

## RENDIMIENTO DE PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE BOVINOS CRIOLLOS<sup>1</sup>

*Axel Villalobos-Cortés<sup>2</sup>; Rita González-Herrera<sup>3</sup>*

### RESUMEN

Con el objetivo de comparar cinco volúmenes de reactivo comercial aplicado en la extracción de ADN en pelo de bovino, se tomaron muestras aleatorias de pelo de la zona caudal de 25 bovinos criollos de la razas Guaymí y Guabalá. Se obtuvo la concentración de ADN en nanogramos por microlitro (ng/ul) y se determinó la pureza mediante la relación entre la absorbancia 260 nm y 280 nm (R) para cada una de las muestras. Los resultados del análisis para los tratamientos realizados, no mostraron diferencias significativas para el valor de R. Sin embargo para la concentración, se observaron diferencias entre el tratamiento 5 y 4 ( $P=0,019$ ) y tratamiento 5 y 1 ( $P=0,021$ ). La media general de R fue  $1,77 \pm 0,22$  y para concentración fue de  $34,96 \pm 7,18$  ng/ul. Los valores observados en R oscilaron entre  $1,37 \pm 0,60$  en el tratamiento 3 y  $2,24 \pm 0,61$  en el tratamiento 2. En cuanto a la concentración de ADN, los valores oscilaron en  $12,28 \pm 12,98$  ng/ul en el tratamiento 4 y  $75,21 \pm 14,04$  ng/ul en el tratamiento 5. Se logró extracción de ADN genómico en todos los tratamientos con similares valores de pureza. Se produjo una optimización de hasta cinco veces la capacidad de extracción del producto comercial y una reducción del costo por muestra; además se simplificó la secuencia de pasos del protocolo al utilizar un termociclador en el proceso total de extracción.

**PALABRAS CLAVES:** Biotecnología, biodiversidad, biología molecular, genética.

---

<sup>1</sup> Recepción: 6 de septiembre de 2016. Aceptación: 25 de octubre de 2016. Proyecto Conservación y uso de diversidad genética del bovino criollo panameño.

<sup>2</sup>Ph.D. en Conservación y mejora animal. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC). e-mail: villalobos.axel@gmail.com

<sup>3</sup>Lic. en Biotecnología. IDAIP. CIAC. e-mail: carolina\_0190@hotmail.com

## EXTRACTION PERFORMANCE PROTOCOL CREOLE CATTLE DNA

### ABSTRACT

In order to compare five volumes of commercial reagent applied in the extraction of bovine DNA in plucked hair, random samples of hair from the tail area of 25 Creole cattle breeds Guaymi and Guabala were taken. DNA concentration in nanograms per microliter (ng/ul) was obtained and the purity was determined by the relationship between absorbance at 260 nm and 280 nm (R) for each of the samples. The results of the analysis conducted for treatments showed no significant differences for the value of R. However, for concentration, a significant differences between treatment 5 and 4 ( $P = 0,019$ ) and treatment 5 and 1 ( $P = 0,021$ ) were observed. The overall average of R was  $1,77 \pm 0,22$  and concentration was  $34,96 \pm 7,18$  ng/ul. The observed values of R ranging from  $1,37 \pm 0,60$  in treatment 3 and  $2,24 \pm 0,61$  in treatment 2. As to the DNA concentration, the values were in  $12,28 \pm 12,98$  ng/ul in the treatment 4 and  $75,21 \pm 14,04$  ng/ul in the treatment 5. Genomic DNA extraction was achieved in all treatments with similar values of purity. Optimization occurred up to five times extraction capacity of the commercial product and reduced cost per sample; also the sequence of steps of the protocol using a single thermal cycler in the total extraction process was simplified.

**KEY WORDS:** Biotechnology, biodiversity, molecular biology, genetics.

### INTRODUCCIÓN

La aplicación de métodos moleculares en el estudio de genes, ya sea de resistencia o productivos en especies animales, requiere de una fuente de ADN que permita ser transportada de manera que la molécula no pierda su integridad. Existen diversas fuentes para obtener ADN genómico, como el caso de la sangre, pelo, saliva y semen entre otros (Bates *et al.* 1991, Campbell *et al.* 1997, Bastos *et al.* 2000, Castañeda *et al.* 2004). Sin embargo, la muestra de ADN de pelo es una forma no invasiva, fácil de

transportar, genera un mínimo riesgo de contaminación durante su procesamiento y permanece viable por mayor tiempo. La medición mediante fluorescencia en el extremo de la raíz del cabello recién cortada se puede obtener hasta 0,5 ug de ADN, mientras que el eje del cabello contiene muy poca cantidad (Kumar *et al.* 2005). Se han ensayado metodologías para aislar el ADN a partir de muestras de pelo, pero estos métodos tardan mucho tiempo o requieren costosos productos químicos (Kumar *et al.* 2005).

Diversos laboratorios con bajos presupuestos se enfrentan ante la disyuntiva de elaborar sus propios reactivos para la extracción de ADN o utilizar reactivos comerciales. En ambos casos, lo importante es que el método utilizado sea eficiente, inocuo para la salud del investigador y adecuado al presupuesto. Existen varios métodos de extracción de ADN de pelo y otras fuentes como sangre o tejidos de manera artesanal, que en muchas ocasiones se obtienen buenos resultados, sin embargo depende de cada laboratorio elaborar adecuadamente los reactivos y bajo las condiciones necesarias que les permita mantener resultados consistentes (Miller *et al.* 1988, Bauerová *et al.* 1996, Drissing *et al.* 1996).

Los métodos de extracción de ADN comerciales representan una buena alternativa para el trabajo de laboratorio, siempre y cuando no represente un incremento sustancial del costo operativo y se adecue a las necesidades del laboratorio que requiera su uso. Además, el tiempo que se requiere para realizar la extracción es importante, particularmente cuando el volumen de muestras es alto.

Dentro de los protocolos comerciales de extracción, una nueva solución de extracción de ADN desarrollada por Epicentre, permite el

procesamiento de las muestras utilizando un protocolo muy simplificado. Una de las indicaciones de este reactivo es el uso de ADN de pelo humano; el mismo requiere ser mezclado y pasos de calentamiento y no requiere centrifugación o extracción con disolventes orgánicos lo que permite un tiempo de manipulación muy breve. El rendimiento de ADN obtenido utilizando esta solución va de 2 a 14 ug de ADN.

El objetivo de este trabajo fue modificar el protocolo de extracción de ADN de una solución de extracción comercial con la finalidad de incrementar la eficiencia del mismo y disminuir el costo de cada prueba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se adquirió cinco diferentes volúmenes de un protocolo comercial con la finalidad de optimizar su uso bajo condiciones de micro preparados en tubos de 250 ul, para la extracción de ADN genómico en estudios de diversidad genética bovina. El trabajo se realizó en el laboratorio de Agrobiotecnología del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, Carretera Panamericana, km 214, Divisa, provincia de Herrera. Se tomaron muestras aleatorias de pelo de la zona caudal de 25 bovinos criollos de la razas Guaymí y Guabalá distribuidas de la siguiente manera: tratamiento 1: 500 ul (cantidad recomendada por el fabricante),

tratamiento 2: 400 ul, tratamiento 3: 300 ul, tratamiento 4: 200 ul y tratamiento 5: 100 ul. El protocolo consistió en tomar cinco tubos de 1,5 ml para cada tratamiento y agregar 10 muestras de 1,0 cm de pelo de la cola, previamente desinfectadas con agua desionizada y etanol 100%, según Kumar *et al.* 2005.

Los pelos fueron transferirlos a cada tubo de 1,5 ml del reactivo comercial; se aplicó vórtex por 15 segundos; luego se incubaron a 65° C por 6 minutos en un enfriador electrónico; nuevamente se aplicó vórtex por 15 segundos y se incubaron a 98° C por 2 minutos en un evaporador analítico. El rendimiento teórico de ADN reportado por el fabricante es de 2 ng/ul a 14 ng/ul por cada muestra de pelo de 0,5 cm a 1,0 cm. El ADN extraído fue cuantificado mediante un espectrofotómetro donde se obtuvo la concentración de ADN en nanogramos por microlitro (ng/ul) y se determinó la pureza mediante la relación entre la absorbancia 260 nm y 280 nm (R) para cada una de las muestras. El ADN genómico fue resuelto en geles de agarosa al 1% y teñidas mediante colorante fluorescente) y visualizados en un foto documentador.

El análisis estadístico se efectuó mediante un modelo en bloques completos al azar, teniendo como variables de respuesta, la concentración

de ADN genómico y el valor de R. En caso de obtener diferencias significativas se procedería a realizar un análisis de medias de mínimos cuadrados. Paralelamente y para comparar los tiempos de extracción con el mismo protocolo, se realizó una prueba donde se transfirieron 10 bulbos de pelo de bovino a 10 microtubos de 250 ul y se agregaron 100 ul del reactivo; se aplicó vórtex por 15 segundos; luego se incubaron a 65° C por 6 minutos, nuevamente se aplicó vórtex por 15 segundos y se incubaron a 98° C por 2 minutos mediante un protocolo configurado en un equipo de PCR de punto final.

Una vez obtenido ADN genómico y con la finalidad de comprobar la capacidad de extracción del protocolo de menor volumen (tratamiento 5), se procedió a realizar una amplificación de región 3'UTR del gen SLC11A1, utilizando un equipo de PCR punto final. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos SLC11A1 FW: 5'-GGAATGAGTGGGCACAGTGGC-3' y RV: 5'-CCTTCCAGAACTCCCTCTCCG-3' (0,5 mM), en 25 µl de mezcla total, con 70 a 100 ng de ADN, 0,2 mM de cada DNTP, 1x de tampón PCR, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1U de Taq ADN polimerasa. El programa de amplificación constó de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94° C, 30 ciclos de 45 segundos a 94° C,

30 segundos a 55° C y 90 segundos a 72° C, con una extensión final de 10 minutos a 72° C.

El producto de PCR fue resuelto en gel de agarosa al 2%, teñidas mediante un colorante fluorescente y visualizados en un foto documentador.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis para los tratamientos realizados, no mostraron diferencias significativas para el valor de R. Sin embargo para la concentración, se observaron diferencias entre el tratamiento 5 y 4 ( $P=0,019$ ) y Tratamiento 5 y 1 ( $P=0,021$ ). La media general de R fue  $1,77 \pm 0,22$  y para la concentración fue de  $34,96 \pm 7,18$  ng/ul. Los valores observados en R oscilaron entre  $1,37 \pm 0,60$  en el tratamiento 3 y  $2,24 \pm 0,61$  en el tratamiento 2. En cuanto a la concentración de ADN, los valores oscilaron en  $12,28 \pm 12,98$  ng/ul en el tratamiento 4 y  $75,21 \pm 14,04$  ng/ul en el tratamiento 5 (Cuadro 1).

Los valores de concentración obtenidos en este trabajo, son similares a los observados por Kumar *et al.* (2005), Suenaga y Nakamura (2005) en muestras de pelo de bovino y humano, respectivamente, sin embargo en humanos se utilizaron dos folículos. Tomando en cuenta que la cantidad utilizada para una amplificación normalmente es de 70 a 100 ng, fue posible la obtención de cantidad suficiente de ADN en los cinco tratamientos.

En el tratamiento 5 se observó una mayor concentración de ADN probablemente por una mejor cantidad obtenida del folículo, aunque en general, en todos los tratamientos fue posible recobrar ADN. Sin embargo al evaluar la pureza, los tratamientos 1, 2, 4 y 5 presentaron los mejores valores, aunque no se observaron diferencias significativas a excepción del tratamiento 5 con respecto a los demás ( $P<0,05$ ). Considerando que el rango de pureza de las muestras se

**CUADRO 1. VALOR DE R Y CONCENTRACIÓN DE CINCO VOLÚMENES DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN COMERCIAL.**

Tratamientos	R	EE	Concentración	EE
1	2,11	0,53	20,37	14,09
2	2,24	0,61	24,14	13,64
3	1,37	0,60	37,66	17,82
4	1,57	0,53	12,28	12,98
5	1,51	0,53	75,21	14,09

EE: error estándar

desvía de los rangos óptimos de 1,8 a 2,0 todas las muestras parecen sufrir algún nivel de contaminación a pesar que a las muestras se les dio un tratamiento previo de limpieza y desinfección. Dado que las muestras de pelo fueron obtenidas de la zona de la borla, se sabe que esta región está expuesta a fuerte contaminación particularmente de heces y el lodo.

Los resultados obtenidos de los distintos volúmenes del reactivo de extracción comercial mostraron la presencia de ADN para todos los tratamientos, destacando una mayor intensidad de imagen en el tratamiento 5 correspondiente a 100 ul del producto. Una segunda corrida del experimento mostró resultados similares respecto al primer gel por lo que la utilización de 100 ul de producto de extracción en pelo de bovino podría ser sustituido por la recomendación original del fabricante de 500 ul, aunque se debe recalcar que los resultados se limitan al estudio en pelo de bovino y bajo las condiciones de trabajo del laboratorio. Por otro lado, se debe considerar que la aplicación de la cantidad recomendada de pelo en el instructivo de la compañía es de 0,5 a 1 cm de folículo piloso de humano. También habría que contemplar, previo a la extracción de ADN de pelo, la limpieza del material con agua desionizada y etanol al 100% para evitar la inclusión de impurezas dentro del proceso

de extracción (Kumar *et al.* 2005). En el presente trabajo se utilizó, para todas las muestras, 10 pelos de bovino extraído de la región de la borla, cantidad utilizada en muchos trabajos de investigación, particularmente en estudios de diversidad genética bovina, garantizando una cantidad normalizada de ADN entre 20 y 140 ug/ul (Kumar *et al.* 2005, Villalobos-Cortés *et al.* 2010, Delgado *et al.* 2012, Martínez *et al.* 2012). Una ventaja en la utilización de cantidades más pequeñas de producto es en los periodos de calentamiento, al utilizar equipos como el termociclador, se logró mejor precisión, ya que se llegó a la temperatura deseada de manera más controlada y en menor tiempo.

En el presente trabajo, se utilizó un evaporador analítico cuyo tiempo calentamiento prolongaba el tiempo de extracción total entre 60 y 80 minutos a diferencia de lo que establece el protocolo del fabricante de máximo 8 minutos. Además la manipulación de los preparados se hace más compleja incrementando el riesgo de accidentes por quemaduras. Al reducir las cantidades necesarias para realizar una extracción, en este caso 100 ul, fue posible utilizar microtubos de 250 ul y con el termociclador se logró incrementar la velocidad y precisión de las extracciones de ADN de pelo en un tiempo entre 20 y 30 minutos.

Se observó que por la disminución de 100 ul de la cantidad recomendada por el fabricante, hay una reducción entre 20% y 80%, lo que representa un ahorro sustancial en el costo operativo en el uso de este protocolo. El Cuadro 2 muestra las diversas variables generadas por tratamiento del reactivo comercial, donde se muestra el bajo costo en el uso de los reactivos al optimizar su uso. Por otro lado, al utilizar cantidades menores de producto en microtubos de 250 ul se reduciría la contaminación potencial en el laboratorio, el tiempo total de extracción y es posible incrementar la cantidad de muestras por extracción y por unidad de tiempo. En el caso de la utilización del termociclador como fuente de calentamiento utilizando microtubos de 250 ul, se pueden obtener 96 extracciones simultáneas a un costo de B/.66,81 comparado con B/.333,88 que se emplean en el protocolo recomendado por el fabricante, pero empleando mayor tiempo. Esto es particularmente importante cuando se procesan grandes volúmenes de muestras, donde se

requiere optimizar los recursos disponibles en el laboratorio. Bajo esta metodología se logra incrementar hasta cinco veces la capacidad de extracción del producto en evaluación.

En los resultados de la amplificación de la PCR se observa una secuencia ubicada entre 200 bp y 300 bp correspondientes a las región 3'UTR del gen SLC11A1, lo que confirma que es posible realizar extracciones de ADN en pelo bovino, particularmente en 100 ul de reactivo (ver Figura).

Cabe destacar que posterior al presente reporte, se ha tomado como protocolo regular el uso de minipreparados en tubos de 250 ul utilizando entre 100 ul y 200 ul de reactivo utilizando un equipo de PCR para realizar las incubaciones en 65° C y 98° C, mejorando la eficiencia en el tiempo total de las mismas, comparado con el uso del enfriador electrónico y el evaporador analítico.

**CUADRO 2. COMPARACIÓN DE CINCO DIFERENTES VOLÚMENES DE REACTIVO PARA EXTRACCIÓN DE ADN DE PELO BOVINO.**

TRATAMIENTO (Tx)	Volumen (ul)	Precio/ml	Costo/Tx	Diferencia en el costo (B/.)
1	500	6,955	3,478	0
2	400	6,955	2,782	0,696
3	300	6,955	2,087	1,391
4	200	6,955	1,391	2,087
5	100	6,955	0,696	2,782

ul: microlitros; B/. Balboas; ml: mililitros; Tx: tratamiento



Figura. Imagen de productos de PCR de región 3'UTR del gen SLC11A1 en gel de agarosa al 2% con protocolo de extracción comercial. Imagen a (M: marcador; 2, 3, 5, 7-9: 100 ul de reactivo).

### CONCLUSIÓN

La extracción de ADN genómico en todos los tratamientos y similares valores de pureza. Se produjo una optimización de hasta cinco veces la capacidad de extracción del producto comercial y una reducción del costo por muestra; además se simplificó la secuencia de pasos del protocolo al utilizar un equipo en el proceso total de extracción.

### BIBLIOGRAFÍA

- Bastos, R; Federizzi, J; Deschamps, JC; Cardellino, R; Dellagostin, OA. 2000. Characterization of swine stress gene by DNA testing using plucked hair as a source of DNA. *Genetics and Molecular Biology* 23(4):815-817.
- Bates, I; Bedu-Addo, G; Rutherford, TR. 1991. Extracting, storing, and

- transporting whole blood DNA under tropical conditions. *J Clin Pathol* 44:605-606.
- Bauerová, M; Vasicek, D; Uhrin, P; Chrenek, P; Mlynek, J; Bulla, J. 1996. Detection of malignant hyperthermia in pigs by DNA-test using plucked hair as a source of DNA. *Pig News Inf.* 16:109N-111N.
- Campbell, A; Williamson, J; Padula, D; Sundby, S. 1997. Use PCR and a single hair to produce a DNA fingerprinting. *The American Biology Teacher* 59(3).
- Castañeda, A; Mcewen, J; Hidalgo, M; Castañeda, E. 2004. Evaluación de varias técnicas de extracción de ADN de *Cryptococcus* spp. a partir de muestras ambientales. *Biomédica* 24:324-31.
- Delgado, JV; Martínez, AM; Acosta, A; Alvarez, LA; Armstrong, E; Camacho, E; Cañón, J; Cortés, O; Dunner, S; Landi, V; Marques, JR; Martín-Burriel, I; Martínez, OR; Martínez, RD; Melucci, L; Muñoz, JE; Penedo, MCT; Postiglioni, A; Quiróz, J; Rodellar, C; Sponenberg, P; Uffo, O; Ulloa-Arvizu, R; Vega-Pla, JL; Villalobos, A; Zambrano, D; Zaragoza, P; Gama, LT; Ginja, C. 2012. Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Animal Genetics* 43:2-10.
- Drissing, J; Rudbeck, L; Marcher, H. 1996. A five minute procedure for extraction of genome DNA from whole blood, semen and forensic stain for PCR. *In Advances in Forensic Haemogenetics* (Carracedo, A., ed.). Springer-Verlag, New York, p.269-271.
- Kumar, P; Choudhary, V; Bhattacharya, T; Bhushan, B; Sharma, A. 2005. PCR-RFLP based genotyping of cattle using DNA extracted from hair samples. *Indian Journal of Biotechnology* 4:287-289.
- Martínez, AM; Gama, LT; Canon, J; Ginja, C; Delgado, JV; *et al.* 2012. Genetic Footprints of Iberian Cattle in America 500 Years after the Arrival of Columbus. *PLoS ONE* 7(11):e49066.
- Miller, SA; Dykes, DD; Polesky, HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.

Suenaga, E; Nakamura, H. 2005. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *Journal of Chromatography B* 820:137–141.

Villalobos-Cortés, AI; Martínez, AM; Escobar, C; Vega-Pla, JL; Delgado; JV. 2010. Study of genetic diversity of the Guaymi

and Guabala bovine populations by means of microsatellites. *Livest Sci* 131:45–51.

#### **AGRADECIMIENTO**

Al Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) y Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del presente trabajo.