

# Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas.

CERVANTES GONZALES, Jorge Luis\*

## SUMMARY

Obtaining deoxyribonucleic acid (DNA) is the starting point for most genetic analysis. Nails are an accessible source of DNA. The present communication reports the successful extraction of genomic DNA from fresh nails, as well as from nails collected a month before the extraction. Amplification in two different regions of the human beta-globin gene was achieved by of the polymerase chain reaction. The described method, is a simple, non invasive method. Nail clipping material may be considered a convenient material for genetic analysis. (*Rev Med Hered 2003; 14:230-233*).

**KEY WORDS:** DNA, nails, beta-globin.

## INTRODUCCION

La biología molecular es una de las herramientas más útiles de las que se vale hoy en día la ciencia y la medicina moderna. La obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos; incluso contando con pequeñas cantidades de ADN, es posible amplificar genes específicos *in vitro* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en Inglés : Polymerase Chain Reaction) (1). Esta revolucionaria técnica le valió a su inventor, Kary B. Mullis, el premio Nobel de química en 1993.

En algunas circunstancias, cuando no es posible obtener muestras de sangre, el ADN obtenido a partir de cabellos o bulbos capilares puede ser utilizado para análisis genéticos (2). Tomar una muestra de cabello es sencillo, permite el muestreo de un gran número de sujetos en menor tiempo, con un mínimo de aflicción causada (3). Sin embargo extraer un cabello (junto con el bulbo capilar) puede ser doloroso en algunas situaciones, e imposible en animales de laboratorio carentes de pelaje(4).

Las uñas son otra fuente accesible de ADN. Son especialmente útiles en casos en lo que se ha realizado trasplante alogénico de médula ósea, y se necesita identificar el origen de las células hematopoyéticas post-trasplante, y donde debido al reemplazo de las células sanguíneas, debe obtenerse ADN de muestras distintas a la sangre periférica (5). Es también de invaluable utilidad en casos de medicina forense, donde el material de evidencia, y única fuente de ADN son uñas (6).

El presente reporte describe la extracción de ADN a partir de uñas recortadas, y su utilización en la amplificación de una porción del gen de b-globina humana.

## MATERIAL Y METODOS

### *Extracción de ADN*

Se obtuvieron uñas de un adulto masculino de 30 años, utilizando un corta uñas ordinario, previamente sumergido en etanol al 70%. Aproximadamente 150 mg de uñas recortadas fueron incubadas a 55°C por 72 horas en una solución de lisis, conteniendo 2ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0 (Nacalai Tesque Inc., Japan), 200

---

\* Médico egresado de la Universidad Peruana Cayetano Heredia  
Departamento de Virología, Facultad de Medicina - Universidad de Kagoshima, Kagoshima Japón.

ml de proteinasa K (20 mg/ml)(Boehringer Mannheim, Germany), y 200 ml de una solución al 10% de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Valley Biomedical Inc., USA). Luego de la digestión, el ADN fue extraído del sobrenadante utilizando columnas conteniendo una matriz de fibra de vidrio (7,8) (GFX Genomic Blood Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### Concentración de DNA

La concentración de DNA fue calculada utilizando un espectrofotómetro (Gene Quant II, Pharmacia Biotech), a partir de densidad óptica de lectura a 260 nm.

#### Amplificación del gen de beta-globina humana

El ADN extraído fue utilizado para amplificar una región de 262 pares de bases (pb) del exon 1 del gen de b-globina humana utilizando los cebadores (“primers”) KM 29 (5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG -3') y KM38 (5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG -3') (1). El protocolo de amplificación en un volumen de 50 ml, incluye 0.8-1 mg de ADN, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 pmol de cada cebador (“primer”) KM 29/KM 38, y 2.5 U de AmpliTaq Gold polimerasa (Roche Molecular System, Somerville, New Jersey). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando un termociclador Perkin-Elmer 9700, bajo las siguientes condiciones: Activación de la polimerasa a 95°C por 9 min, 40 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, adhesión de los cebadores a las cadenas complementarias (“annealing”) a 58°C por 60 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos, y una extensión final a 60°C por 10 minutos.

Un par diferente de cebadores, BGH20/BPC04 (Roche Molecular Systems, Alameda, CA), que amplifican un fragmento de 268 pb del gen de b-globina humana ADN, fueron también utilizados. El protocolo de amplificación en un volumen de 50 ml, incluye 0.1 mg de ADN, 5 ml de 10xPCR Buffer II (Roche, Applied Biosystems), 8 ml de solución de MgCl<sub>2</sub> (Roche, Applied Biosystems), 1 ml de dNTPs (10mM de dATP, dCTP, dGTP, y 30mM de dUTP), 1 ml de cada cebador BGH20/BPC04 (50 mM), 0.75 ml de AmpliTaq Gold polimerasa 5U/ml(Roche Molecular System, Somerville, New Jersey). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando un termociclador Perkin-Elmer 9700, bajo las siguientes condiciones : Activación de la polimerasa a 95°C por 9 min, 40 ciclos de de denaturación a 95°C por 30 segundos, adhesión de los cebadores a las cadenas complementarias (“annealing”) a 55°C por 60 segundos, y extensión a

72°C por 60 segundos, y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

#### Controles

ADN humano de control (derivado de una célula B linfoblastoide) (DynaL Biotech Ltd.) se utilizó como control positivo. Un tubo conteniendo todos los reactivos pero en ausencia de ADN, se incluyó como control negativo.

#### Análisis de los productos de amplificación

Los productos de amplificación del gen de b-globina humana, fueron visualizados en geles de agarosa-ME (Nacalai Tesque, Japan) al 3% (100 voltios, por 30 minutos). El gel fue teñido con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio (Nacalai Tesque, Japan) y analizado por transiluminación ultravioleta: pBR322 Hae III Digest (Sigma-Aldrich Inc.) fue utilizado como marcador de peso molecular.

## RESULTADOS

La diferencia entre el peso del material seco (en este caso las uñas recortadas) antes de la digestión, y el peso del residuo sólido remanente luego de la digestión es lo que se ha descrito como total de masa digerida (9). La extracción de ADN a partir de uñas frescas, así como de uñas obtenidas y preservadas en etanol al 100% por espacio de un mes antes de la extracción, rindió cantidad , suficiente de ADN genómico para permitir la amplificación de una porción del gen de la b-globina humana por medio de PCR (Tabla N°1).

Se obtuvo amplificación por PCR en dos regiones diferentes del gen de beta-globina humana. Los productos de amplificación analizados en gel de agarosa al 3%, para un fragmento de 262 pb del exon1 del gen de b-globina humana utilizando los cebadores KM29/KM38, se muestran en la Figura N°1. Los productos de amplificación del gen de b-globina humana por los cebadores BGH20/BPC04 (268 pb), se muestran en la Figura N°2.

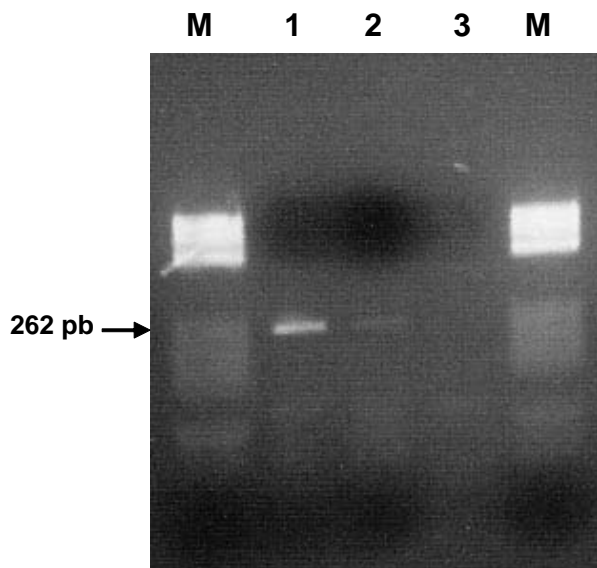
**Tabla N°1. Especificaciones y resultados del análisis de ADN extraído de uñas.**

	Masa de material fresco (mg)	Total de masa digerida (mg)	Cantidad total de ADN extraído (mg)	Concentración de ADN (pg/ml)
Uñas frescas	49	14,1	4,1	43
Uñas (1 mes)	29	12,2	2,8	30,1

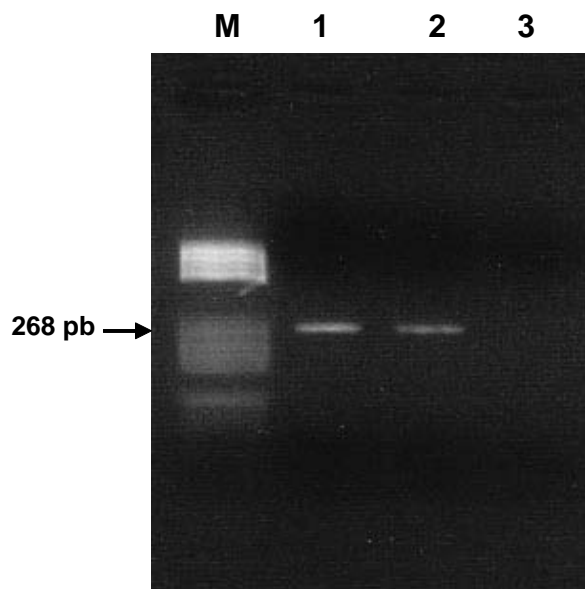
## DISCUSION

Las uñas son una fuente útil de ADN para análisis por PCR y otras técnicas de biología molecular. Este material puede en ocasiones ser de elección debido a su relativa resistencia a la putrefacción, y su relativa comodidad para el donante en comparación con una muestra de sangre. El ADN genómico extraído a partir de uñas ha sido utilizado para análisis genético de genes que codifican para enzimas (10), tipificación de alelos de histocompatibilidad (4,9,11) e incluso detección de ácido nucleico de agentes infecciosos (12).

El método de extracción presentado representa una modificación simplificada de un protocolo previamente publicado (9), disminuyendo el costo de los reactivos a utilizar. Las columnas de separación utilizadas en este reporte permiten la purificación de ADN en un tiempo muy corto, sin embargo resultados similares pueden obtenerse por medio de la precipitación del ADN en etanol (10), abaratando aún más los costos del procedimiento.



**Figura N° 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% (100V por 30 minutos) de los productos de amplificación de un fragmento de 262 pb del exon1 del gen de  $\beta$ -globina humana por los cebadores KM29/KM38. M: Marcador de peso molecular pBR322 Hae III. La calle 1 muestra el Control positivo (ADN humano de control), la calle 2 : El producto de amplificación utilizando ADN extraído y purificado a partir de uñas. La calle 3, el control negativo, muestra la ausencia de amplificación en ausencia de DNA.



**Figura N°2.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% (100V por 30 minutos) de los productos de amplificación del gen de  $\beta$ -globina humana por los cebadores BGH20/BPC04. El tamaño del fragmento amplificado es de 268 pb. M: Marcador de peso molecular pBR322 Hae III. La calle 1 muestra el Control positivo (ADN humano de control), la calle 2 : El producto de amplificación utilizando ADN extraído y purificado a partir de uñas. La calle 3, el control negativo, muestra la ausencia de amplificación en ausencia de DNA.

Las muestras frescas, así como de uñas obtenidas y preservadas en etanol al 100% por espacio de un mes, rindieron cantidad suficiente de ADN genómico. En este reporte el ADN extraído, probó ser de origen humano, al conseguir amplificar el gen de beta-globina humana por medio de PCR. Si bien es cierto que la señal de amplificación fue menos intensa que la del control positivo, la amplificación fue igualmente exitosa utilizando un par diferente de cebadores para este mismo gen.

En conclusión, ADN genómico pudo extraerse exitosamente a partir de uñas recortadas, por el método descrito. La amplificación de dos regiones diferentes del gen de beta-globina humana por medio de PCR, pudo realizarse en el ADN extraído, Probando ser un método simple, no invasivo, las uñas recortadas pueden ser un material de elección para análisis genético por PCR.

**Correspondencia:**

Jorge Cervantes  
jccervantes@medscape.com

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
2. Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature*. 1988;332(6164):543-6.
3. Schmitteckert EM, Prokop CM, Hedrich HJ. DNA detection in hair of transgenic mice—a simple technique minimizing the distress on the animals. *Lab Anim*. 1999 ;33(4):385-9.
4. Kaneshige T, Takagi K, Nakamura S, Hirasawa T, Sada M, Uchida K. Genetic analysis using fingernail DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(20):5489-90.
5. Uchida S, Wang L, Yahagi Y, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T. Utility of fingernail DNA for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation and for diagnostic testing for transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood*. 1996;87(9):4015-6.
6. Oz C, Zamir A. An evaluation of the relevance of routine DNA typing of fingernail clippings for forensic casework. *J Forensic Sci*. 2000;45(1):158-60.
7. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(2):615-9.
8. Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal Biochem*. 1982;121(2):382-7
9. Tahir MA, Watson N. Typing of DNA HLA-DQ alpha alleles extracted from human nail material using polymerase chain reaction. *J Forensic Sci*. 1995;40(4):634-6
10. Nishiyori A, Fukuda K, Ogimoto I, Kato H. Detection of ADH2(1) and ADH2(2) alleles in fingernails from Japanese. *Clin Chem*. 1998;44(3):675-6.
11. Tanaka N, Masuko T, Ishii S. A retrospective study using nail clippings of rheumatoid susceptible alleles of HLA-DRB1 as a prognostic factor in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999;26(4):767-72.
12. Nishiyori A, Fukuda K, Sata M, Tanikawa K. HBV DNA can be detected from nail clippings of HBs Ag positive patients. *Kurume Med J*. 2000;47(1):95-6.