


Figura 11. Comparación de diferentes métodos con el mismo lote de muestras.

Representación de las medias de: a) concentración de ADN, b) relación A260/A280 y c) relación A260/A230 según los métodos de *silica*, PCI y columnas de sílice. Las barras representan los intervalos de confianza al 95%.

La diferencia en los datos se pueden atribuir a la variación que existe entre los lotes y a la manera en cómo se digirió la capa leucocitaria, lo que ocasiona un cambio en el rendimiento de ADN (Gail, Sheehy, Cosentino, Pee, Diaz-Mayoral, Garcia-Closas, Caporaso, Pitt, & Ziegler, 2013). Al momento de cuantificar las muestras de los 5 lotes, el ADN extraído puede contener sustancias potencialmente interferentes, incluidos los compuestos residuales de las muestras, como proteínas y reactivos de extracción comúnmente utilizados en una variedad de métodos de extracción de ADNg, como fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, reactivos precipitantes de ácido nucleico (etanol e isopropanol) o restos cloruro de sodio y sales caotrópicas. Como Dilhari, Sampath, Gunasekara, Fernando, Weerasekara, Sissons, McBain, & Weerasekera, (2017) menciona la cantidad y la calidad de ADNg dependen en gran medida del tipo de muestra y el método utilizado para el experimento. Además, al existir muchas variaciones en los métodos de extracción que se aplican en los laboratorios, disminuye la comparabilidad entre los estudios (Natarajan, Zhang, Morono, Inagaki, & Wang, 2016).

4.3. Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad de los métodos de extracción de ADN, en relación con la pureza, se comparó la extracción de tres lotes de muestras para cada método. La comparación se realizó a través de un ANOVA y la prueba no

paramétrica de Kruskal-Wallis. A pesar de que se utilizaron dos métodos, un paramétrico y un no paramétrico, se obtuvieron resultados similares.

Los resultados obtenidos en el método de *silica* con respecto a la relación A260/A280 no presentaron diferencias significativas entre los tres ensayos ($p = 0.006$), según la prueba de Kruskal-Wallis. El ensayo 1.2 (figura 12) presentó el nivel de pureza más alto (1.650), seguido del ensayo 1.1 (1.555) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 1.3 (1.465). Para el parámetro de pureza de A260/A230, cada lote contenía 10 muestras en total, las cuales fueron analizadas y se eliminaron aquellas que presentaron el mayor número de valores atípicos. Las diferencias entre los ensayos fueron estadísticamente significativas ($p = 0.002$); el ensayo 1.2 presentó el nivel de pureza más alto (2.100), seguido del ensayo 1.1 (1.295) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 1.3 (1.060), como se muestra en la figura 12. Las muestras eliminadas, al presentar valores cercanos a 6, se puede asumir una posible contaminación o a la descalibración del equipo de cuantificación.

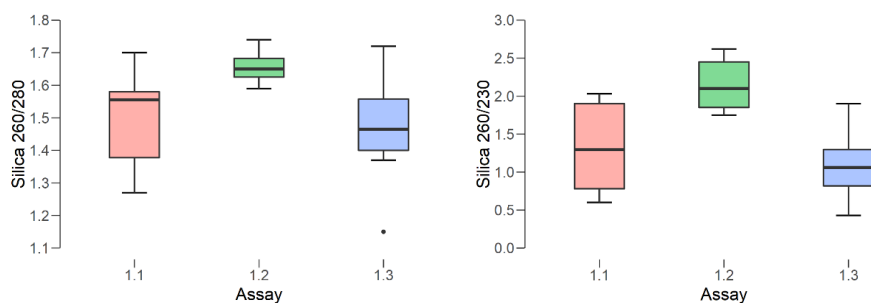


Figura 12. Distribución de los valores de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

Aplicación del método de *silica* en tres lotes diferentes. La línea dentro de la caja representa la mediana, y la caja comprende los cuartiles inferior y superior.

En lo que se refiere a los resultados obtenidos con el método del kit Roche con respecto a la relación A260/A280, los datos fueron estadísticamente significativos entre los ensayos ($p < 0.001$) según la prueba de Kruskal-Wallis. El ensayo 2.2 (figura 13) presentó el nivel de pureza más alto (1.960), seguido del ensayo 2.3 (1.880) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 2.1 (1.835). Para el parámetro de pureza de A260/A230, cada lote se compuso de 10 muestras en total, las cuales fueron analizadas y se eliminaron aquellas que presentaron el mayor número de valores atípicos, cercanos a 8, posiblemente

debido a una posible contaminación de la muestra o a la descalibración del equipo de cuantificación. Las diferencias entre los ensayos no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.791$); el ensayo 2.2 presentó el nivel de pureza más alto (2.150), seguido del ensayo 2.1 (2.065) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 2.3 (2.030), como se muestra en la figura 13.

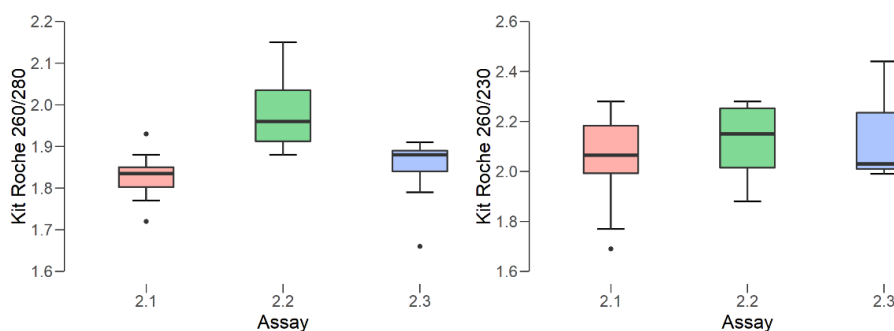


Figura 13. Distribución de los valores de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

Aplicación del método de kit de Roche en tres lotes diferentes. La línea dentro de la caja representa la mediana, y la caja comprende los cuartiles inferior y superior.

Los resultados obtenidos con el método de Chelex-100 con respecto a la relación A260/A280, no hubo diferencia significativa entre los ensayos ($p = 0.459$) según la prueba de Kruskal-Wallis. El ensayo 3.3 (figura 14) presentó el nivel de pureza más alto (1.785), seguido del ensayo 3.2 (1.645) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 3.1 (1.575). En la relación A260/A230 los tres ensayos no presentaron diferencia significativa ($p = 0.015$); el ensayo 3.1 presentó el nivel de pureza más alto (0.325), seguido del ensayo 3.2 (0.210) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 3.3 (0.190), como se muestra en la figura 14.

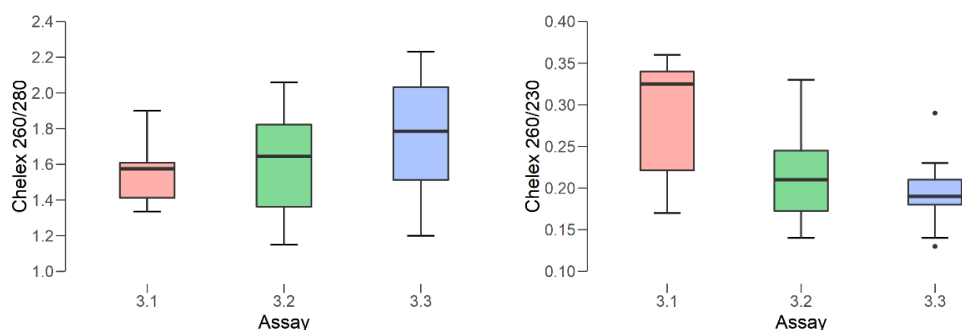


Figura 14. Distribución de los valores de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

Aplicación del método de Chelex-100 en tres lotes diferentes. La línea dentro de la caja representa la mediana, y la caja comprende los cuartiles inferior y superior.

Para el parámetro de pureza de A260/A280, cada lote contenía 10 muestras en total, las cuales fueron analizadas y se eliminaron aquellas que presentaron el mayor número de valores atípicos. Las diferencias en los datos fueron estadísticamente significativas entre los ensayos ($p = 0.003$) según la prueba de Kruskal-Wallis. El ensayo 4.2 presentó el nivel de pureza más alto (2.050), seguido del ensayo 4.1 (1.970) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 4.3 (1.855). En la relación A260/A230 los tres ensayos no presentaron diferencia significativa ($p = 0.114$); el ensayo 4.3 presentó el nivel de pureza más alto (1.705), seguido del ensayo 4.1 (1.480) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 4.2 (0.915), como se muestra en la figura 15.

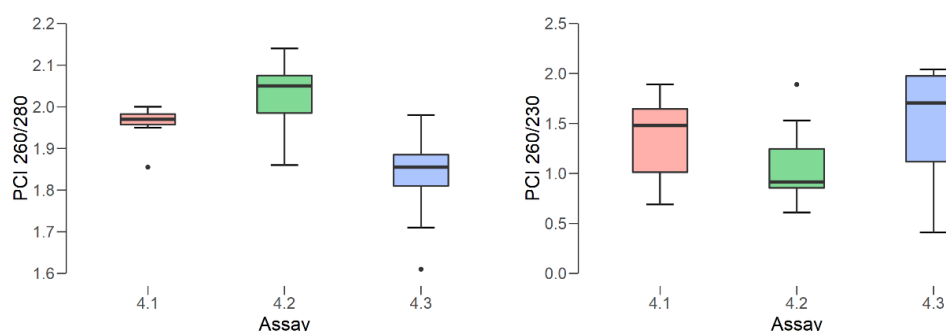


Figura 15. Distribución de los valores de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

Aplicación del método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) en tres lotes diferentes. La línea dentro de la caja representa la mediana, y la caja comprende los cuartiles inferior y superior.

Los resultados obtenidos con el método de columnas de sílice con respecto a la relación A260/A280, los datos no presentaron diferencia significativa entre los ensayos ($p = 0.220$) según la prueba de Kruskal-Wallis. El ensayo 5.1 (figura 16) presentó el nivel de pureza más alto (1.950), seguido del ensayo 5.3 (1.840) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 5.2 (1.830). Para el análisis del parámetro de pureza de A260/A230, cada lote contenía 10 muestras en total, las cuales fueron analizadas y se eliminaron aquellas que presentaron el mayor número de valores atípicos. No se evidenció diferencia significativa entre los tres ensayos ($p = 0.821$); el ensayo 5.2 presentó el nivel de pureza más alto (1.715), seguido del ensayo 5.1 (0.695) y el que tiene el nivel más bajo de pureza es el ensayo 5.3 (0.270), como se muestra en la figura 16. En este método se

obtuvieron tanto valores excesivamente altos como negativos, esto se puede atribuir a posibles fallos en el equipo de cuantificación o daños en la muestra.

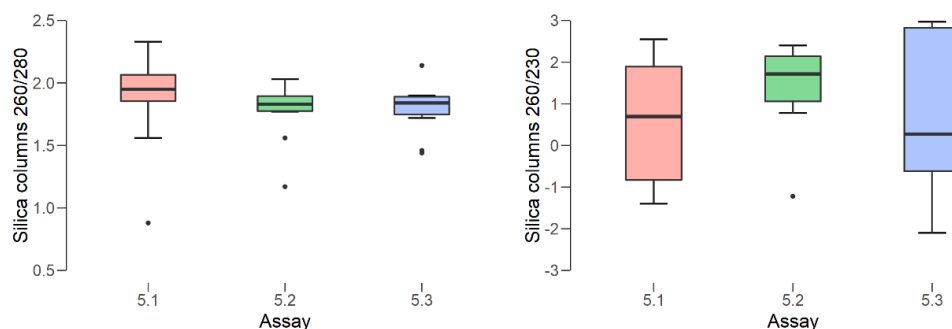


Figura 16. Distribución de los valores de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

Aplicación del método de columnas de sílice en tres lotes diferentes. La línea dentro de la caja representa la mediana, y la caja comprende los cuartiles inferior y superior.

El método que dio mejores resultados en cuanto a reproducibilidad fue el kit de Roche de acuerdo a los valores obtenidos que se encuentran en el rango considerado como óptimo para los parámetros de pureza. Según Espinosa, Bertin, Squeo, Cortés, & Gouin (2015) las extracciones basadas en kits presentan menos variaciones técnicas que los métodos orgánicos, ya que el uso de tampones prefabricados y purificaciones de columna probablemente reducen el error introducido.

El método de *silica* desarrollado anteriormente, se encontraba como segundo, luego el método con las columnas de sílice. Entre los métodos que presentaron una baja reproducibilidad se encontraban las resinas de Chelex-100 y PCI, ya que los valores de pureza difirieron entre los lotes para la relación A260/A230. Como Saba, Papizadeh, Khansha, Sedghi, Rasooli, Ali Amoozegar, Reza Soudi, Shahzadeh, & Fazeli (2016) mencionan que al emplear la resina Chelex-100 se obtiene una cantidad significativa de ADN, pero posee una baja reproducibilidad cuando se examinan varias muestras.

Finalmente, la extracción con PCI ha demostrado ser menos reproducible que los otros métodos para la extracción de ADN. Esto concuerda con Willner, Daly, Whiley, Grimwood, Wainwright, & Hugenholtz (2012), donde han sugerido que los protocolos con muchos pasos, como el método de PCI, pueden no ser

apropiados para estudios a gran escala, y también aumentan el potencial de una mayor variación.

4.4. Integridad de ADN, análisis en gel de agarosa

El tamaño del ADN es un parámetro esencial que debe ser tomado en cuenta. Para los análisis después de la extracción, se seleccionaron al azar dieciséis ADNs por cada método y se visualizaron en geles de agarosa. Se cargaron 50 ng de cada ADN, en un gel de agarosa al 1.5% como se observa en la figura 17. Se evidenció que el método de *silica* (carril a) posee bandas intactas excepto cuatro muestras (lo que representa el 25% del total) donde el ADN se encuentra degradado. El método del kit de Roche (carril b) mostró bandas intensas para el ADN extraído excepto tres muestras (representando el 18.75% del total). En el método de Chelex-100 (carril c) no se visualizó la presencia de bandas para ninguna de las muestras, lo que indica una degradación de la muestra. Para el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) (carril d) se mostró la presencia de bandas tenues a excepción de cuatro muestras (equivalente al 25% del total). Ahora bien, el método de columnas de sílice presentó tanto bandas tenues como intensas (representa el 12.5% del total), a excepción de dos muestras que no mostraron la presencia de bandas.

Los métodos kit Roche y *silica* dieron los mejores resultados en términos de integridad y cantidad de ADN. Esto se ha demostrado no solo a través de la evaluación de los resultados de espectrofotometría (Anexos 1-5), sino también mediante electroforesis estándar de las muestras (figura 17). El método rápido de *silica* presentado proporciona una mejora considerable con respecto a los protocolos descritos anteriormente de extracción de ADN a partir de capa leucocitaria. Mientras que el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) produjo fragmentos de ADN mucho más pequeñas y de baja calidad, que definitivamente no es adecuado para otras aplicaciones.

La alta contaminación proteica puede llevar a una sobreestimación de la concentración real de ADN (Oliveira, Paim, Reiter, Rieger, & D'azevedo, 2014),

es por esto que existen inconvenientes al momento de visualizar las bandas en gel de agarosa.

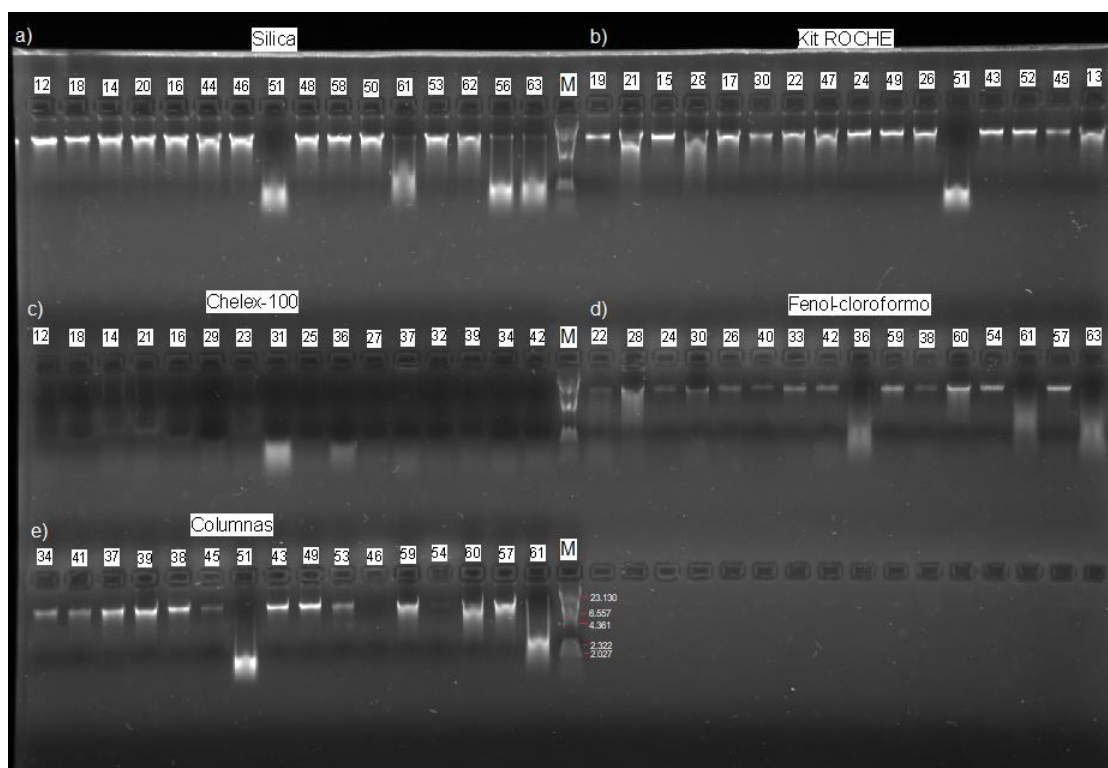


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa comparando 5 métodos de extracción. Bandas de ADN extraído mediante a) sílica, b) kit Roche *High Pure PCR Template Preparation*, c) Chelex-100, d) fenol-cloroforno-alcohol isoamílico y e) columnas de sílice. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1,5% a 100 V durante 15 minutos. M= marcador de ADN fue el genoma λ -Hind III.

4.5. Calidad de ADN, análisis por PCR en tiempo real

La amplificación exitosa de una secuencia mediante qPCR depende en gran medida de la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos de las muestras biológicas. Para evaluar la presencia de ADN amplificable en los 5 métodos de extracción, se llevó a cabo el análisis de PCR en tiempo real, dirigido al gen de la proteína de leche bovina *Kappa* caseína. En todas las reacciones de qPCR, se utilizaron 50 ng de ADN extraídos; se escogieron 16 preparaciones al azar de 30 aislamientos de ADN de cada método. La concentración de ADN se determinó mediante *Nanodrop 2000*. Los productos fueron evaluados en gel de agarosa y se analizaron las curvas de amplificación y fusión. En general un producto de

PCR fue amplificado según el tamaño esperado de 379 pb, sin la presencia de productos inespecíficos.

4.5.1. Amplificación de ADN aislado con *silica*

Dentro del análisis de las gráficas generadas por el equipo de qPCR se pudo evidenciar que los valores correspondientes al número de ciclos Cq presentaron un promedio de 27.82 (Anexo 6), y se mostró que ciertas curvas no alcanzan la fase de *plateau*, donde la amplificación termina debido al agotamiento de los cebadores y la inactivación térmica de la ADN polimerasa (Jansson & Hedman, 2019). Con respecto a las curvas de fusión se evidenciaron temperaturas de fusión entre 81.5 hasta 82°C, lo que implica la ausencia de productos inespecíficos que se refleja en el gel de agarosa, como se muestra en figura 18 (a). Además, no se observa la presencia de dímeros de *primer* en la curva de fusión. Únicamente una preparación (carril 51) no presentó ADN amplificable en gel y no se registró una temperatura de fusión. Ver figura 18 (b).

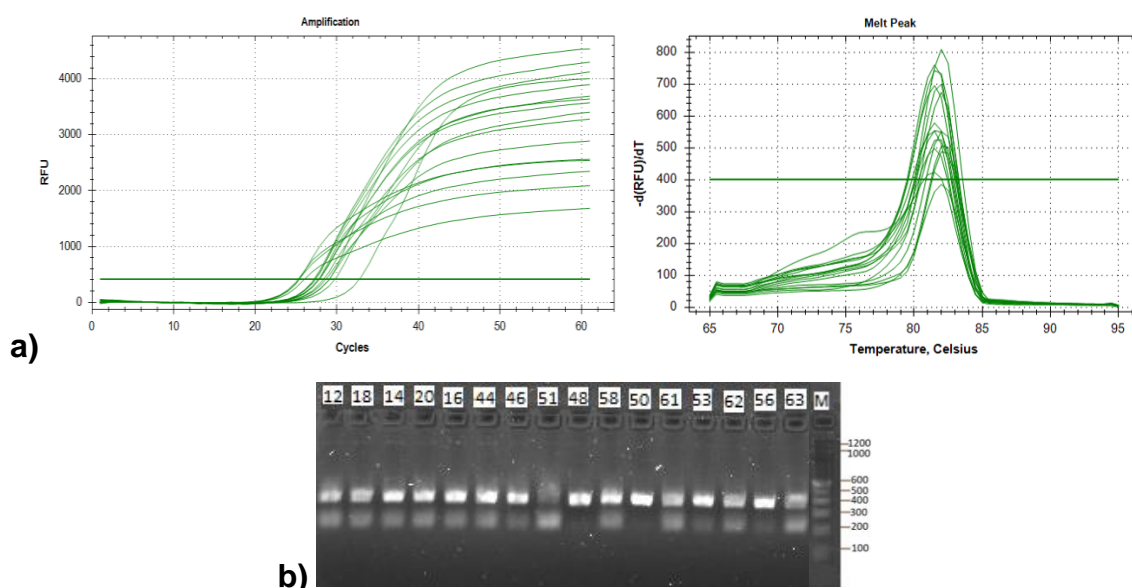


Figura 18. ADN_g amplificado por el método *silica*.

a) Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real del gen de la proteína de leche bovina y b) Electroforesis en gel de agarosa (2%) Productos de amplificación del ensayo *iQ SYBR Green* teñido con *Safe View*. Carril M, marcador de peso molecular 100 bp.

4.5.2. Amplificación de ADN aislado con columnas de sílice

Dentro del análisis de las gráficas generadas por el equipo de qPCR se obtuvo un promedio de 28.04 (Anexo 6) según el número de ciclos correspondientes a Cq. Con respecto a las curvas de fusión se evidenció un rango de temperaturas de fusión entre 81.5 hasta 82°C. En la gráfica de las curvas de disociación se observó la presencia de una curva que registro una temperatura de 76°C, lo que indica la posible presencia de dímeros de *primer* o inhibidores en la preparación de ADN. La muestra 46 presentó un valor de Cq muy alto (35.28) lo que implica la presencia de menor cantidad de ADN, por lo que existe ausencia de banda en gel. Ver figura 19.

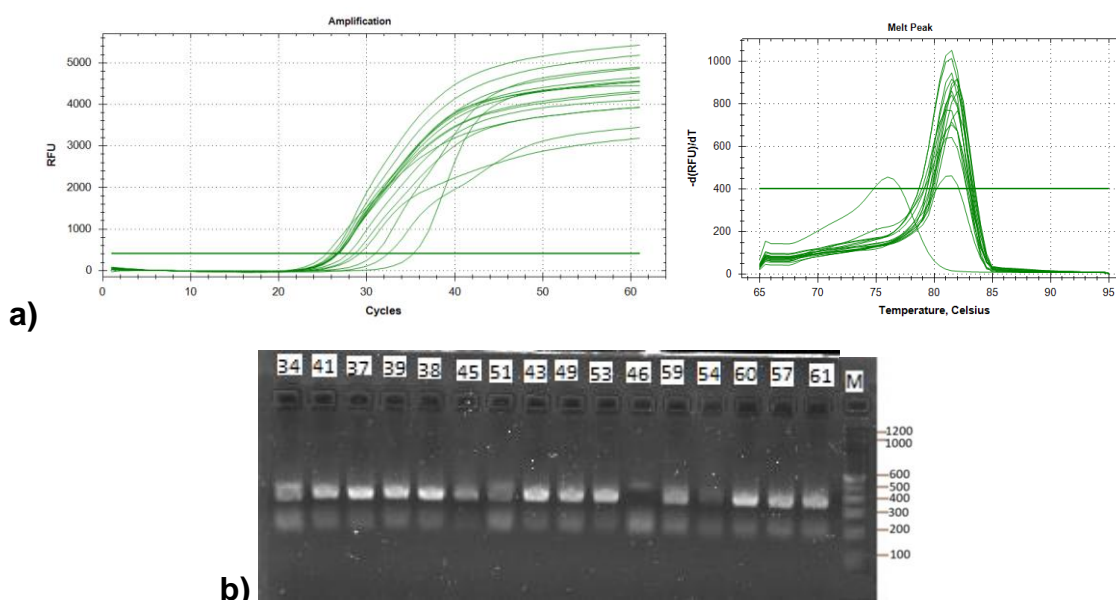


Figura 19. ADN_g amplificado por el método columnas de sílice.

a) Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real del gen de la proteína de leche bovina y b) Electroforesis en gel de agarosa (2%) Productos de amplificación del ensayo *iQ SYBR Green* teñido con *Safe View*. Carril M, marcador de peso molecular 100 bp.

4.5.3. Amplificación de ADN aislado con el kit de Roche

Los valores correspondientes al número de ciclos Cq presentaron un promedio de 26.60 (Anexo 6), y se evidenció que algunas curvas no alcanzan un *plateau*. Las curvas de fusión poseen un rango de temperaturas entre 81.5 hasta 82°C, implicando la ausencia de productos inespecíficos lo que a su vez se refleja en el gel de agarosa. En las curvas de fusión se observó una curva con un pico por

fuera de las curvas de productos amplificados (carril 51), esto puede deberse a la presencia de dímeros de *primer* en la preparación de ADN; por lo que, esta muestra no presentó una banda clara y definida en gel, además, no se registró una temperatura de fusión en el equipo. Ver figura 20.

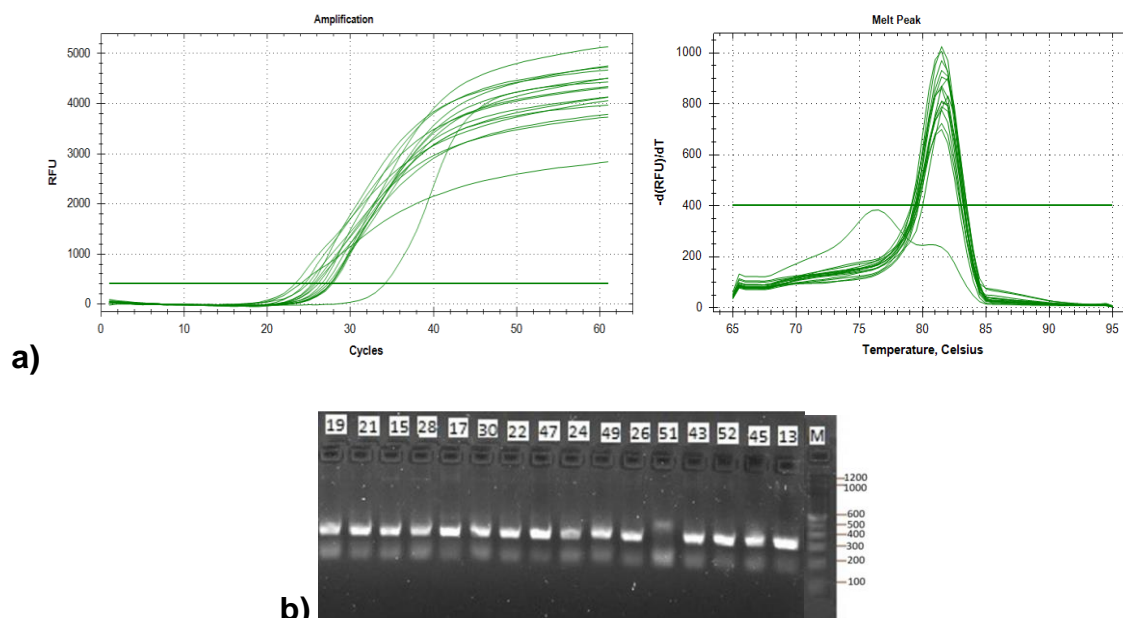


Figura 20. ADNg amplificado por el método kit Roche.

a) Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real del gen de la proteína de leche bovina y b) Electroforesis en gel de agarosa (2%) Productos de amplificación del ensayo *iQ SYBR Green* teñido con *Safe View*. Carril M, marcador de peso molecular 100 bp.

4.5.4. Amplificación de ADN aislado con Chelex-100

En la figura 21 (a) se evidencia las curvas de amplificación, de acuerdo al número correspondiente de ciclos Cq, donde se obtuvo un promedio de 33.59 (Anexo 6). En las curvas de fusión se registraron temperaturas entre 81 hasta 81.5°C, la muestra en el carril 18, no presentó curva de amplificación. Las preparaciones correspondientes a los carriles 12,18, 23, 25, 36, 27, 32, 39 y 34 presentaron curvas por debajo del umbral con diferentes picos de temperatura que el equipo no pudo registrar, como se muestra en la figura 22 (a). Los picos inferiores en la curva de fusión pueden deberse a la presencia de dímeros de *primer* o inhibidores para algunas preparaciones de ADN; por tanto, no presentaron bandas claras y definidas en gel. Ver figura 21 (b).

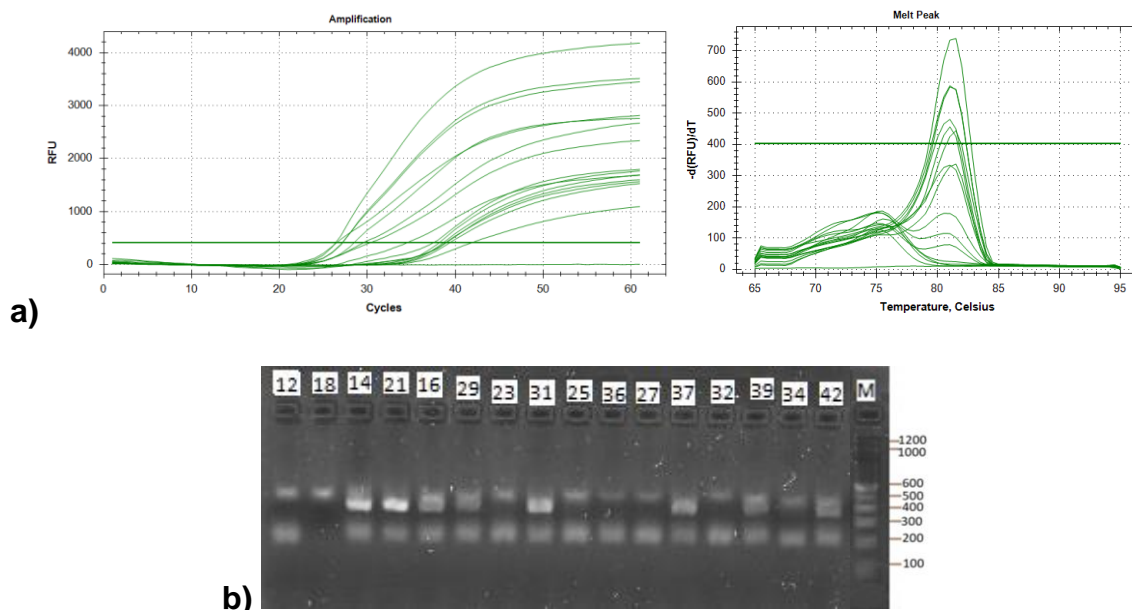


Figura 21. ADN_g amplificado por el método Chelex-100.

a) Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real del gen de la proteína de leche bovina y b) Electroforesis en gel de agarosa (2%) Productos de amplificación del ensayo *iQ SYBR Green* teñido con *Safe View*. Carril M, marcador de peso molecular 100 bp.

4.5.5. Amplificación de ADN aislado con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI)

Dentro del análisis de las gráficas generadas por el equipo de qPCR se pudo evidenciar que los valores correspondientes al número de ciclos C_q presentaron un promedio de 30.55 (Anexo 6), la muestra en el carril 24, no presentó curva de amplificación. Con respecto a las curvas de fusión se evidenciaron temperaturas de fusión entre 81.5 hasta 82°C, además, cuatro preparaciones correspondientes a los carriles 24, 30, 33 y 36 presentaron curvas por debajo del umbral con diferentes picos de temperatura que el equipo no pudo registrar, como se muestra en la figura 22 (a). Estas variaciones en las curvas pueden ser el resultado de dímeros de *primer*, inhibidores o productos inespecíficos con un producto más pequeño de lo esperado. La presencia de bandas únicas y claras no pudieron visualizarse en gel. Ver figura 22 (b).

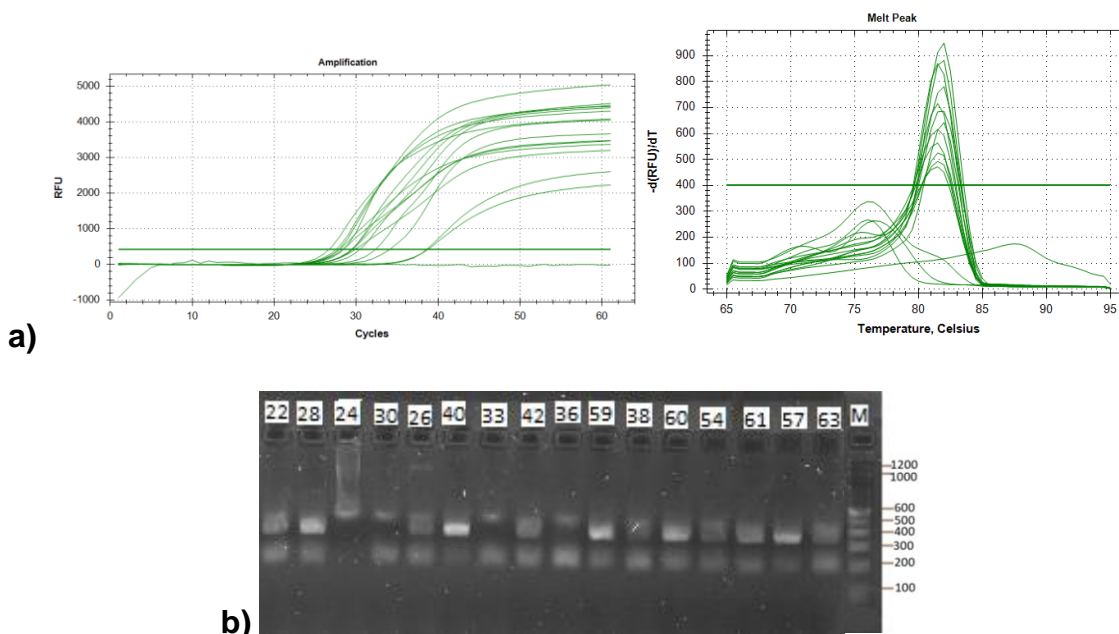


Figura 22. ADN_g amplificado por el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

a) Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real del gen de la proteína de leche bovina y b) Electroforesis en gel de agarosa (2%) Productos de amplificación del ensayo *iQ SYBR Green* teñido con *Safe View*. Carril M, marcador de peso molecular 100 bp.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el kit de Roche y *silica* son los métodos que presentaron mejor desempeño en cuanto a la obtención de ADN amplificable, teniendo un 93,75% de amplificación de muestras, seguido de las columnas de sílice con 81,25%, esto se vio reflejado en gel de agarosa. Por el contrario, los métodos de Chelex-100 y PCI presentaron ADN fragmentado o ausencia de bandas claras, siendo los métodos con menor presencia de ADN de buena calidad para ser empleado dentro de una PCR en tiempo real.

En el método de *silica* no se evidenció la presencia de picos a menor temperatura de fusión, debido a que estos corresponderían a la formación de dímeros de *primer* durante la reacción o la presencia de inhibidores. Esto concuerda con Marshall, Stoljarova, Schmedes, King, & Budowle (2014) donde mencionan que el empleo de métodos basados en *silica* proporcionan una mejor reducción de los inhibidores durante la extracción.

Las impurezas presentes en las muestras de ADN extraído con Chelex-100 se deben a la presencia de la propia resina, que son transportadas al extracto de ADN final. Al ser un quelante de iones polivalentes, los iones Mg^{2+} requeridos

para que la Taq polimerasa funcione son capturados, por lo tanto, cualquier resina presente afectaría la eficiencia de la amplificación (Hu, Liu, Yi, & Huang, 2015; Phillips, McCallum, & Welch, 2012). Otro inconveniente en la aplicación de este método es la incapacidad de eliminar todos los componentes celulares y otros contaminantes que pueden estar presentes en la muestra. Esto puede considerarse como la principal causa detrás de la no amplificación y la presencia de inhibidores en qPCR (Ali, Rampazzo, Costa, & Krieger, 2017). H. Al-Griw, Zraba, Al-Muntaser, Draid, Zaidi, Tabagh, & M. Al-Griw (2017) informaron que la presencia de inhibidores dentro de la muestra ocurre por la falta de pasos de purificación dentro del protocolo de Chelex-100.

A pesar de que Samadi Shams, Zununi Vahed, Soltanzad, Kafil, Barzegari, Atashpaz, & Barar (2011) menciona que el protocolo de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico es más eficiente para eliminar los inhibidores de la PCR en comparación con Chelex-100, esto no se evidencia en las figuras 21 y 22 (b), ya que ambos procedimientos tuvieron ADN de baja calidad. Sin embargo, el método de Chelex-100 presenta la ventaja de extraer una cantidad considerable de ADN que no puede recuperarse mediante el método de PCI.

En los últimos años, se han comparado los métodos orgánicos (fenol-cloroformo) con métodos basados en columnas comerciales para la extracción de ADN y se ha demostrado que la tecnología basada en columnas tiene una mejor recuperación y una eliminación más eficiente de los inhibidores (Usman, Yu, Liu, Fan, & Wang, 2014). El kit de Roche es un método rápido y conveniente para recuperar el ADN de todos los rangos de peso molecular con alto rendimiento y sin degradación.

Según Volk, Piskernik, Kurincic, Klančnik, Toplak, & Jersek (2014), el método clásico de fenol-cloroformo produce ADN en altas concentraciones y también facilita un buen desempeño de la PCR en tiempo real. Esto difiere de los resultados obtenidos durante la cuantificación, ya que se evidenciaron concentraciones inferiores a 20 ng/μl y se tuvo un menor rendimiento en la qPCR con la ausencia de ADN amplificable.

Después de la extracción orgánica con el método de PCI, se identificó la presencia de inhibidores en las curvas de fusión en qPCR. Según Desmyter, De Cock, Moulin, & Noël (2017) la inhibición se puede resolver hasta cierto punto diluyendo los extractos antes de la PCR o reduciendo la cantidad del material de partida, pero ambas estrategias resultan poco beneficiosas ya que disminuyen la cantidad de ADN plantilla en la PCR.

4.6. Comparación total

La figura 23 representa el desempeño de los cinco métodos de todas las muestras procesadas (30 muestras por método). Los resultados obtenidos con respecto a la concentración de ADN y las relaciones de pureza A260/A280 y A260/A230 fueron estadísticamente significativos en los cinco métodos ($p < 0.001$) según la prueba de Kruskal-Wallis.

Con respecto a la recuperación del ADN, se observó que la mayoría de los datos son dispersos; sin embargo, basados en las medianas Chelex-100 (47.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y *silica* (44.72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aíslan la mayor cantidad de ADN y no son presentan diferencia significativa ($p = 1.00$) en la recuperación de ADN, teniendo a *silica* con una menor variación, seguido del kit de Roche (24.91 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Los métodos que tienen el nivel más bajo en rendimiento fueron las columnas de sílice (17.34 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y PCI (5.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

En la relación A260/A280, tanto PCI, el kit de Roche y las columnas de sílice fueron los métodos con el mejor desempeño basados en la mediana (1.970, 1.880 y 1.865) respectivamente. Por otro lado, Chelex-100 (1.603) y *silica* (1.580), fueron los métodos con menor desempeño.

Finalmente, en la relación A260/A230 el kit de Roche fue el método con mejor desempeño en pureza (2.195) basado en las medianas; siendo el único método que presenta valores que encuentran dentro del rango considerado como óptimo. Seguido de *silica* 1.780, luego las columnas de sílice 1.295, PCI 1.150 y Chelex-100 con los resultados más precisos, pero con un valor por debajo del rango considerado como óptimo en la relación de pureza (0.210).

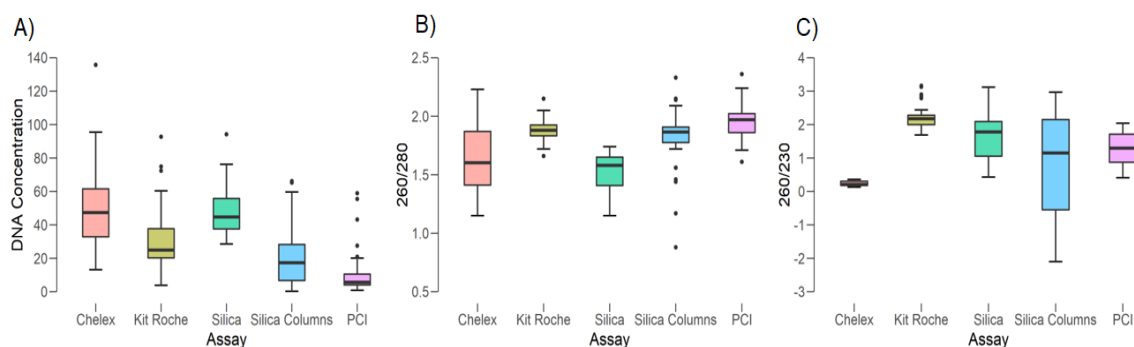


Figura 23. Representación gráfica del desempeño de los cinco métodos usados.

En relación a las concentraciones de ADN, A260/A280 y A260/A230. A) Concentración de ADN (ng/μl); B) relación A260/A280; C) relación A260/A230. La línea dentro de la caja representa la mediana, y la caja comprende los cuartiles inferior y superior. La prueba de ANOVA de medidas repetidas y la prueba de Kruskal-Wallis se usaron para examinar las diferencias de concentración de ADN, A260/A280 y A260/A230 entre los métodos.

En el presente trabajo, se encontró que la pureza del ADN obtenido usando el método de *silica* en la relación A260/A280, fue uno de los métodos que presentó valores por debajo del rango considerado como óptimo, esto difiere del estudio realizado por Verma, Vasudevan, Kashyap, Samsudeen, Meghvansi, Kamboj, & Singh (2018) donde la extracción con polvo de vidrio resultó ser el mejor en las relación de A260/A280 obteniendo un valor que se considera como óptimo dentro de este parámetro de pureza.

Durante la extracción de ADN mediante las columnas de sílice, se pudo observar la presencia de residuos como reactivos químicos, y proteínas en el eluato de ADN, lo que interferiría con la medición de la concentración de ADN (X. Li, Wu, Zhang, Cao, Y. Li, J. Li, Zhu, & Wu, 2014). Es por esto, que las diferencias en la concentración estimada de la misma muestra se derivaban no solo de los métodos en sí, sino también de la de las impurezas que interfieren en la muestra de ADN.

La aplicación del kit de Roche obtuvo la concentración más alta de ADN en las diferentes muestras provenientes de tres lotes. Esto concuerda con (Ntambwe Kamangu, 2019), donde se utilizaron kits similares como el kit *Qiagen® QIAamp DNA Blood Mini*, teniendo una concentración media de ADN extraído de 34.0 ng/μl. Esta diferencia en las concentraciones puede deberse a los tiempos de

incubación prolongados y también a los compuestos que conforman los medios de extracción.

A pesar de que la extracción de ADN usando la resina Chelex-100 es uno de los métodos más fáciles, continúa presentando inconvenientes en la calidad del extracto de ADN obtenido. Según el estudio realizado por Singh, Kumari, & Iyengar (2018) en promedio obtuvo un valor por debajo del rango aceptable en la relación A260/A230 a pesar de presentar una alta concentración de ADN. Esto concuerda con los resultados obtenidos con el método de Chelex-100 que presentó valores por debajo del rango considerado como óptimo (2.0-2.2) para la relación A260/A230 en todos los lotes analizados. El extracto de ADN además de encontrarse impuro se encontraba pigmentado debido a la presencia de restos celulares suspendidos.

La baja concentración de ADN mostrado en los lotes con la aplicación del protocolo de PCI puede deberse a la oxidación del fenol empleado (Barbier, Chabikwa, Ahsan, Cook, Powell, Tanurdzic, & Beveridge, 2019). Además, la extracción con este método posee inconvenientes lo que hacen que el protocolo tome más tiempo y requiera más trabajo, con la posibilidad de la disminución del ADN durante los pasos de aislamiento, siendo el método menos reproducible (Abdel-Latif & Osman, 2017). La absorbancia UV para muestras que fueron extraídas mediante PCI, mostraron mayor cantidad de errores de medición, lo que sugiere que el fenol residual afectó gravemente la cuantificación.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

En la evaluación de los 5 métodos de extracción de ADNg, se determinó que el método desarrollado "*in house*" *silica*, presentó concentraciones adecuadas que pueden igualar e incluso superar al kit de Roche, debido a su fácil aplicación y ejecución. Además, permitió obtener rendimientos considerables para posteriores técnicas moleculares; en cambio, el método de columnas de sílice presentó inconvenientes en cuanto a la recuperación y calidad de ADN.

Al comparar los métodos de aislamiento se comprobó que Chelex-100 y *silica*, fueron los mejores en aislar una mayor cantidad de ADN, mientras que, en las relaciones de pureza los resultados variaron teniendo a PCI, kit de Roche y columnas de sílice, como los mejores métodos para la relación A260/A280. Por último, en la relación A260/A230 únicamente el kit de Roche presentó valores adecuados para considerar que una muestra se encuentra libre de contaminación.

Los resultados mostraron una baja reproducibilidad en cuatro de los cinco métodos empleados en este estudio. Por lo que, el método del kit de Roche se consideró como el más reproducible ya que permitió el aislamiento eficaz y robusto de ADN de plantilla pura para ser usado en una qPCR, a partir de pequeñas cantidades de capa leucocitaria.

Mediante la PCR en tiempo real se confirmó que los métodos del kit de Roche y *silica* presentaron mejor desempeño en cuanto a la obtención de ADN amplificable. A pesar de que existen algunos problemas al seleccionar un método de aislamiento adecuado para el desarrollo de un estudio, es necesario optar por un método que permita recuperar una gran cantidad de ácidos nucleicos y proporcionar un mayor rendimiento de copias amplificables (Guha, Das, Dutta, & Chaudhuri, 2018).

La elección de un método adecuado se debe realizar en base al propósito de la investigación, teniendo en cuenta el rendimiento de los métodos y los recursos disponibles, especialmente cuando se necesita analizar una gran cantidad de muestras (Chacon-Cortes, Haupt, Lea, & Griffiths, 2012).

En conclusión, se pudo evidenciar que la técnica de extracción de ADN mediante el uso de *silica*, mostró ventajas en cuanto a sencillez, rapidez y seguridad para el operador. Además, dicha técnica permite el mejor manejo de un gran número de muestras, por lo que podría sugerirse como técnica de extracción de rutina dentro del laboratorio.

5.2. Recomendaciones

Teniendo en cuenta las desventajas de la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, como la alta toxicidad del fenol, que requiere mucho tiempo e intensidad de mano de obra (Mayta, Romero, Pando, Verastegui, Tinajeros, Bozo, Henderson-Frost, Colanzi, Flores, Lerner, Bern, & Gilman 2019), se recomienda utilizar el método de *silica* como una técnica de aislamiento de ADN de rutina en diferentes muestras, ya sea sangre completa o capa leucocitaria. Esta técnica usa un solo tubo, reduce el uso de insumos en el laboratorio y la posibilidad de contaminación.

Los factores que se deben considerar para elegir la técnica de extracción son el tamaño del lote, el tiempo, las medidas implementadas para prevenir la contaminación cruzada de la muestra, la técnica de lisis y la aplicabilidad de la muestra.

El desarrollo del método de *silica* permitirá facilitar los estudios de genética molecular al ser un protocolo simple, rápido y reproducible que proporcionará un aislamiento eficaz de ADN de alta calidad y cantidad, lo que reduce significativamente el tiempo y los recursos utilizados dentro del laboratorio.

REFERENCIAS

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). *Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Agbagwa, I. O., Datta, S., Patil, P. G., Singh, P., & Nadarajan, N. (2012). *A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. Genetics and Molecular Research*, 11(4), 4632–4639. <https://doi.org/10.4238/2012.September.14.1>
- Ahmad Bhawani, S., Fong, S. S., & Mohamad Ibrahim, M. N. (2015). *Spectrophotometric Analysis of Caffeine. International Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/170239>
- Al-Griw, H. H., Zraba, Z. A., Al-Muntaser, S. K., Draid, M. M., Zaidi, A. M., Tabagh, R. M., & Al-Griw, M. A. (2017). *Effects of storage temperature on the quantity and integrity of genomic DNA extracted from mice tissues: A comparison of recovery methods. Open Veterinary Journal*, 7(3), 239–243. <https://doi.org/10.4314/ovj.v7i3.7>
- Ali, N., Rampazzo, R. de C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). *Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. BioMed Research International*, 2017, 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- Attal, J., Cajero-Juarez, M., & Houdebine, L.-M. (1995). *A simple method of DNA extraction from whole tissues and blood using glass powder for detection of transgenic animals by PCR. Transgenic Research*, 4(2), 149–150. <https://doi.org/10.1007/BF01969417>
- Barbier, F. F., Chabikwa, T. G., Ahsan, M. U., Cook, S. E., Powell, R., Tanurdzic, M., & Beveridge, C. A. (2019). *A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. Plant Methods*, 15(1), 62.

<https://doi.org/10.1186/s13007-019-0447-3>

- Bermingham, N., & Luettich, K. (2003). *Polymerase chain reaction and its applications*. *Current Diagnostic Pathology*, 9(3), 159–164. [https://doi.org/10.1016/S0968-6053\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0968-6053(02)00102-3)
- Boyd, M. A., Tennant, S. M., Melendez, J. H., Toema, D., Galen, J. E., Geddes, C. D., & Levine, M. M. (2015). *Adaptation of red blood cell lysis represents a fundamental breakthrough that improves the sensitivity of Salmonella detection in blood*. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1199–1209. <https://doi.org/10.1111/jam.12769>
- Boyle, J. S., & Lew, A. M. (1995). *An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification*. *Trends in Genetics*, 11(1), 8. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)88977-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)88977-5)
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosens, N., & Morisset, D. (2014). *Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods*. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 115–126. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2014.03.008>
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier Academic Press.
- Carpi, F. M., Di Pietro, F., Vincenzetti, S., Mignini, F., & Napolioni, V. (2011). *Human DNA extraction methods: patents and applications*. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 5(1), 1–7. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303346>
- Chacon-Cortes, D., Haupt, L. M., Lea, R. A., & Griffiths, L. R. (2012). *Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study*. *Molecular Biology Reports*, 39(5), 5961–5966. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1408-8>

- d'Angelo, F., Santillo, A., Sevi, A., & Albenzio, M. (2007). *Technical Note: A Simple Salting-Out Method for DNA Extraction from Milk Somatic Cells: Investigation into the Goat CSN1S1 Gene*. *Journal of Dairy Science*, *90*(7), 3550–3552. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0149>
- De Preter, K., Speleman, F., Combaret, V., Lunec, J., Laureys, G., Eussen, B. H. J., Francotte, N., Board, J., Pearson, A. D. J., De Paepe, A., Van Roy, N., & Vandesompele, J. (2002). *Quantification of MYCN, DDX1, and NAG Gene Copy Number in Neuroblastoma Using a Real-Time Quantitative PCR Assay*. *Modern Pathology*, *15*(2), 159–166. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880508>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). *NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids*. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (45). <https://doi.org/10.3791/2565>
- Desmyter, S., De Cock, G., Moulin, S., & Noël, F. (2017). *Organic extraction of bone lysates improves DNA purification with silica beads*. *Forensic Science International*, *273*, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.02.003>
- Dilhari, A., Sampath, A., Gunasekara, C., Fernando, N., Weerasekara, D., Sissons, C., McBain, A., & Weerasekera, M. (2017). *Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method*. *AMB Express*, *7*(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0477-z>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. *Phytochemical Bulletin*, *19*, 11–15.
- Drabik, A., & Bodzoń-Kułakowska, A. (2016). *Gel Electrophoresis*. (P. Ciborowski & J. Silberring, Eds.), *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (Second). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688->

1.00007-0

- El Bali, L., Diman, A., Bernard, A., Roosens, N. H. C., & De Keersmaecker, S. C. J. (2014). *Comparative study of seven commercial kits for human DNA extraction from urine samples suitable for DNA biomarker-based public health studies. Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 25(4), 96–110. <https://doi.org/10.7171/jbt.14-2504-002>
- Englen, M. D., & Kelley, L. C. (2000). *A rapid DNA isolation procedure for the identification of Campylobacter jejuni by the polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 421–426. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00841.x>
- Erlich, H. (2015). *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification. Palgrave Macmillan Limited.*
- Espinosa, M. I., Bertin, A., Squeo, F. A., Cortés, A., & Gouin, N. (2015). *Comparison of DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification of guanaco (Lama guanicoe) fecal DNA samples. Genetics and Molecular Research*, 14(1), 400–406. <https://doi.org/10.4238/2015.January.23.13>
- Esser, K.-H., Marx, W. H., & Lisowsky, T. (2005). *Nucleic acid-free matrix: Regeneration of DNA binding columns. BioTechniques*, 39(2), 270–271. <https://doi.org/10.2144/05392AF01>
- Fernández-Soto, P., Velasco Tirado, V., Carranza Rodríguez, C., Pérez-Arellano, J. L., & Muro, A. (2013). *Long-Term Frozen Storage of Urine Samples: A Trouble to Get PCR Results in Schistosoma spp. DNA Detection? PLoS ONE*, 8(4), e61703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061703>
- Gail, M. H., Sheehy, T., Cosentino, M., Pee, D., Diaz-Mayoral, N. A., Garcia-Closas, M., Caporaso, N. E., Pitt, K., & Ziegler, R. G. (2013). *Maximizing DNA yield for epidemiologic studies: no more buffy coats?*

American Journal of Epidemiology, 178(7), 1170–1176.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwt079>

Gallagher, S. R. (2001). *Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy*. In *Current Protocols in Human Genetics* (Vol. 00, p. A.3D.1-A.3D.8). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hga03ds00>

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). *Polymerase chain reaction*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4.
<https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Ghaheri, M., Kahrizi, D., Yari, K., Babaie, A., Suthar, R. S., & Kazemi, E. (2016). *A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample*. *Cellular and Molecular Biology*, 62(3), 120–124.
Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27064884>

Ghatak, S., Muthukumar, R. B., & Nachimuthu, S. K. (2013). *A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis*. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 24(4), 224–231.
<https://doi.org/10.7171/jbt.13-2404-001>

Gjerde, D. T., Hoang, L., & Hornby, D. (2009). *RNA purification and analysis : sample preparation, extraction, chromatography*. Wiley-VCH.

Graziano, L., El-Mogy, M., & Haj-Ahmad, Y. (2013). *Genomic DNA Isolation from Buffy Coat using Norgen's Blood Genomic DNA Isolation Mini Kit*.
Recuperado de www.norgenbiotek.com

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (4th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Guha, P., Das, A., Dutta, S., & Chaudhuri, T. K. (2018). *A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(1), e22181.

<https://doi.org/10.1002/jcla.22181>

Hansen, W. L. J., Bruggeman, C. A., & Wolffs, P. F. G. (2013). *Pre-analytical Sample Treatment and DNA Extraction Protocols for the Detection of Bacterial Pathogens from Whole Blood*. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 943, pp. 81–90). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_4

Haydock, P. V., & Barker, L. M. (2012). Storage of nucleic acid. *Patent Application Publication*, 1–7. Recuperado de <https://patents.google.com/patent/US20130122496>

Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., & Henry, R. J. (2014). *Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species*. *Plant Methods*, 10, 21. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>

Hu, Q., Liu, Y., Yi, S., & Huang, D. (2015). *A comparison of four methods for PCR inhibitor removal*. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.001>

Jansson, L., & Hedman, J. (2019). *Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase*. *Biomolecular Detection and Quantification*, 17(100082). <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100082>

Javadi, A., Shamaei, M., Mohammadi Ziazi, L., Pourabdollah, M., Dorudinia, A., Seyedmehdi, S. M., & Karimi, S. (2014). *Qualification study of two genomic DNA extraction methods in different clinical samples*. *Tanaffos*, 13(4), 41–47. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25852760>

Ji, H. M., Samper, V., Chen, Y., Hui, W. C., Lye, H. J., Mustafa, F. B., Lee, A. C., Cong, L., Heng, C. K., & Lim, T. M. (2007). *DNA purification silicon chip*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 139(1–2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2007.05.033>

- Kemp, B. M., Winters, M., Monroe, C., & Barta, J. L. (2014). *How Much DNA Is Lost? Measuring DNA Loss of Short-Tandem-Repeat Length Fragments Targeted by the PowerPlex 16® System Using the Qiagen MinElute Purification Kit. Human Biology, 86(4), 313.* <https://doi.org/10.13110/humanbiology.86.4.0313>
- Khare, P., Raj, V., Chandra, S., & Agarwal, S. (2014). *Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. Journal of Forensic Dental Sciences, 6(2), 81–85.* <https://doi.org/10.4103/0975-1475.132529>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). *A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. Frontiers in Microbiology, 8, 108.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Kuhn, R., Böllmann, J., Krahl, K., Bryant, I. M., & Martienssen, M. (2018). *Data on DNA gel sample load, gel electrophoresis, PCR and cost analysis. Data in Brief, 16, 732–751.* <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.11.082>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. Journal of Visualized Experiments : JoVE, (62).* <https://doi.org/10.3791/3923>
- Li, J.-F., Li, L., & Sheen, J. (2010). *Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. Plant Methods, 6(1), 1.* <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-1>
- Li, X., Wu, Y., Zhang, L., Cao, Y., Li, Y., Li, J., Zhu, L., & Wu, G. (2014). *Comparison of three common DNA concentration measurement methods. Analytical Biochemistry, 451, 18–24.* <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.01.016>
- M. Gouda, E., Kh. Galal, M., & A. Abdelaziz, S. (2013). *Genetic Variants and Allele Frequencies of Kappa Casein in Egyptian Cattle and Buffalo*

Using PCR-RFLP. Journal of Agricultural Science, 5(2), 197–203.
<https://doi.org/10.5539/jas.v5n2p197>

MACHEREY-NAGEL. (S.F). *NucleoSpin DNA Forensic*. Recuperado el 16 de abril 16 de 2019 de <https://www.mn-net.com/tabid/12857/default.aspx>

Marshall, P. L., Stoljarova, M., Schmedes, S. E., King, J. L., & Budowle, B. (2014). *A high volume extraction and purification method for recovering DNA from human bone. Forensic Science International: Genetics*, 12, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.011>

Mayta, H., Romero, Y. K., Pando, A., Verastegui, M., Tinajeros, F., Bozo, R., Henderson-Frost, J., Colanzi, R., Flores, J., Lerner, R., Bern, C., & Gilman, R. H., (2019). *Improved DNA extraction technique from clot for the diagnosis of Chagas disease. PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), e0007024. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007024>

McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2017). *Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. Molecular Diagnostics*, 371–394. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3>

Mohammadi G, & Saberivand A. (2009). *Simple Method to Extract DNA from Mammalian Whole Blood. J Mol Genet*, 1, 7–10. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/288819820_Simple_Method_to_Extract_DNA_from_Mammalian_Whole_Blood

Natarajan, V. P., Zhang, X., Morono, Y., Inagaki, F., & Wang, F. (2016). *A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments. Frontiers in Microbiology*, 07, 986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00986>

Neary, M. T., Neary, J. M., Lund, G. K., Garry, F. B., Holt, T. N., Mohun, T. J., & Breckenridge, R. A. (2014). *Technical note: A comparison of DNA collection methods in cattle and yaks¹. Journal of Animal Science*,

92(9), 3811–3815. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7445>

Nelson, J. E., & Krawetz, S. A. (1992). *Purification of cloned and genomic DNA by guanidine thiocyanate/isobutyl alcohol fractionation*. *Analytical Biochemistry*, 207(1), 197–201. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90523-A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90523-A)

Noki Technologies. (S.F). *MagPurix System*. Recuperado el 19 de abril de 2019, de from <http://www.nokitechnologies.com/MagPurix.html>

Ntambwe Kamangu, E. (2019). *Comparison of the quality of the DNA extracted from different media at the Laboratory of molecular biology of the faculty of medicine of UNIKIN*. *Int J Mol Biol: Open Access*, 4(1), 27–28. <https://doi.org/10.15406/ijmboa.2019.04.00094>

Oliveira, C. F. de, Paim, T. G. da S., Reiter, K. C., Rieger, A., & D'azevedo, P. A. (2014). *Evaluation of four different dna extraction methods in coagulase-negative staphylococci clinical isolates*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(1), 29–33. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100004>

Olson, N. D., & Morrow, J. B. (2012). *DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation*. *BMC Research Notes*, 5, 668. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>

Patrinos, G., Ansoerge, W., & Danielson, P. B. (2017). *Molecular Diagnostics* (Third Edit). Academic Press.

Peng, X., Yu, K.-Q., Deng, G.-H., Jiang, Y.-X., Wang, Y., Zhang, G.-X., & Zhou, H.-W. (2013). *Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags*. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.015>

Pereira, J. C., Chaves, R., Bastos, E., Leitão, A., & Guedes-Pinto, H. (2011). *An*

efficient method for genomic DNA extraction from different molluscs species. International Journal of Molecular Sciences, 12(11), 8086–8095. <https://doi.org/10.3390/ijms12118086>

Phillips, K., McCallum, N., & Welch, L. (2012). *A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 282–285. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.018>

Podnecky, N. L., Elrod, M. G., Newton, B. R., Dauphin, L. A., Shi, J., Chawalchitiporn, S., Baggett, H. C., Hoffmaster, A. R., Gee, J. E. (2013). *Comparison of DNA extraction kits for detection of Burkholderia pseudomallei in spiked human whole blood using real-time PCR. PloS One*, 8(2), e58032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058032>

Quy, D. Van, Hieu, N. M., Tra, P. T., Nam, N. H., Hai, N. H., Thai Son, N., Nghia, P. T., Anh, N. T., Hong, T. T., & Luong, N. H. (2013). *Synthesis of Silica-Coated Magnetic Nanoparticles and Application in the Detection of Pathogenic Viruses. Journal of Nanomaterials*, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/603940>

Rothe, J., & Nagy, M. (2016). *Comparison of two silica-based extraction methods for DNA isolation from bones. Legal Medicine*, 22, 36–41. <https://doi.org/10.1016/J.LEGALMED.2016.07.008>

Saba, F., Papizadeh, M., Khansha, J., Sedghi, M., Rasooli, M., Ali Amoozegar, M., Reza Soudi, M., Shahzadeh, A., & Fazeli, S. S. (2016). *A Safe, Rapid, and Reproducible Genomic DNA Extraction Protocol for Sequence-Based Identification of Archaea, Bacteria, Cyanobacteria, Diatoms, Fungi, and Green Algae. J Med Bacteriol (Vol. 5). Recuperado* de <https://pdfs.semanticscholar.org/7c7f/025b043bdbe440092e7fbf3411>

2cfd62c353.pdf

- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., ... Walker, A. W. (2014). *Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses*. *BMC Biology*, 12, 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
- Samadi Shams, S., Zununi Vahed, S., Soltanzad, F., Kafil, V., Barzegari, A., Atashpaz, S., & Barar, J. (2011). *Highly effective DNA extraction method from fresh, frozen, dried and clotted blood samples*. *BiolImpacts : BI*, 1(3), 183–187. <https://doi.org/10.5681/bi.2011.025>
- Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2014). *Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis*. *Analytical Biochemistry*, 454, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003>
- Sedlackova, T., Repiska, G., Celec, P., Szemes, T., & Minarik, G. (2013). *Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods*. *Biological Procedures Online*, 15(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1480-9222-15-5>
- Seo, Y., Sato, S., Kuroki, K., & Kishida, T. (2013). *A simple DNA coprecipitation method for the detection of diatoms in heart blood*. *Forensic Science International*, 232(1–3), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.07.016>
- Shewale, J. G., & Liu, R. H. (2014). *Forensic DNA analysis : current practices and emerging technologies*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Recuperado de https://books.google.com.ec/books/about/Forensic_DNA_Analysis.html?id=f2HOBQAAQBAJ&redir_esc=y
- Shokere, L. A., Holden, M. J., & Ronald Jenkins, G. (2009). *Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time*

quantitative PCR of degraded DNA. Food Control, 20(4), 391–401.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2008.07.009>

Sidorova, J. V., Biderman, B. V., Nikulina, E. E., & Sudarikov, A. B. (2012). *A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. Experimental Dermatology, 21(1), 57–60.* <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01375.x>

Singh, U. A., Kumari, M., & Iyengar, S. (2018). *Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. Biological Procedures Online, 20, 12.* <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0077-6>

Smith, K., Diggle, M. A., & Clarke, S. C. (2003). *Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples. Journal of Clinical Microbiology, 41(6), 2440–2443.* <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2440-2443.2003>

Song, Y., Fahs, A., Feldman, C., Shah, S., Gu, Y., Wang, Y., Machado, R. F., Wunderink, R. G., & Chen, J. (2013). *A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards. SpringerPlus, 2, 616.* <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-616>

SP&A Application Laboratory. (2012). *DNA Purification from Buffy Coat Samples with the Thermo Scientific KingFisher Blood DNA Kit.* Recuperado de www.thermoscientific.com/kingfisher.

Takić Miladinov, D. (2016). *Genomic DNA from rat blood: A comparison of two extraction methods. Biologica Nyssana, 7(1), 47–52.* <https://doi.org/10.5281/zenodo.159103>

Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2009, 574398.* <https://doi.org/10.1155/2009/574398>

- Thatcher, S. A., & Ogbonna, G. (2015). *DNA/RNA preparation for molecular detection. Clinical Chemistry, 61(1), 89–99.*
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221374>
- Umesha, S., Manukumar, H. M., & Raghava, S. (2016). *A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens. 3 Biotech, 6(2), 123.* <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0436-4>
- Usman, T., Yu, Y., Liu, C., Fan, Z., & Wang, Y. (2014). *Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. Genetics and Molecular Research, 13(2), 3319–3328.*
<https://doi.org/10.4238/2014.April.29.10>
- Vandewoestyne, M., Van Hoofstat, D., Franssen, A., Van Nieuwerburgh, F., & Deforce, D. (2013). *Presence and potential of cell free DNA in different types of forensic samples. Forensic Science International: Genetics, 7(2), 316–320.* <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.12.005>
- Verma, P. V., Vasudevan, V., Kashyap, B. K., Samsudeen, T. I., Meghvansi, M. K., Kamboj, D. V., & Singh, L. (2018). *Direct lysis glass milk method of genomic dna extraction reveals greater archaeal diversity in anaerobic biodigester slurry as assessed through denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 6(2), 315–323.* [https://doi.org/10.18006/2018.6\(2\).315.323](https://doi.org/10.18006/2018.6(2).315.323)
- Vogelstein, B., & Gillespie, D. (1979). *Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(2), 615–619.* <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.615>
- Volk, H., Piskernik, S., Kurincic, M., Klančnik, A., Toplak, N., & Jeršek, B. (2014). *Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. Journal of Food and Nutrition Research, 53(2), 97–104.*
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.*

BioTechniques, 10(4), 506–513. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1867860>

Willner, D., Daly, J., Whiley, D., Grimwood, K., Wainwright, C. E., & Hugenholtz, P. (2012). *Comparison of DNA Extraction Methods for Microbial Community Profiling with an Application to Pediatric Bronchoalveolar Lavage Samples*. *PLoS ONE*, 7(4), e34605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034605>

Wink, M. (2011). *An introduction to molecular biotechnology : fundamentals, methods, and applications*. Wiley-Blackwell. Recuperado de <https://www.wiley.com/en-us/An+Introduction+to+Molecular+Biotechnology%3A+Fundamentals+%2C+Methods+and+Applications%2C+2nd+Edition-p-9783527326372>

Yalçinkaya, B., Yumbul, E., Mozioglu, E., & Akgoz, M. (2017). *Comparison of DNA extraction methods for meat analysis*. *Food Chemistry*, 221, 1253–1257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.032>

Zhou, C., & Ling, X. (2011). *DNA binding and DNA extraction : methods, applications, and limitations*. Nova Biomedical.

Zhou, J., Wu, J., Zhao, X., Shen, W., Liu, X., Xu, C., & Jin, H. (2015). *Biostorage and Quality Control for Human Peripheral Blood Leukocytes*. *Biopreservation and Biobanking*, 13(1), 13–19. <https://doi.org/10.1089/bio.2014.0094>

ANEXOS

Lote 1

Muestra	Ensayo 1.1 Silica			Ensayo 2.1 Kit ROCHE			Ensayo 3.1 Chelex-100		
	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
12	31.83	1.58	3.12	11.53	1.93	1.99	22	1.90	0.21
13	46.47	1.55	1.49	38.20	1.88	2.19	62.25	1.59	0.34
14	38.80	1.58	1.90	26.53	1.85	2.00	61.2	1.62	0.36
15	63.70	1.63	2.03	27.20	1.84	2.12	55.65	1.57	0.35
16	47.83	1.56	1.91	20.90	1.85	2.01	46.25	1.34	0.255
17	64.70	1.70	3.65	43.73	1.81	2.28	65.3	1.59	0.33
18	30.30	1.27	0.75	10.40	1.72	1.69	24.55	1.40	0.21
19	46.97	1.40	1.10	12.23	1.77	1.77	16.65	1.82	0.17
20	56.23	1.37	0.79	44.03	1.80	2.16	56.8	1.47	0.32
21	76.23	1.30	0.60	74.90	1.83	2.27	86.65	1.35	0.34

Anexo 1. Cantidad y parámetros de pureza obtenido de la capa leucocitaria con tres métodos de extracción.

Lote 2

Muestra	Ensayo 2.2 Kit ROCHE			Ensayo 3.2 Chelex-100			Ensayo 4.1 PCI		
	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
22	21.47	2.05	2.20	32.13	1.87	0.14	7.00	1.95	1.53
23	13.23	2.04	1.88	29.27	1.46	0.25	4.50	1.97	1.05
24	22.30	1.95	1.99	50.17	1.33	0.17	2.97	2.24	0.85
25	35.07	1.95	2.23	43.00	1.66	0.22	3.17	1.99	1.66
26	27.07	1.97	1.93	41.17	2.06	0.20	5.43	1.96	1.43
27	23.10	2.02	2.09	33.20	1.87	0.18	4.97	2.00	1.00
28	72.40	1.88	2.28	80.13	1.68	0.31	11.00	1.98	1.60
29	53.63	1.90	2.27	72.23	1.63	0.23	20.93	1.97	1.89
30	15.43	2.15	2.10	61.67	1.15	0.15	5.60	12.18	0.69
31	92.73	1.90	2.26	135.73	1.28	0.33	58.95	1.855	1.85

Anexo 2. Cantidad y parámetros de pureza obtenido de la capa leucocitaria con tres métodos de extracción.

Lote 3

Muestra	Ensayo 3.3 Chelex-100			Ensayo 4.2 PCI			Ensayo 5.1 Columnas de sílice		
	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
32	32.73	1.92	0.18	3.97	2.14	0.75	32.93	1.56	1.44
33	46.43	1.20	0.13	3.30	4.23	0.61	0.27	0.88	-0.05
34	48.27	2.05	0.19	6.73	2.36	0.95	4.47	2.15	-0.89
36	33.30	2.23	0.14	20.10	2.09	1.53	34.13	1.87	2.55
37	95.50	1.65	0.29	7.80	2.07	0.99	12.13	2.09	1.68
38	28.07	1.52	0.21	3.60	2.07	0.87	10.95	1.99	6.10
39	50.77	1.51	0.23	4.30	2.02	0.85	21.47	1.85	3.90
40	13.20	1.25	0.18	2.25	1.86	0.88	3.40	2.33	-0.81
41	56.23	2.04	0.19	43.20	2.03	1.89	4.30	1.99	-1.40
42	40.53	2.01	0.21	4.47	1.88	1.33	18.85	1.91	2.53

Anexo 3. Cantidad y parámetros de pureza obtenido de la capa leucocitaria con tres métodos de extracción.

Lote 4

Muestra	Ensayo 5.2 Columnas de sílice			Ensayo 1.2 Sílica			Ensayo 2.3 Kit ROCHE		
	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
43	65.27	1.56	0.78	37.53	1.59	2.45	20.50	1.79	2.03
44	16.97	1.80	2.40	39.83	1.59	1.75	31.80	1.88	2.44
45	2.75	2.03	-1.22	51.88	1.65	2.08	6.53	1.66	3.94
46	5.70	1.17	1.15	54.40	1.66	2.62	3.85	1.89	7.99
47	17.30	1.90	1.32	39.60	1.74	4.64	31.25	1.83	2.85
48	14.20	1.86	3.19	36.30	1.64	2.45	21.90	1.87	3.16
49	13.35	1.90	2.13	37.63	1.65	1.78	20.13	1.91	2.90
50	18.73	1.79	2.11	42.30	1.69	2.59	36.33	1.89	3.13
51	28.75	1.88	2.17	59.40	1.72	2.10	60.37	1.88	1.99
52	9.70	1.77	5.22	39.93	1.62	1.85	23.30	1.89	2.79

Anexo 4. Cantidad y parámetros de pureza obtenido de la capa leucocitaria con tres métodos de extracción.

Lote 5

Lote 5									
Ensayo 1.3 Silica			Ensayo 4.3 PCI				Ensayo 5.3 Columnas de sílice		
Muestra	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	Concentración de ADN (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
53	46.67	1.72	5.96	7.03	1.98	1.26	4.30	2.14	-0.29
54	36.00	1.43	1.11	3.33	1.97	0.85	1.40	1.44	-0.22
56	94.20	1.70	1.90	55.50	1.89	2.02	66.17	1.84	4.80
57	35.93	1.15	0.43	5.93	1.87	2.04	26.73	1.72	2.91
58	28.57	1.40	1.24	0.87	1.61	0.41	38.63	1.46	0.76
59	42.97	1.52	1.47	5.10	1.86	1.69	20.03	1.90	-2.10
60	48.37	1.40	0.85	9.13	1.80	1.72	26.63	1.89	2.97
61	58.13	1.37	0.72	18.70	1.85	1.84	32.13	1.84	59.52
62	29.43	1.57	2.99	5.73	1.71	1.07	17.37	1.89	-1.60
63	73.67	1.50	1.01	27.53	1.84	2.04	59.70	1.83	9.29

Anexo 5. Cantidad y parámetros de pureza obtenido de la capa leucocitaria con tres métodos de extracción.

	Silica		Kit ROCHE		Chelex-100		PCI		Columnas de sílice	
	Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq	Muestra	Cq
	12	29.09	13	24.05	12	41.91	22	29.47	34	26.55
	14	27.21	15	26.56	14	27.15	24		37	26.07
	18	28.65	17	23.35	16	29.57	26	29.81	38	26.27
	20	28.37	19	27.30	18		28	27.91	39	26.73
	28	27.88	21	25.37	21	26.39	30	38.66	41	26.83
	44	27.32	22	26.14	23	38.92	33	38.51	43	25.41
	46	25.40	24	27.62	25	38.98	36	34.03	45	29.17
	48	26.04	26	25.82	27	38.65	38	32.27	46	35.28
	50	25.27	28	27.69	29	30.35	40	28.36	49	26.70
	51	32.75	30	27.56	31	27.20	42	29.35	51	31.00
	53	27.75	43	25.60	32	38.19	54	28.29	53	26.50
	56	25.39	45	27.02	34	37.52	57	26.60	54	32.42
	58	27.80	47	24.92	36	39.40	59	27.46	57	26.64
	61	29.09	49	27.85	37	26.52	60	27.81	59	28.63
	62	27.38	51	34.18	39	34.53	61	29.37	60	26.65
	63	29.77	52	24.51	42	28.50	63	30.37	61	27.88
Promedio:		27.82		26.60		33.59		30.55		28.04

Anexo 6. Cinco métodos de extracción de ADN con los valores Cq utilizadas para evaluar la calidad respectiva del ADN extraído.

