



## Incubación, pre-lisis y post-purificación en el rendimiento y pureza de ácidos nucleicos extraídos de sangre de cabras domésticas contenida en tarjetas FTA



Carolina Sancho-Blanco <sup>a</sup>

Esteban J. Jiménez-Alfaro <sup>b</sup>

Ramón Molina-Bravo <sup>c</sup>

Rodolfo Umaña-Castro <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional, Costa Rica. Campus Omar Dengo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Análisis Genómico (LAGEN). Costa Rica.

<sup>b</sup> Universidad Nacional, Costa Rica. Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar, Escuela de Ciencias Agrarias. Costa Rica.

<sup>c</sup> Universidad Nacional, Costa Rica. Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar, Escuela de Ciencias Agrarias, Laboratorio de Biología Molecular. Costa Rica.

\*Autor de correspondencia: [rodolfo.umana.castro@una.ac.cr](mailto:rodolfo.umana.castro@una.ac.cr).

### Resumen:

Técnicas moleculares requieren extracciones de ácidos nucleicos en cantidad y pureza adecuadas. Este trabajo describe un modelo lineal generalizado (GLM) de un factor ajustado con efectos fijos sobre el rendimiento de ácido nucleico (ng/μl) y la pureza ( $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ ), para cinco métodos de extracción de ADN utilizando tarjetas FTA con sangre de cabra (*Capra aegagrus hircus*). Se ensayaron dos métodos comerciales basados en columnas de sílice (Invitrogen y Macherey Nagel; MN), método resina quelante (Chelex), método CTAB y el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI). Adicionalmente, para MN, se evaluó una etapa de incubación con tampón PBS (Phosphate Buffered Saline) en alta

temperatura previa a la lisis y una etapa de purificación posterior a la extracción utilizando un modelo de efecto fijo de dos factores con interacción. Las concentraciones de ADN y las proporciones de pureza fueron variables; la concentración más alta se obtuvo con el kit MN (170.45 ng/ $\mu$ l), pero con deficiencias en la pureza (0.32 de A260/A230, 0.34 de A260/A280). A pesar de esto, todos los métodos de extracción generaron productos PCR con cebadores específicos D-loop (ADNmt). El efecto combinado de las etapas de pre-incubación y post-purificación arrojó valores de pureza satisfactorios (1.89 para A260/A230 y 1.65 para A260/A280), así como relaciones de concentración (476.78 ng/ $\mu$ l) con baja variabilidad. En conclusión, la concentración y pureza del ADN de muestras de sangre mejora considerablemente cuando se usa un kit comercial en combinación con incubación previa a la lisis y purificación posterior a la extracción. Estos ácidos nucleicos se sugieren para uso en potenciales aplicaciones moleculares a posteriori.

**Palabras clave:** ADN, Columnas de sílice, CTAB, Fenol-cloroformo, Chelex, PCR, Rumiantes menores.

Recibido: 07/12/2020

Aceptado: 05/05/2021

La sangre es comúnmente utilizada para estudios clínicos e investigaciones, al ser una fuente importante de ADN genómico (ADNg) en su fracción de glóbulos blancos<sup>(1)</sup>. Para aplicaciones en zootecnia y veterinaria se recolecta y almacena en tarjetas FTA (Whatman® FTA® Cards), debido a la simplicidad en el transporte y almacenamiento de las muestras por un tiempo prolongado<sup>(2)</sup> y posteriormente empleada en una variedad de aplicaciones genómicas, tales como los marcadores moleculares y la secuenciación de próxima generación<sup>(3)</sup>.

Existen diferentes técnicas de extracción de ADN, con distintos resultados e implicaciones relacionados a los costos, insumos y riesgos para el usuario. La extracción de ADN mediante kits comerciales a través de columnas de sílice o de celulosa, suelen ser procedimientos fáciles de usar y de costos moderados (0.40 a 0.44 dólares)<sup>(4)</sup>, requieren menos tiempo, cantidad de reactivos y representan un menor riesgo para el operador, en comparación con los métodos tradicionales que utilizan sales (cloruro de sodio, sales de guanidina), resinas (Chelex) y compuestos orgánicos (fenol, cloroformo). Los métodos tradicionales permiten la extracción de ácidos nucleicos a un menor costo (0.27 dólares), sin embargo, suelen presentar mayores tiempos de ejecución, limitando la cantidad de muestras que se pueden procesar<sup>(5,6)</sup>.

La extracción por medio de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) es un método comúnmente utilizado, basado en compuestos orgánicos. Éste permite la obtención de una gran cantidad de ADN<sup>(7)</sup>, en tanto el fenol inactiva cualquier potencial nucleasa y remueve proteínas contaminantes del ADN<sup>(8)</sup>, este proceso involucra numerosos pasos con sustancias tóxicas y corrosivas, e incubaciones prolongadas<sup>(6)</sup>. La resina Chelex, es un agente quelante que purifica compuestos a través del intercambio de iones, involucra generalmente procedimientos simples y rápidos, no incluyen solventes orgánicos y no requiere transferencias múltiples de tubo a tubo, sin embargo, reporta la obtención de ADN en cantidad y calidad reducida<sup>(3)</sup>. El método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), ha sido ampliamente utilizado para la extracción de ADN en tejido vegetal, semillas<sup>(9,10)</sup>, tejidos animales<sup>(5,11)</sup>, al igual que el método PCI usa químicos peligrosos y requiere de numerosos pasos que aumentan su tiempo de ejecución, afectando su aplicabilidad a gran escala<sup>(5,12)</sup>.

Los principales parámetros analizados después de una extracción de ácidos nucleicos son la pureza, la concentración y la integridad. La pureza y concentración suelen ser evaluados mediante espectrofotometría UV-VIS y fluorometría. El perfil de absorbancia medido por espectrofotometría permite la detección de contaminantes como proteínas, sales y polisacáridos. Por otra parte, la electroforesis en geles de agarosa es un método común para evaluar la integridad del ADN, ya sea del ADN directamente (llamativa banda de ADN de alto peso molecular) o mediante la visualización de productos PCR a partir de los ácidos nucleicos extraídos<sup>(13)</sup>.

El objetivo del presente estudio fue comparar cinco métodos de extracción a partir de muestras de sangre caprina mantenidas en FTA-cards, de acuerdo con la concentración y la pureza del ADN resultante. Además, en el método más promisorio de extracción, se evaluó el efecto de una pre-incubación con PBS antes de la lisis celular y la post-purificación del eluido con solventes orgánicos.

Se muestrearon 57 caprinos lecheros (*Capra aegagrus hircus*) ubicados en las Regiones Central, Caribe, Norte, Chorotega y Pacífico Central de Costa Rica. La colecta de sangre se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Berumen *et al*<sup>(14)</sup>, colocando aproximadamente 200 µl de sangre en una tarjeta Whatman FTA® (Flinders Technology Associates, UK). Las tarjetas se almacenaron a temperatura ambiente (TA), en un lugar fresco (libre de humedad), a oscuridad y dentro de bolsas herméticas de plástico.

Se utilizaron cinco métodos de extracción: dos de ellos fueron kits comerciales PureLink™ (Invitrogen, USA) y NucleoSpin® Blood (Mackerey Nagel, Alemania); los cuales se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN fue resuspendido en 100 µl de agua doble desionizada libre de nucleasas. El tercer método utilizado fue el de CTAB de Lodhi *et al*, adaptado<sup>(15)</sup>, el cuarto fue por medio de resina Chelex-100 (Bio Rad Laboratories, Inc, USA) y el último método fue por medio de fenol/cloroformo/isoamil-alcohol (PCI). Se

utilizó aproximadamente un cuarto del círculo de la tarjeta FTA en todas las extracciones realizadas con los diferentes métodos. Adicionalmente, previo al tratamiento con el buffer de lisis (propio de cada uno de los protocolos evaluados), se probó en todos los métodos de extracción el efecto de añadir una incubación adicional (pre-incubación), con 200 µl de PBS, Herrero *et al*<sup>(16)</sup> durante 1 h a 42°C, realizando una agitación por inversión cada 10 min. Una vez finalizada la incubación con PBS, se procedió con cada uno de los protocolos de extracción. Se utilizaron tres réplicas por individuo para un total de 174 repeticiones.

En la extracción de ADN a partir de resina Chelex una vez finalizada la hora de incubación con PBS, se agregó 500 µl de resina Chelex®-100 al 10 % y se incubó a 70 °C con proteinasa K (Thermo Scientific, USA), durante 1 h. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm a 4 °C, se aisló un volumen aproximado de 70 µl de sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Se precipitó la muestra adicionando 70 µl de acetato de sodio (NaOAc) 3M (Ambion, USA) y 180 µl de etanol al 96% (Sigma-Aldrich, Alemania) y se incubó durante 20 min a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min. Se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados al pellet resultante con 200 µl de etanol al 70%, dejando secar completamente a 42 °C por 5 min empleando un concentrador Savant™ DNA SpeedVac™ (Thermo Scientific, USA). Finalmente se agregaron 50 µl de buffer TE y se incubó a 37 °C por 30 min para facilitar su resuspensión.

En la extracción de ADN a partir del método CTAB finalizada la incubación con PBS, se adicionaron 750 µl de buffer de lisis (20 mM Na-EDTA, Tris-HCl, pH 8.0 con HCl, 1.4 M NaCl, 2.0% (m/v) PVP y 0.2% (v/v) beta-mercaptoetanol), 8 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Thermo Scientific, USA) y se incubó a 70 °C durante 1 h. Posteriormente se agregaron 750 µl de cloroformo:octanol (24:1) mezclando por inversión. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a TA y se transfirió 300 µl de sobrenadante a un tubo nuevo, adicionando un volumen de isopropanol frío (-20 °C). Se realizó una incubación a -20 °C durante 20 min y se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se secó la muestra completamente a 42 °C por 5 min con el uso de un concentrador SpeedVac (Thermo Scientific, USA). El botón se resuspendió en 50 µl de buffer TE y se incubó a 37 °C por 30 min.

En la extracción de ADN con PCI<sup>(17)</sup>, posterior a la incubación con PBS, se realizó una incubación a 70 °C con 600 µl de buffer STES (0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA y 0.1% SDS) y 8 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Posteriormente, se adicionaron 600 µl de PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a TA. Posteriormente, se aisló la fase superior (acuosa) y se agregó una mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (USB Corporation, USA) en una proporción 1:1. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 min, la fase superior se aisló y se agregaron 100 µl de NaOAc 3M (pH 5.2) y 750 µl de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, Alemania). Se incubó 20 min a -20 °C y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C para recuperar

los ácidos nucleicos. Se eliminó el sobrenadante y el botón de ADN precipitado, se lavó con 500 µl de etanol al 70%, luego se centrifugaron a 18,000 rpm durante 2 min a TA y se removió el sobrenadante por decantación. El botón se secó completamente a 42 °C por 5 min en un bloque térmico. Una vez que el alcohol se evaporó, se resuspendió el ADN con 100 µl de agua doble desionizada libre de nucleasas y se incubó a 37 °C por 30 min.

Todas las muestras de ADN genómico extraído fueron evaluadas mediante movilización electroforética en geles de agarosa al 1% (buffer TBE 0.5%), a 80 V, 400 mA por 45 min. La pureza (coeficientes  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ ) y la concentración de las muestras se obtuvieron mediante espectrofotometría de microvolúmenes UV-visible NanoDrop 2000™ (Thermo Scientific, USA).

Una vez realizadas todas las extracciones, se seleccionó el método que arrojó las mayores cantidades de ADN recuperado (ng/µl), y se le realizó una purificación adicional mediante fenol-cloroformo<sup>(17)</sup> con un volumen inicial de 100 µl. Se agregaron 50 µl de fenol (pH 8.0) y 50 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (USB Corporation, USA). Se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a TA. Se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo. Se agregó 1/10 de volumen de NaOAc 3M (pH 5.2) (Ambion, USA) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (Sigma-Aldrich, Alemania) y se mezcló por inversión. Se incubó a -20 °C por 20 min y se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 70 µl con agua doble desionizada libre de nucleasas.

Se evaluó la integridad del ADN total y el posible efecto de inhibición por contaminantes traza del método de extracción por medio de una PCR tiempo final (volumen final: 20 µl), por triplicado y compuesta por 1X de PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA), 0.8 µM de cada cebador y 1 µl ADN total (pero no con concentraciones equivalentes). La selección de las muestras fue aleatoria. Se amplificó la región D-loop del ADN mitocondrial (ADNmt) caprino utilizando los cebadores DAF (5'TTCTTCAGGGCCATCTCATC3') y DGR (3'GCGGATGCATGGTGAAAT5')<sup>(18)</sup>, sintetizados por MACROGEN (Corea). La PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones de ciclado: 94 °C por 3 min (desnaturalización inicial), 35 ciclos de: 94 °C por 30 seg (desnaturalización), 55 °C por 30 seg (alineamiento), 72 °C por 45 seg (extensión) y finalmente 72 °C por 10 min como extensión final. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (TBE 1X), 80 V, 400 mA durante 60 min en solución tampón TBE 1X (pH 8.0, Invitrogen, USA).

El análisis estadístico fue realizado en PROC GLM de SAS. Se ajustó un modelo de efecto fijo de una vía para la comparación de los cinco métodos y un modelo de efecto fijo de dos vías con interacción para la evaluación de la incubación y la purificación mediante una prueba de Levene, buscando evidencia de homogeneidad de varianza. Se realizaron las pruebas de comparaciones múltiples entre los tratamientos empleando el procedimiento de

Tukey. En todos los casos se consideraron significativos los valores del estadístico asociado con  $\alpha < 0.05$ .

Los resultados obtenidos en este estudio arrojaron que los cinco protocolos de extracción realizados (Invitrogen, MN, Chelex, CTAB y PCI) difirieron en pureza ( $A_{260}/A_{230}$  y  $A_{260}/A_{280}$ ) y cantidad del ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ). Al evaluar la concentración mediante la absorbancia a 260 nm, las mayores concentraciones y medida de dispersión se obtuvieron con los métodos MN ( $170.45 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 74.82$ ) e Invitrogen ( $29.70 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 25.31$ ). En cuanto a los protocolos con solventes orgánicos, el CTAB mostró los mejores valores de rendimiento de ADN extraído, seguido por Chelex y por último el de PCI ( $10.35 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ,  $2.96 \text{ ng}/\mu\text{l}$  y  $2.23 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , respectivamente) (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Medición de razones  $A_{260}/A_{230}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  y cuantificación de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) obtenido por espectrofotometría Nanodrop de muestras sanguíneas de cabras sometidas a cinco métodos de aislamiento de ácidos nucleicos

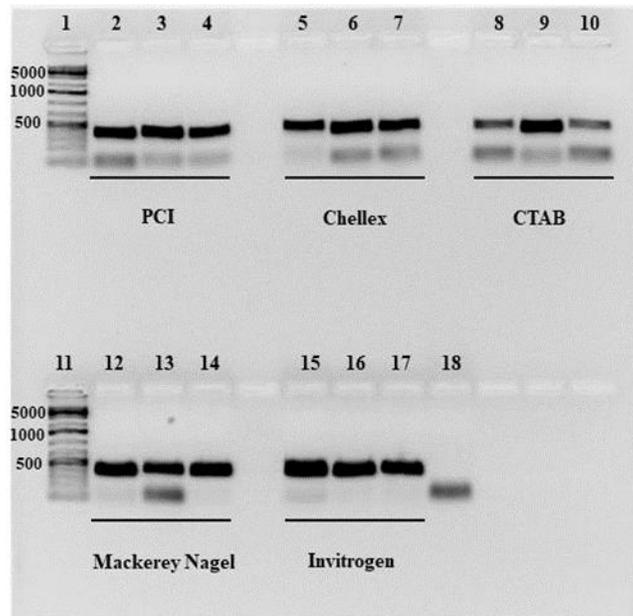
Método	n	$A_{260}/A_{230}$		$A_{260}/A_{280}$		ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE
Invitrogen	9	0.38 <sup>a</sup>	0.09	0.45 <sup>a</sup>	0.22	29.70 <sup>b</sup>	25.31
CTAB	10	0.14 <sup>b</sup>	0.02	0.74 <sup>a</sup>	0.09	10.35 <sup>c</sup>	8.30
PCI	17	0.37 <sup>a</sup>	0.22	1.23 <sup>b</sup>	0.53	2.23 <sup>d</sup>	1.39
Chelex	10	0.26 <sup>a</sup>	0.15	1.17 <sup>c</sup>	0.69	2.96 <sup>e</sup>	2.04
MN	36	0.32 <sup>a</sup>	0.02	0.34 <sup>a</sup>	0.02	170.45 <sup>a</sup>	74.82

n= número de muestras analizadas; DE= desviación estándar; CTAB= bromuro de hexadeciltrimetilamonio; PCI= fenol-cloroformo-alcohol isoamílico; MN= Mackerey Nagel.

<sup>abcde</sup> Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ). Las letras diferentes por columna corresponden a diferencias significativas con  $\alpha < 0.05$ .

Con respecto a la contaminación debida a proteínas ( $A_{260}/A_{280}$ ), no se encontraron diferencias significativas entre los métodos comerciales, mientras que en los protocolos de solventes orgánicos se detectaron diferencias estadísticas entre los tres, siendo PCI el que mejor rendimiento mostró seguido de Chelex y CTAB (1.23, 1.17 y 0.74), respectivamente. Los valores de pureza asociados a los coeficientes de  $A_{260}/A_{280}$  se encontraron por debajo de 1.8 en todas las extracciones, siendo los métodos comerciales los que mostraron valores más bajos MN (0.34) e Invitrogen (0.45). Además, todas las razones  $A_{260}/A_{230}$  mostraron valores muy inferiores a 1.5. Sin embargo, los valores más bajos de  $A_{260}/A_{230}$  correspondieron a los ADN extraídos mediante CTAB (0.14), seguido del método Chelex (0.26) (Cuadro 1). A pesar de ello, la concentración de ADN y los coeficientes de pureza no afectaron la obtención de amplificaciones parciales de la región D-loop a partir de una PCR (294 pb, accesiones genbank: MW514310 y MW514311), ya que se generaron amplicones para todas las muestras analizadas, independientemente del método de extracción utilizado (Figura 1).

**Figura 1:** Amplificación parcial del gen D-loop mitocondrial por medio de PCR de los cinco diferentes métodos de extracción de ADN a partir de sangre de *Capra aegagrus hircus*



Carriles 1 y 11: marcador de tamaño molecular (1Kb Thermo Fisher Scientific). 2-4: amplificaciones de muestras extraídas por método PCI. 5-7: método Chellex. 8-10: método CTAB 12-14: método MN. 15-17: método Invitrogen. 18: control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

Con base en el rendimiento promisorio de la concentración de ADN obtenida por el método MN, y la ejecución de pasos adicionales como supuesto de una mejoría en rendimiento y calidad de los ácidos nucleicos, se observó que la incubación-purificación aumentó significativamente la concentración de ADN (476.78 ng/μl), así como la pureza de las extracciones realizadas (Cuadro 2, Figura 2). La magnitud de la diferencia entre las medias de la concentración de los ácidos nucleicos, a partir del método sin modificación (170.45 ng/μl) respecto a incubación-purificación fue de 306.33 ng/μl, mientras que cuando únicamente se purificó, el incremento fue de 80.63 ng/μl, y finalmente de 10.53 ng/μl cuando solo se incubó. Por otro lado, la pureza reflejada en los coeficientes  $A_{260}/A_{230}$  y  $A_{260}/A_{280}$  para el método MN presentó una mejora (1.89 y 1.65, respectivamente) en cuanto a los valores obtenidos de no incubación – no purificación (0.32 y 0.34, respectivamente).

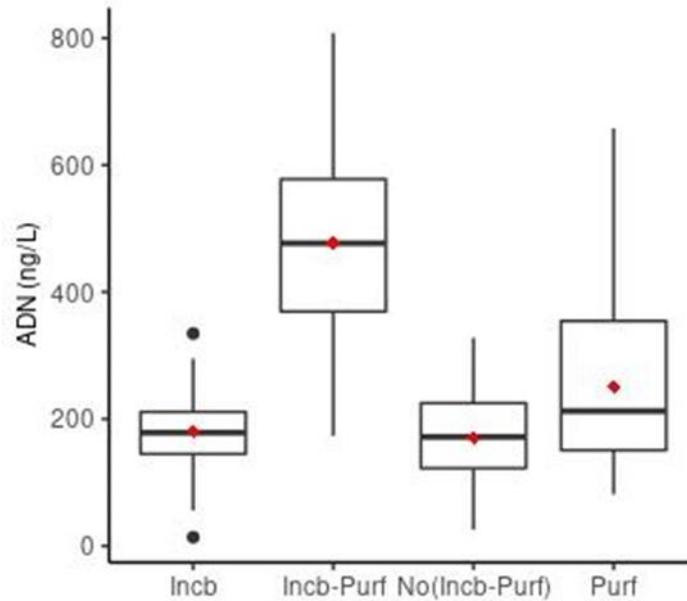
**Cuadro 2:** Efecto de la preincubación con PBS previo a la lisis celular y post-purificación del eluido con fenol:cloroformo en la extracción ADN con el método MN a partir de sangre contenida en tarjetas FTA

	n	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>		A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>		ADN (ng/μl)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE
Incubación-Purificación	36	1.89 <sup>a</sup>	0.21	1.65 <sup>a</sup>	0.20	476.78 <sup>a</sup>	164.37
Incubación	36	0.33 <sup>b</sup>	0.03	0.35 <sup>b</sup>	0.03	180.98 <sup>b</sup>	62.40
Purificación	36	2.02 <sup>c</sup>	0.16	1.66 <sup>a</sup>	0.13	251.08 <sup>c</sup>	126.47
No Incubación-No Purificación	36	0.32 <sup>d</sup>	0.02	0.34 <sup>c</sup>	0.02	170.45 <sup>d</sup>	74.82

n= número de muestras analizadas; DE= desviación estándar.

<sup>abcde</sup> Las letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

**Figura 2:** Distribución de las concentraciones de ácidos nucleicos (ng/μl) de acuerdo con las modificaciones realizadas al protocolo MN



Incb= solo incubación; Incb-Purf= incubación y purificación combinadas como modificaciones en el método;

No(Incub-Purf)= sin incubación y sin purificación; Purf= solo purificación.

Líneas horizontales en las cajas representan la mediana, las líneas verticales representan los límites superior e inferior, los rombos dentro de las cajas, la media y los círculos fuera de las cajas, representan valores atípicos por debajo o por encima de la media.

Resultados preliminares en cuanto a la concentración de ADN obtenido en los métodos sin un paso de pre-incubación de la tarjeta (2 a 170 ng/μl), podrían indicar que los glóbulos blancos retenidos en la tarjeta FTA no se liberaron del soporte sólido o no ocurrió la digestión óptima de la membrana celular. Por ello, la adición de un paso de purificación junto con un paso pre-incubación en el método MN, generó aumentos significativos en cuanto a los

rendimientos de la extracción en términos de concentración y pureza. Por otro lado, otros autores, al igual que en esta investigación, reportaron poca variabilidad y desviaciones pequeñas en la concentración del ADN al usar un kit comercial<sup>(19)</sup>.

Los resultados de este trabajo mostraron que todas las extracciones realizadas presentaron valores de pureza  $A_{260}/A_{280}$  por debajo de lo recomendado (1.8 a 2.0)<sup>(20)</sup>. Sin embargo, a pesar de estos valores no óptimos (proteínas residuales y contaminantes traza) obtenidos en los cinco métodos de extracción de ADN, no se observó inhibición de las reacciones enzimáticas por PCR. Aplicaciones moleculares más sensibles tales como secuenciación Sanger, genotipado PCR-RFLP, microarreglos o NGS, podrían verse afectadas por la presencia de sales, solventes orgánicos, EDTA, nucleasas y proteínas contaminantes que se acarrean en los ADN aislados<sup>(21-24)</sup>. Los bajos valores obtenidos con el coeficiente  $A_{260}/A_{230}$  en muestras extraídas a partir de los kits comerciales pudo deberse a compuestos con absorción a 230 nm actuando como contaminantes traza, los cuales incluyen sales caotrópicas como el tiocianato de guanidina<sup>(25)</sup>, EDTA, detergentes no iónicos como Triton™ X-100 y Tween®, proteínas, aminoácidos<sup>(20,25)</sup>, fenol, polisacáridos y otras partículas sólidas flotantes como las fibras de sílice. En el caso de la extracción de ADN basado en protocolos con solventes orgánicos (PCI y CTAB), valores de  $A_{260}/A_{230}$  por debajo de lo esperado pudo deberse a factores como errores al separar la fase acuosa de la interfase o al acarreo de contaminantes como fenol, cloroformo en los pasos sucesivos en la extracción. En el caso de las resinas de intercambio iónico (Chelex), los valores inferiores pudieron deberse a contaminación por proteínas<sup>(26)</sup>.

Los resultados demuestran las limitaciones de extraer ADN a partir de tarjetas FTA que retienen muestras de sangre de caprinos, para su uso en aplicaciones genómicas posteriores. Sin embargo, se obtuvieron resultados positivos en el aislamiento y purificación del ADN total utilizando el kit comercial NucleoSpin® Blood de Mackerey Nagel (MN) para análisis moleculares en rumiantes menores, con la salvedad de la ejecución de procedimientos adicionales que aseguren la calidad y pureza de los ácidos nucleicos para uso en técnicas con requerimientos de alta concentración e integridad del ADN.

### **Agradecimientos**

Esta investigación se realizó en el marco del proyecto de investigación “Caracterización genómica de caprinos lecheros y ovinos de carne costarricenses, para la identificación de individuos promisorios como base de un programa de mejoramiento genético” SIA 0178-16.

### Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

### Literatura citada:

1. Guha P, Das A, Dutta A, Chaudhuri T. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. *Clin Lab Anal* 2018;32(1):22181.
2. Osorio J, Pachajoa H, Hurtado P. Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. *Rev Estomat Salud* 2013;21(1):35-38.
3. Stowell L, Bentley E, Gagne R, Gustafson K, Rutledge L, Ernest H. Optimal DNA extractions from blood on preservation paper limits conservation genomic but not conservation genetic applications. *J Nat Conserv* 2018;46(1):89-96.
4. Poh J, Ken-En GS. Comparison of customized spin-column and salt-precipitation finger-prick blood DNA extraction. *Biosci Rep* 2014;34(5):629-634.
5. Schiebelhut LM, Abboud SS, Gómez LE, Swift HF, Dawson MN. A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. *Mol Ecol Resour* 2016;17(4):721-729.
6. Montgomery GW, Sise JA. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *NZ J Agr Res* 1990;33(3):437-441.
7. Ghaheri M, Kahrizi D, Yari K, Babaie A, Suthar RS, Kazemi E. Comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cell Mol Biol* 2016;62(3):120-124.
8. Di Prieto F, Ortenzi F, Tilio M, Concetti F, Napolioni V. Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15- to 30-years at 20° C by rapid phenol chloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies. *Mol Cell Probes* 2011;(1):44-48.
9. Siegel, CS, Stevenson FO, Zimmer EA. Evaluation and comparison of FTA card and CTAB DNA extraction methods for non-agricultural taxa. *Appl Plant Sci* 2017;5(2): 1600109
10. Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA Extraction Methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem* 2010;396(6):1977-1990.

11. Chakraborty S, Saha A, Neelavar A. Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits?. *3Biotech* 2020;10(2):69.
12. Boesenberg-Smith KA, Pessarakli MD, Wolk DM. Assessment of DNA yield and purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clin Microbiol Newsl* 2012;34(1):1-6.
13. Quinet C, Czaplicki G, Dion E, Dal Pozzo F, Kurz A, Saegerman C. First results in the use of bovine ear notch tag for bovine viral diarrhoea virus detection and genetic analysis. *PloS one* 2016;11(10):e0164451.
14. Berumen A, Palomera CL, Ojeda N. Manual de prácticas de la asignatura de clínica de ovinos y caprinos. Tabasco, México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; 2010.
15. Lodhi MA, Guang-Ning Y, Norman FW, Bruce IR. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species. *Plant Mol Biol Rep* 1994;12(1):6-13.
16. Herrero L, Ávila R, Corrales E, Hun L. Procedimientos en virología médica. 1 era ed. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica; 2004.
17. Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006; pdb-prot4455.
18. Kumar D, Singha SP, Singh R, Nagappa SK. A Highly specific PCR assay for identification of goat (*Capra hircus*) meat. *Small Ruminant Res* 2011;97(1-3):76-78.
19. Ríos-Sánchez E, Calleros E, González-Zamora A, Rubio J, Martínez OC, Martínez A, Hernández S, Pérez-Morales R. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Univ* 2016;26(4):56-65
20. Neill MO, McPartlin JMc, Arthure K, Riedel S, McMillan ND. Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *J Phys Conf Ser* 2011;307(1): 012047.
21. Caboux E, Lallemand C, Ferro G, Hémon B, Mendy M, Biessy C, *et al.* Sources of pre-analytical variations in yield of DNA extracted from blood samples: analysis of 50,000 DNA samples in EPIC. *PLoS one* 2012;7(7):e39821.
22. Psifidi A, Dovas CI, Bramis G, Lazou T, Russel CL, Arsenos G, *et al.* Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLoS one* 2015;10(1):e0115960.

23. Koshy L, Anju AL, Harikrishnan S, Kutty VR, Jissa VT, Kurikesu I, *et al.* Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. *Mol Biol Rep* 2016;44(1):97-108.
24. Li Q, Wang X, Li X, He X, Wan Q, Yin J, *et al.* Obtaining high-quality blood specimens for downstream applications: a review of current knowledge and best practices. *Biopreserv Biobank* 2018;16(6):411-418.
25. Koetsier G, Cantor E. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometer. *New England Biolabs Inc* 2019;1-8.
26. Singh UA, Kumari M, Iyengar S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biol Proced Online*. 2018;20(1):12.