

ENSAYO DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE RATÓN PARA SER USADO EN EL CONTROL GENÉTICO DE RATONES CONSANGUÍNEOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Assay of Two Extraction Methods of DNA of Mouse by Using Polymerase Chain Reaction (PCR) For to Make Monitoring Genetic Inbred Mice

Rosa De Jesús¹, Nancy Moreno² y José A. Martínez³

¹ Laboratorio Fisiología Animal Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. ² Laboratorio de Biología Molecular. Núcleo Aragua, Universidad de Carabobo. ³ Departamento de Biología Universidad Pedagógica Experimental Libertador. Maracay-Venezuela. E-mail: rosadej@ula.ve.

RESUMEN

La utilización de marcadores genéticos de tipo microsatélite es una herramienta importante para vigilar la pureza genética en las cepas consanguíneas de ratón. El primer paso para realizar este estudio es disponer de muestras de ADN con calidad y cantidad que permita su análisis mediante métodos de Biología Molecular. En este trabajo se ensayaron dos métodos de extracción de ADN, uno de ellos a partir de tejido de oreja mediante la Técnica *HotSHOT* y el otro utilizando muestras sanguíneas y basado en una precipitación salina. Se determinó la calidad y la cantidad de ADN obtenido por ambos métodos, mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría de luz ultravioleta respectivamente; también se probó la capacidad del ADN para ser digerido por la enzima de restricción *Sal* I y de ser amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Con el método de *HotSHOT*, se obtienen muestras de ADN, cuya cantidad promedio es de 51,56 µg, con un índice A_{260}/A_{280} de 1,2 y no son digeribles por la enzima *Sal* I. Las muestras de ADN obtenidas por el método de precipitación salina, tienen una cantidad promedio de 13,50 µg, con un índice A_{260}/A_{280} de 1,7; son digeribles por la enzima *Sal* I, lo cual las hace aptas para estudios donde se requiera hacer *Southern blot*. Dado que por ambos métodos se obtienen muestras amplificables por PCR, se seleccionó el método de *HotSHOT*, para el análisis de microsatélites, por ser un método rápido y económico. Los resultados obtenidos son fundamentales para iniciar los estudios de control ge-

nético a nivel molecular, en las líneas consanguíneas de ratones que se producen actualmente en cuatro bioterios del país.

Palabras clave: PCR, Extracción de ADN, microsatélite, ratón.

ABSTRACT

Microsatellite genetic markers are an important tool for the screening of genetic purity in inbred strains of mice. The first step to carry out this study is to obtain DNA samples of a quality and quantity that make analysis with molecular biology methods possible. In this investigation we assayed two methods of DNA extraction: one of them using samples taken from ear tissue and applying the *HotSHOT* technique; the second method used blood samples and the saline precipitation. Agarose gel electrophoresis and ultraviolet light spectrophotometry were used to determine the quality and quantity of DNA obtained by both methods. Also we tried the capacity of DNA to be digested for the restriction enzyme *Sal* I and to be amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). With *HotSHOT* the average quantity of DNA samples was 51.56 µg, with an A_{260}/A_{280} index of 1.2 and they were not digested by the *Sal* I enzyme. The DNA obtained from blood with saline precipitation averaged 13.50 µg with an A_{260}/A_{280} index of 1.7 and were digested by the *Sal* I enzyme, making them suitable to carry out *Southern blot* studies. Although the samples obtained by both methods were suitable for PCR, the *HotSHOT* method was chosen for microsatellite analysis by PCR, since it was rapid and economic. The results obtained are fundamental to begin studies about molecular genetic control in the inbred strains of mice currently produced at four animal labs centers in Venezuela.

Key words: PCR, DNA extraction, microsatellite, mouse.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen en el país cuatro cepas de ratones consanguíneos diferentes, llamados también ratones "genéticamente definidos" [1]. Estas cepas se mantienen desde principios del siglo XX a nivel mundial; las mismas son usadas en la investigación biomédica y farmacéutica. La condición de consanguinidad de estos ratones, les confiere una serie de características generales que son comunes a todos ellos. Dos de estas características más significativas son: la isogenicidad de los animales pertenecientes a una cepa en más del 99% de los loci y la homocigosis, en más del 99% de los alelos dentro del animal. La pérdida de estas características resulta de la falta de pureza o de la contaminación entre cepas de ratones [9], conllevando a serios problemas a nivel de los resultados de las pruebas realizadas con éstas [3, 6, 7, 8, 13]. Hasta los momentos se han desarrollado diferentes pruebas que sirven de monitor para vigilar la condición genética de las diferentes cepas consanguíneas del ratón y garantizar así el uso de cepas auténticas en la investigación [7]. Entre estas pruebas específicas, se citan las técnicas de análisis directo del ADN mediante la detección de marcadores moleculares las cuales resultan incomparablemente exactas y adecuadas para tener un control estricto de la pureza genética de los ratones consanguíneos [18], además de ser consideradas éstas de gran valor como monitores en la autenticación de los mismos.

Entre estas técnicas tenemos las que se aplican para estudiar el polimorfismo mediante el uso de los microsátélites, los cuales por ser altamente polimórficos y relativamente fáciles para ensayar cuando son amplificados "*in vitro*" por PCR, proporcionan una invaluable herramienta para la identificación y comparación de cepas consanguíneas de ratones [12]. El ADN usado en la PCR para estudios genéticos con ratones es ADN genómico, éste debe estar libre de impurezas que puedan inhibir o reducir la sensibilidad y eficiencia de la amplificación, además debe encontrarse en la concentración adecuada [5]. Diferentes protocolos se han desarrollado con el objeto de extraer el ADN de diferentes células de ratón, ya sean sanguíneas o de tejido, entre éstos, los que usan solventes orgánicos se encuentran entre los protocolos estándar. La extracción del ADN de tejido, es un proceso muchas veces laborioso y costoso que difiere dependiendo del tejido del cual se va a extraer el ADN. Existen varios protocolos los cuales fueron realizados algunas décadas antes del desarrollo de la tecnología del ADN recombinante [15], sin embargo, continuamente se hacen modificaciones a los ya existentes, pretendiendo hacer más sencillo el proceso.

En el presente trabajo se ensayaron dos métodos con la finalidad de realizar la extracción de ADN, los cuales son usados comúnmente en los laboratorios de Biología Molecular donde se trabaja con ADN de ratón, estos son: la extracción de ADN de tejido, a partir de fragmentos de oreja y la extracción de ADN sanguíneo. La finalidad de ensayar estos dos métodos de aislamiento es seleccionar aquel que permita obtener mejor calidad y cantidad de ADN, para efectuar la ampli-

ficación de secuencias del ADN mediante la PCR con una alta eficiencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras para la extracción del ADN fueron tomadas de doce ratones pertenecientes a la cepa consanguínea *BALB/c* [16], reproducidos y mantenidos en el bioterio de la Universidad de Los Andes en Mérida. La extracción de ADN de tejido se hizo de acuerdo a la técnica de *HotSHOT* [17]; el fundamento de esta técnica es extraer ADN mediante lisis alcalina usando NaOH 25 mM a 95°C. Para la aplicación de la técnica se cortó un fragmento de oreja aproximadamente de 2x2 mm.; éste se colocó en un tubo eppendorf al cual se le agregaron 75 µL de solución alcalina de NaOH 25 mM, pH 12; posteriormente se colocó a 95°C durante 15 min., luego se enfrió a 4°C, y se le agregaron 75 µL de solución Tris-HCl 40 mM pH 5, se homogenizó la mezcla y se dejó sedimentar para luego tomar el sobrenadante (140 µL) que contiene el ADN. Por otro lado, para la extracción del ADN de células nucleadas de la sangre, se utilizó un método de extracción a partir de la capa de leucocitos utilizando proteinasa K y Dodecil Sulfato de Sodio, seguido de precipitación con acetato de amonio y etanol [14]. Este método fue estandarizado y utilizado para pruebas de ADN en humanos, en el laboratorio de Biología Molecular del Núcleo Aragua de la Universidad de Carabobo [11]. Se tomó una muestra de 300 µL de sangre por vía retroorbital, luego se realizó tratamiento con la solución lisante 1 (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, NaCl 9,9 mM, EDTANa₂ 2 mM pH 8,0), se centrifugó a 2200 rpm/10 min. y el sobrenadante se descartó; el *pellet* fue resuspendido con 1 mL de la solución lisante 2 (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, Nonidet P40 0,1%, EDTANa₂ 2 mM pH 8,0) y se centrifugó a 2200 rpm/10 min. a 20°C, luego se descartó el sobrenadante dejando sólo lo suficiente para cubrir el *pellet*. Posteriormente se resuspendió en 225 µL de TE (Tris EDTA) 20:5; se agregaron 14 µL de Dodecil Sulfato de Sodio 10% (SDS), se agitó suavemente, se colocaron 4 µL de proteinasa K (10 mg/mL). Se incubó toda la noche a 41°C con agitación. Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron las muestras de la incubadora, se enfriaron a temperatura ambiente y se le agregaron 13,5 µL de acetato de amonio 7M y 750 µL de isopropanol 95%. Se agitó por inversión hasta lograr precipitar el ADN, el cual se observa en forma de medusa. Se centrifugó a 4000 rpm/ 15 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado dos veces con isopropanol 70%, luego de retirar el alcohol se secó al vacío en el concentrador de ADN y se disolvió en 300 µL de buffer Tris-EDTA 10:1 pH 7,5. Se verificó la cantidad y calidad del ADN, mediante espectrofotometría, para lo cual, se realizaron las medidas de Absorbancia a 260 nm. y 280 nm. en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer, modelo Lambda 3B. Se calculó la relación A_{260}/A_{280} , la cual debe tener un valor que oscile entre 1,6 a 1,9; de esta forma se garantiza una desproteínización aceptable de la muestra. Se prepararon alícuotas de trabajo de 20

ng/ μ L y se almacenaron a 4°C hasta su utilización. La calidad del ADN también fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa a 0,9% durante 1 hora a 70 voltios; para el caso del ADN extraído de tejido la corrida electroforética se realizó durante 1 hora 30 min. a 60 voltios. El marcador utilizado fue ADN del *Fago* digerido con *Hind* III, el revelado se realizó con bromuro de etidio y se observó la presencia del ADN en el transluminador. La observación de una banda neta, de aproximadamente 23 Kb., garantiza la integridad del ADN.

Con el fin de probar si los ADN obtenidos por ambas técnicas pueden ser utilizados en análisis que contemplen la realización de *Southern blot*, se ensayó la acción de una endonucleasa de restricción sobre los dos tipos de muestras de ADN, para ello se realizó una incubación de 0,5 μ g de ADN con 15 unidades de la enzima *Sal* I en un volumen final de 50 μ L, durante 3 horas a 37°C de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En cada caso se colocó un control de digestión que consiste en ADN sometido al mismo proceso de incubación, pero en ausencia de la enzima *Sal* I. Al finalizar la incubación se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0,9% en las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior. La observación de bandas de ADN de alto peso molecular indica que no hubo digestión.

Por último se probó la capacidad de las muestras de ADN, de ser amplificadas mediante PCR, y en este sentido se realizó un ensayo donde se colocó la siguiente mezcla de reacción: Buffer PCR (Tris-HCl 20 mM pH 8,3, KCl 50 mM), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 200 M μ , oligonucleótidos iniciadores para el locus D1Mit17 0,3 M μ y 1,5 unidades de Taq ADN Polimerasa, en un volumen final de 50 μ L. Con el fin de estandarizar la cantidad de ADN que debe colocarse en el ensayo se realizaron curvas; en el caso del extraído a partir de sangre se ensayaron cantidades de 10, 20, 30, 40 y 50 ng., para el ADN extraído a partir de tejido se siguió el criterio de Truett y col. [17] quienes trabajaron con volúmenes y no con concentraciones de ADN, en este sentido se ensayaron cantidades de 2, 4, 6 y 8 μ L. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados en este ensayo fueron donados por el Dr. Jean Louis Guénet (Director de la Unidad de Genética de Mamíferos del Instituto Pasteur de Paris, Francia). La secuencia del oligonucleótido 1 es: 5'GTGTCTGCCTTTGCACCTTT3' y la secuencia del oligonucleótido 2 es: 5'CTGCTGTCTTTCCATCCACA3' [16].

La reacción se llevó a cabo en un Termociclador marca PerkinElmer (Gene Amp PCR System 2400). Se efectuó una eta-

pa inicial de desnaturalización a 94°C por 45 seg.; seguida de 35 ciclos de amplificación realizados de la forma siguiente: a) Desnaturalización: 45 seg. a 94°C, b) Hibridación de los oligonucleótidos iniciadores a las secuencias complementarias en el ADN: 45 seg. a 55°C y c) Extensión: 30 seg a 72°C; posteriormente se realiza una etapa de extensión final a 72°C durante 7 min., la verificación de los productos PCR, se realizó en gel de agarosa 2,5% a 70 Voltios durante 1h 30 min., el revelado se efectuó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

RESULTADOS

Este trabajo presenta el inicio de un estudio de control genético mediante análisis de marcadores del tipo de microsátélites por la técnica de la PCR, de cepas consanguíneas de ratón; el cual está dado por el ensayo de dos métodos usados para la extracción de ADN genómico de tejido y de sangre y por el análisis de las ventajas y desventajas de ambos métodos, con la finalidad de seleccionar el más conveniente para el desarrollo del estudio planteado.

Los valores observados con respecto a la calidad son registrados en la TABLA I; en las columnas identificadas como A_{260} nm y A_{280} nm se presentan valores promedios de las medidas de Absorbancia de las muestras a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. respectivamente. En la columna identificada como A_{260}/A_{280} se presentan los valores calculados de la relación señalada, si éstos oscilan entre 1,6 y 1,9 como es el caso de los valores obtenidos para las muestras de ADN extraídas de glóbulos blancos, indican el logro de una buena desproteinización de las muestras de ADN, no siendo así para las muestras de ADN extraídas de tejido las cuales presentan un valor promedio de 1,2. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba, podemos decir que la muestra de ADN obtenida de sangre presenta mejor calidad en cuanto a la desproteinización lograda.

En relación a la cantidad total del ADN extraído, los valores son calculados usando la expresión señalada en la parte inferior de la tabla y relacionando el resultado de estos cálculos con el volumen final obtenido para cada muestra; observamos con respecto a estos valores que la mayor cantidad total de ADN obtenida es a través del método *HotSHOT*.

La calidad del ADN extraído por ambos métodos se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,9%; la

TABLA I
COMPARACIÓN DEL ÍNDICE A_{260}/A_{280} Y LA CANTIDAD DE ADN OBTENIDA A PARTIR DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ENSAYADOS

Método de Extracción	A_{260} nm	A_{280} nm	A_{260}/A_{280}	μ g/mL.	Cantidad total (μ g)
HotSHOT (Tejido)	0,221	0,189	1,2	368,30	51,56
Precipitación salina (Sangre)	0,027	0,016	1,7	45,00	13,50

La concentración de ADN, expresada en μ g/mL se obtuvo al multiplicar el valor de A_{260} nm X 50 X Dilución de la muestra (33,33 veces). El número 50 es una constante relacionada con una solución de ADN de doble hebra cuya concentración es de 50 μ g/mL y tiene una A_{260} nm = 1.

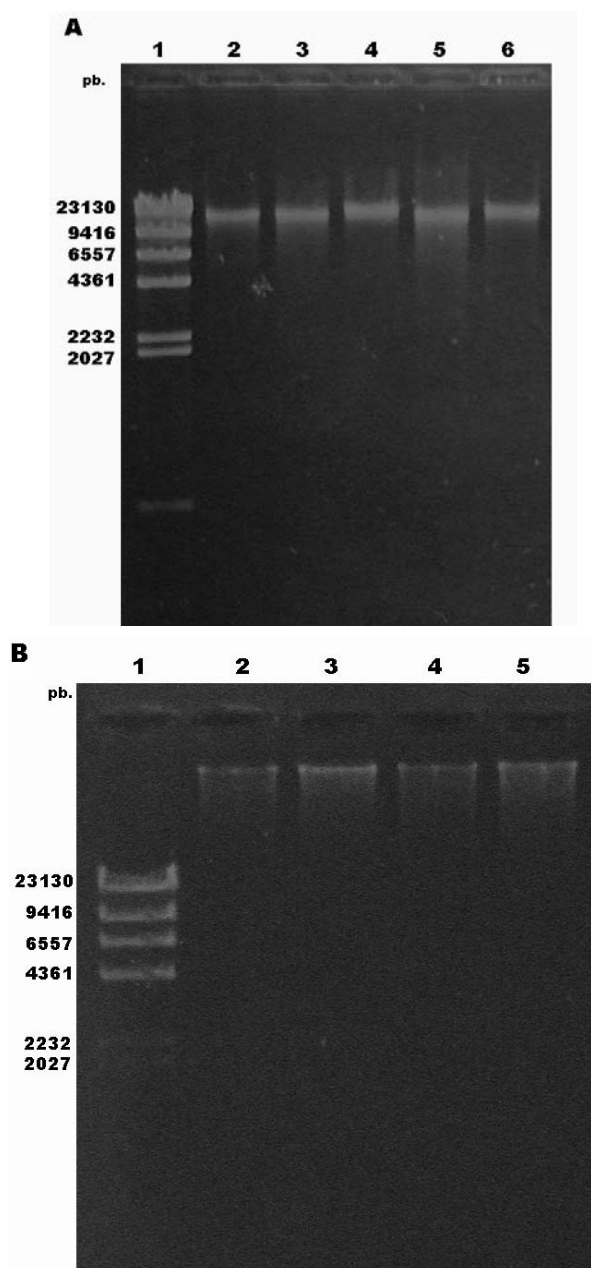


FIG. 1A presenta los resultados obtenidos para cinco de las muestras extraídas a partir de sangre y la FIG. 1B para cuatro de las muestras aisladas a partir de tejido, observándose en ambas figuras bandas bien definidas de las muestras extraídas por ambos métodos y diferenciándose en que las muestras de ADN obtenidas de tejido presentan menor migración que las extraídas de sangre. Es importante, de acuerdo al objetivo del estudio a desarrollar posteriormente, determinar si las muestras de ADN obtenidas pueden ser amplificadas mediante PCR; se hizo énfasis en la cantidad de ADN que puede ser utilizado para obtener un producto de calidad, lo cual es la base para establecer las condiciones óptimas para diferentes oligonucleótidos iniciadores. Los resultados obtenidos en la amplificación del locus D1Mit17 se presentan en la FIG. 2; cuando se realiza la amplificación usando el ADN sanguíneo,

se observa que el mejor resultado se obtiene al utilizar 20 ng. de ADN en el ensayo (FIG. 2A, Carril 5); a partir de esta concentración la intensidad del producto amplificado va disminuyendo y casi desaparece para la cantidad de 50 ng. de ADN (FIG. 2A, Carril 8). En la FIG. 2B se presentan los productos de amplificación que se obtienen cuando se utiliza ADN extraído mediante el método *HotSHOT*, en este caso, las bandas más intensas se observan para 4 y 6 μ L de ADN (Carriles 5 y 6).

Por último, es importante tener en cuenta si las muestras obtenidas por ambos métodos pueden ser analizadas mediante otros ensayos diferentes a la PCR, tales como el caso del análisis de la huella genética obtenida mediante la combinación de digestión con enzimas de restricción y/o la técnica de *Southern blot*, para lo cual se ensayaron ambas muestras con la enzima *Sal I*, los resultados obtenidos en este ensayo son presentados en la FIG. 3, donde se observa que esta enzima digiere el ADN obtenido de sangre (FIG. 3, Carril 3) mientras que no se produce digestión en el ADN extraído a partir de tejido, en este caso el ADN tratado con la enzima (FIG. 3, Carril 5) muestra el mismo perfil que el ADN no digerido (FIG. 3, Carril 4).

DISCUSIÓN

La disponibilidad de un buen molde de ADN es una de las condiciones indispensables para garantizar la correcta amplificación de secuencias de genes mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. En el presente trabajo se compararon dos métodos para obtener ADN, en cantidad y calidad deseable, con el fin de seleccionar uno de ellos para iniciar un estudio sobre control genético de una muestra de ratones de cepas consanguíneas que se producen en cuatro bioterios del país. Por los dos métodos analizados se obtiene ADN que puede ser amplificado mediante PCR, no obstante hay diferencias en los aspectos siguientes: a) En el perfil electroforético del ADN obtenido a partir de sangre, se observa una banda neta con un tamaño aproximado de 23 Kb. (FIG. 1A), muy parecido al obtenido en el caso de humanos utilizando un método similar [11], mientras que en el otro método ensayado, el ADN queda muy cercano al lugar de aplicación (FIG. 1B), este comportamiento se debe a la presencia adicional de proteínas que retrasan la migración del ADN; b) La cantidad de ADN obtenida es mucho mayor cuando se hace la extracción a partir de tejido por el método de *HotSHOT*, en promedio se obtienen 51,56 μ g totales que están contenidos en un volumen aproximado de 140 μ L (368,3 ng/ μ L), no obstante para realizar la amplificación por PCR, se debe utilizar un mínimo de 2 μ L (736,6 ng.). Por el contrario en la extracción realizada a partir de sangre se obtiene menor cantidad de ADN, hay un rendimiento promedio de 13,50 μ g totales, pero la cantidad requerida para la amplificación mediante PCR es de 20 ng. de ADN, dado que con esta cantidad se logra una amplificación comparable a la obtenida utilizando 736,6 ng. de ADN extraído por el otro método. c) En el caso de

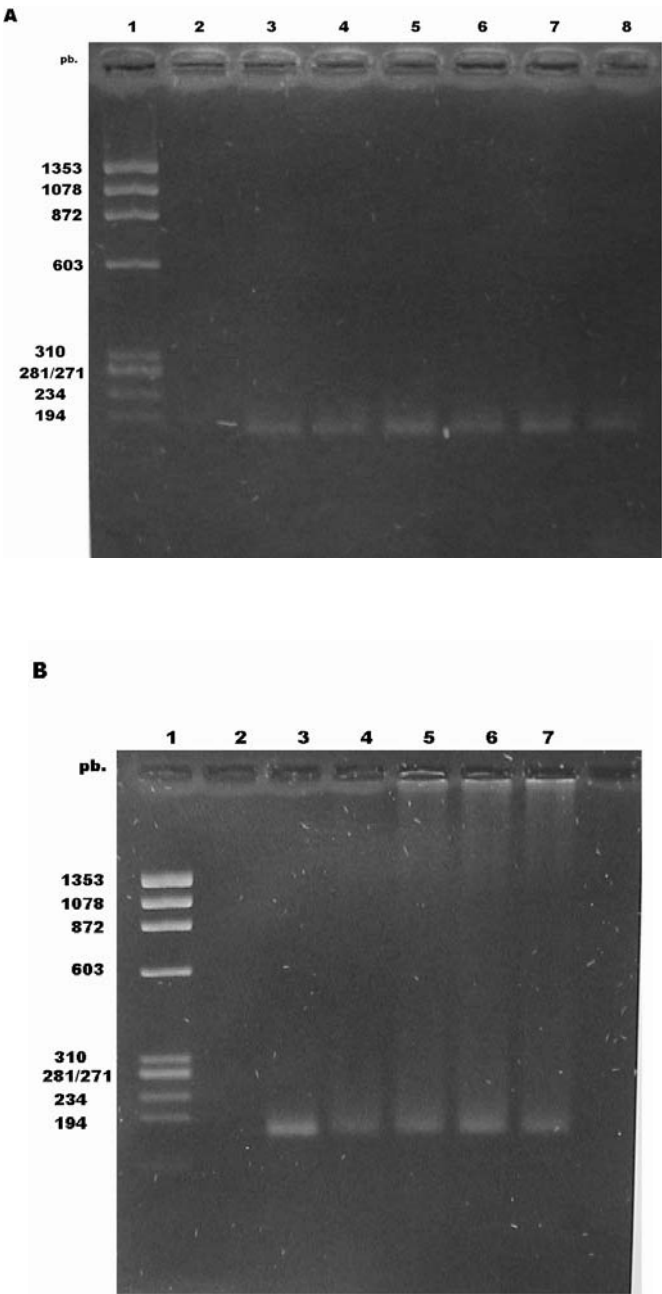


FIGURA 2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2.5% DONDE SE OBSERVAN LOS PRODUCTOS DE LA AMPLIFICACIÓN (179 pb.), UTILIZANDO LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES D1Mit17 CON DIFERENTES CANTIDADES DE ADN. A) ADN OBTENIDO DE SANGRE. CARRIL 1: MARCADOR ϕ X174 *Hae* III. CARRIL 2: CONTROL NEGATIVO. CARRIL 3: CONTROL POSITIVO. CARRIL 4: 10 ng. DE ADN. CARRIL 5: 20 ng. DE ADN. CARRIL 6: 30 ng. DE ADN. CARRIL 7: 40 ng. DE ADN. CARRIL 8: 50 ng. DE ADN. B) ADN OBTENIDO DE TEJIDO. CARRIL 1: MARCADOR ϕ X174 *Hae* III. CARRIL 2: CONTROL NEGATIVO. CARRIL 3: CONTROL POSITIVO. CARRIL 4: 2 μ L DE ADN. CARRIL 5: 4 μ L DE ADN. CARRIL 6: 6 μ L DE ADN. CARRIL 7: 8 μ L DE ADN.

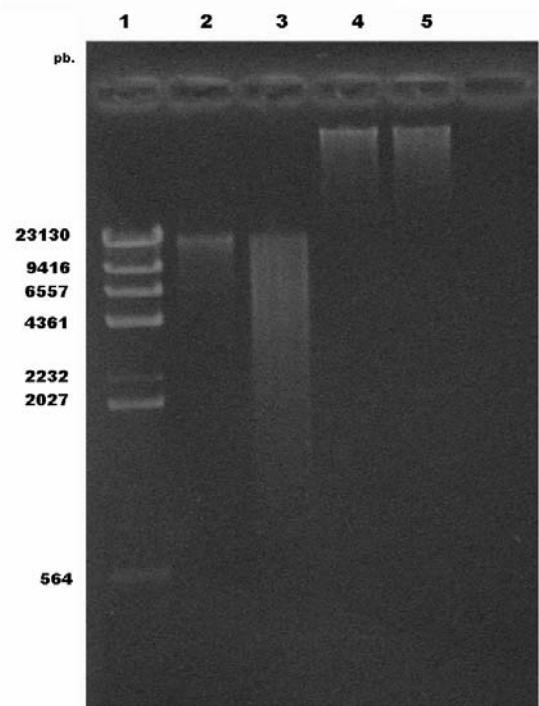


FIGURA 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 0.7% DONDE SE OBSERVA LA ACCIÓN DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *Sal* I EN MUESTRAS DE ADN. CARRIL 1: MARCADOR Fago Lambda *Hind* III. CARRIL 2: ADN SIN DIGERIR (EXTRAÍDO DE SANGRE) CARRIL 3: ADN DIGERIDO CON *Sal* I (EXTRAÍDO DE SANGRE). CARRIL 4: ADN SIN DIGERIR (EXTRAÍDO DE TEJIDO). CARRIL 5: ADN DIGERIDO CON *Sal* I (EXTRAÍDO DE TEJIDO).

ADN obtenido a partir de sangre, el índice A_{260}/A_{280} tiene un valor promedio de 1,7 lo cual indica una desproteinización aceptable, mientras que el ADN aislado a partir de tejido tiene un valor de 1,2; esta situación es esperada ya que durante el proceso de extracción no se utiliza proteinasa y de esta forma permanecen proteínas en la preparación. De acuerdo a nuestros resultados, las condiciones óptimas para realizar la amplificación de secuencias de ADN, tales como las del locus D1Mit17, varían de acuerdo al método de extracción del ADN ensayado. Para el ADN obtenido a partir de sangre se logra una buena amplificación en las condiciones siguientes: 20 ng. de ADN incubados en presencia de: Buffer PCR (Tris-HCl 20 mM pH 8,3; KCl 50 mM), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 200 μ M, oligonucleótidos iniciadores para el locus D1Mit17 0,3 μ M y 1,5 unidades de Taq ADN Polimerasa, en un volumen final de 50 μ L.

Cuando se utiliza ADN extraído por el método de *HotSHOT*, las condiciones son las mismas, la única diferencia estriba en que la cantidad de ADN colocada en el ensayo, es como mínimo 2 μ L de sobrenadante (736,6 ng.). Aunque estos datos constituyen un punto de partida para la optimización de los otros oligonucleótidos que se utilizarán posteriormente, se debe recalcar que aún partiendo de las condiciones establecidas en este trabajo, es necesario determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ para el funcionamiento de cada par de oligo-

nucleótidos iniciadores. En investigaciones donde se utilizan varios iniciadores, se observan diferencias drásticas en relación a los requerimientos de $MgCl_2$, este es el caso de un trabajo realizado por Love y col. [10], donde analizan microsatélites con el fin de construir mapas de alta resolución del genoma de ratón, aquí se reportan iniciadores que requieren sólo de 1 mM de $MgCl_2$, en contraste con otros, que requieren concentraciones de hasta 4 mM de $MgCl_2$ [10]. Este tipo de diferencias, aunque no tan drásticas, también se observan en un trabajo sobre monitoreo genético realizado por Benavides [2]. Aunque ambos métodos ensayados conducen a la obtención de muestras de ADN que pueden ser amplificadas mediante PCR, cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas, por ejemplo el método que extrae ADN a partir de sangre consume un poco más de tiempo, pero se obtiene un promedio de 13,50 μg de ADN, tomando en cuenta que para optimizar las concentraciones de Mg^{2+} para cada par de oligonucleótidos iniciadores se consumen aproximadamente 200 ng., al obtener un promedio de 13,50 μg de ADN, se pueden probar holgadamente 20 pares de oligonucleótidos iniciadores y aún queda cantidad suficiente para realizar los ensayos de control genético. El número de oligonucleótidos utilizados en el control genético es variable, por ejemplo Benavides [3] utilizó seis pares de oligonucleótidos iniciadores, para analizar seis loci microsatélites con el fin de detectar contaminación genética en una colonia fundadora de ratones S¹/J., mientras que Benavides y col. [4] analizaron dieciséis microsatélites (32 oligonucleótidos iniciadores) para realizar el monitoreo de nueve cepas de ratones SENCAR. Por otra parte el ADN obtenido a partir de sangre, es de muy buena calidad, puede ser digerido por enzimas de restricción y esto implica que pueda ser analizado no sólo por PCR, sino por la huella genética obtenida mediante la combinación de digestión con enzimas de restricción y la técnica de *Southern blot*; un ejemplo de esto lo constituye la detección de heterogeneidad genética en una colonia de ratones consanguíneos BALB/c [2].

Con el método de *HotSHOT* se presenta la ventaja de rapidez, de bajo costo, la muestra se toma en forma relativamente fácil y cuando se trata de pocas pruebas es muy eficiente, sin embargo, presenta el inconveniente del rendimiento en aquellos estudios donde se analizan muchos loci.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran las ventajas y desventajas de dos métodos ensayados para obtención de ADN de ratón, la selección del método que se utilizará posteriormente depende del número de oligonucleótidos que se decida utilizar en el estudio; también se estandarizaron las condiciones para la amplificación mediante PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores para el locus D1Mit17, se hizo especial énfasis en la cantidad de ADN que debe utilizarse en

cada una de las técnicas ensayadas, lo cual es la base para establecer las condiciones óptimas para otros iniciadores.

Todos los resultados son fundamentales para poder comenzar los estudios de monitoreo genético mediante análisis de microsatélites, en cepas consanguíneas de ratones que se utilizan actualmente en cuatro de los principales bioterios del país.

AGRADECIMIENTOS

Los equipos menores y reactivos fueron suministrados a través de los proyectos CDCHT 1100, Universidad de Los Andes-Mérida y Lab-980001129 del FONACIT. Los equipos mayores utilizados en el presente trabajo fueron financiados por el BID-CONICIT y el CDCH de la Universidad de Carabobo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALTMAN, P.L.; KATZ, D.D. **Inbred and genetically defined strains of laboratory animals. Part I. Mouse and Rat; Part II. Hamster, Guinea Pig, Rabbit and Chicken.** Federation of American Societies for Experimental Biology. Bethesda Maryland. 7- 320 pp. 1979.
- [2] BENAVIDES, F.; CAZALLA, D.; PEREIRA, C.; FONTANALS, A.; SALAVERRI, M.; GOLDMAN, A.; BUGGIANO, V.; DRAN, G.; CORLEY, E. Evidence of genetic heterogeneity in BALB/c mouse colony as determined by DNA fingerprinting. **Lab. Anim.** 32: 80-85. 1998.
- [3] BENAVIDES, F. Genetic Contamination of an S¹/J Mouse Colony: Rapid Detection by PCR-based Microsatellite Analysis. **Contemp. Top.** 38: 54-55. 1999.
- [4] BENAVIDES, F.; GLASSCOCK, E.; COGHLAN L.G.; STERN M.C.; WEISS D.A.; CONTI C.J. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. **Lab. Anim.** 35: 157-162. 2001.
- [5] CHA, R.S.; THILLY, W.G. Specificity, Efficiency and Fidelity of PCR In: **PCR Primer A Laboratory Manual.** Edited by Dieffenbach C.W and Dveksler G.S. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 37-51 pp. 1995.
- [6] FESTING, M.F.W. Genetic contamination of laboratory animal colonies: an increasingly serious problem. **ILAR News** 25: 6-10. 1982.
- [7] FESTING, M.F.W. Genetic quality control in laboratory rodents. **Aging Clin. Exp. Res.** 5:309-315. 1993.
- [8] KAHAN, B.; AUERBACH, R.; ALTER, B.J.; BACH, F.H. Histocompatibility an isoenzyme differences in commercially supplied "BALB/c" mice. **Sci.** 217:379-381. 1982.

- [9] KURTZ, T.; MONTANO, M.; CHAN, L.; KABRA, P. Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats implications for research with spontaneously hypertensive rat. **Hypertension** 13:188-192. 1999.
- [10] LOVE, J. M.; KNIGHT, A. M.; McALEER, M.; TODD, J. A. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analyzed microsatellites. **Nucl. Acids Res.** 18: 4123-4130. 1990.
- [11] MARTÍNEZ, J.; BLANCO, Z.; HACKSHAW, P.; MORENO, N. Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el diagnóstico de la anemia falciforme en Venezuela. **SANGRE** 43:63-66. 1998.
- [12] MONTAGUTELLI, X.; SERIKAWA, T.; GUENET, J-L. PCR- analyzed microsatellites: Data concerning laboratory and wild-derived mouse inbred strains. **Mamm. Gen.** 1:255-259. 1991.
- [13] NADON, N. Resources-Research Programs. **Aging Rodent Resources** 1-4 pp. 2002.
- [14] SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Chapter 6. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2nd Ed. 6-62 pp. 1989.
- [15] SILVER, L.M. Genetic Markers. In: **Mouse Genetics. Concepts and Applications**. Chapter 8. 1st Ed. Oxford University Press, New York. 159-194 pp. 1995.
- [16] The Jackson Laboratory **Jax Mice Catalog** Bar Harbor, Maine. USA. N°490 Summer 2003. <http://jax-mice.jax.org/library/notes/490j.html>.
- [17] TRUETT, G.E.; HEEGER, P.; MYNATT, R.L.; TRUETT A.A.; WALKER, J.A.; WARMAN, M.L. Preparation of PCR-Quality mouse genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT) **BioTech**. 29:52-54. 2000.
- [18] ZÚÑIGA, J.M.; TUR MARÍ, J.A.; MILOCCO, S.N.; PIÑEIRO, R. **Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal**. Cap. 6. McGraw-Hill. Interamericana. 179-202 pp. 2001.