

PROTOCOLO SENCILLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE TEJIDO DE OREJA DEL RATÓN Y LA RATA, USANDO LA ENZIMA BROMELINA

A Simple Protocol for Molecular Analysis with DNA Extrated from Ear Tissue of Laboratory Animals: Mouse and Rat, Using Bromelina Enzyme

Néstor González¹, Neyda Rodríguez², Williams Torres², James O'Callaghan² y Rosa De Jesús^{2,3 *}

¹Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias. ²Bioterio. ³Laboratorio Fisiología Animal, Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. *rosadej@ula.ve

RESUMEN

Los métodos usados para el genotipo de los animales de laboratorio incluye el aislamiento del ácido Dexosirribonucleico (ADN) de biopsias de tejido, seguidas de la amplificación mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). Es importante para el desarrollo de esta técnica, poder contar con un molde de ADN de óptima calidad. La bibliografía reporta distintos métodos de extracción de diferentes tipos de tejidos, algunos basados en la hidrólisis con proteinasas, otros en exposición a ultrasonidos y otros usando detergentes o álcalis. Los métodos que utilizan la hidrólisis con proteinasas tienen como principio básico el uso de la proteinasa K, la cual digiere proteínas y remueve contaminantes a partir de las preparaciones de ácidos nucleicos. En este trabajo se propone la sustitución de la proteinasa K por la enzima Bromelina, la cual es una enzima digestiva proteolítica que contiene azufre y que es extraída del tallo y fruta de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr. Bromeliáceas). El ensayo realizado permitió obtener un ADN de alta calidad, con una relación de absorbancia de 1,6-1,9, tanto para el ADN extraído de tejido de piel de oreja de ratón como de rata, encontrándose bandas en las pruebas de electroforesis de aproximadamente 23 Kb., bien definidas. El ADN extraído del tejido de oreja, tanto de ratón como de rata, fue probado para amplificar microsátélites mediante la técnica de la RCP. Los resultados obtenidos permiten proponer el uso de esta enzima como alternativa en la purificación de ADN, abaratando el proceso.

Palabras clave: Extracción de ADN, animales de laboratorio, RCP.

ABSTRACT

Methods for gene typing of laboratory animals involve the isolation of Deoxyribonucleic acid (DNA) from tissue biopsies followed by the amplification of microsatellite using Polymerase Chain Reaction (PCR). Is very important for the development of this technology to count with a mold of DNA of ideal quality. The bibliography brings different methods of extraction of different types of tissue, some based on the hidrolisis with proteinasas, others with ultrasonic and other using detergents or alkalis. The methods that use the hidrolisis with proteinasas take the use of the proteinasa K as a basic element, which digests proteins and removes pollutants from the preparations of acids nucleicos. In the present paper is reported the use of the enzyme Bromelline as a substitute of the proteinase K in the extraction of DNA. Bromelline is a proteolytic enzyme which contains sulphur, it is obtained from the both stem and the fruit of the pineapple plant (*Ananas comosus*, of the Bromeliaceae family). With the use of Bromelline a high quality DNA was obtained to the ear's skin of either mouse or rat with relation of absorbance of 1.6-1.9. Electroforetically DNA threads with molecular weight about of 23Kb definite well. The DNA extracted from ear tissue, both of mouse and of rat, was used to amplified microsattelites by means of the PCR technique. The obtained results allow to propose the use of this enzyme as alternative in the purification of DNA, cheapening the process.

Key words: DNA extraction, laboratory animals, PCR.

INTRODUCCIÓN

Los métodos usados para el genotipo incluyen el aislamiento de ácido Dexosirribonucleico (ADN), seguido de la am-

plificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y el análisis de microsátélites [10,12]. Diferentes tejidos (sangre completa, piel, pelo, entre otros), se utilizan para la extracción del ADN genómico, usando distintos protocolos [6, 8, 11]; por ejemplo, utilizando kits comerciales según las instrucciones del fabricante. Sin embargo, cuando se evalúa en los bioterios, la condición genética de colonias de producción de animales de laboratorio, el elevado número de animales necesarios para corroborar la condición genética de éstos, los kits comerciales resultan costosos, por lo que se hace necesario contar con otros métodos de extracción que sean factibles para las condiciones de los bioterios en el país.

De Jesús y col. [1] presentaron la estandarización de una técnica de extracción de ADN de tejido de oreja de ratón (*Mus musculus*) teniendo como fundamento la técnica planteada por Truett y col. [15], denominada en el inglés como *HotSHOT* (en español: Disparo Caliente); la técnica estandarizada que permitió obtener ADN, tal como lo reveló el análisis en geles de agarosa al 0,9% y mediante espectrofotometría (Jenway Modelo 6305 UV/Vis – Reino Unido), con una concentración alta y una relación A_{260}/A_{280} de 1,2; además que la amplificación de secuencias con este ADN como sustrato fue satisfactoria. A pesar de los hallazgos se continuó ensayando en el bioterio de la Universidad de Los Andes en Mérida-Venezuela, diferentes métodos que permitieran la extracción del ADN, sin utilizar solventes orgánicos, ni kits comerciales, con los cuales se logren obtener muestras de ADN de tejido con parámetros de calidad aceptables para realizar diferentes pruebas moleculares, y que a la vez fuesen lo suficientemente económicos y rápidos, para la evaluación de la condición genética de grandes cantidades de animales de laboratorio, ya que no siempre, los métodos son reproducibles entre diferentes grupos y además proporcionan ADN en cantidad y calidad realmente variable [7].

Entre los métodos para realizar la extracción del ADN de tejido, se encuentran aquellos que se fundamentan en la hidrólisis con proteinasa K [2, 4], la cual digiere proteínas y remueve contaminaciones proteicas de las preparaciones de ácidos nucleicos [5]. La adición de proteinasa K inactiva rápidamente nucleasas que degradan el ADN o el ácido ribonucleico (ARN) durante la extracción. En este trabajo se plantea la sustitución de la proteinasa K por la enzima bromelina (EC 3.4.22.32), la cual es una cisteína proteasa extraída del tallo y fruta de la planta de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr. *Bromeliáceas*).

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un método sencillo para extraer ADN de tejido, con un máximo grado de pureza, basado en la aplicación de un método enzimático, pero utilizando una enzima comercializada a nivel farmacéutico como Ananase, con Bromelina como principio activo. La calidad del ADN obtenido se evaluó mediante espectrofotometría y electroforesis (BIO-RAD wide mini-subcell GT – Italia), además de utilizarlo en la amplificación de microsátélites mediante la técnica de la PCR (termociclador BIO-RAD Gene Cycle™-Japan); las pruebas realizadas conducen a pre-

sentar un método de extracción de ADN con un alto grado de pureza, de fácil aplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención del tejido de oreja de los ratones y ratas (*Rattus norvegicus*), se realizó la limpieza y esterilización del material de trabajo, se limpió cada oreja de los ratones y ratas a usar, con alcohol al 70% para desinfectar y evitar contaminaciones futuras. Se tomaron fragmentos de la oreja, de $\sim 2 \times 2$ mm², de 10 ratones del núcleo de fundación de la cepa consanguínea C57BL/6 y de 80 ratas (40 machos y 40 hembras) pertenecientes al núcleo de fundación de la línea *Sprague Dawley*, en tubos eppendorf estériles con 500 μ L de la solución 1 (Buffer TE; NaCl (Riedel-Haën) 0,4 M) pH 8,2. La solución de lavado fue descartada, adicionando posteriormente 400 μ L de solución 1, más 40 μ L de SDS (Sigma) al 10% y 8 μ L de Bromelina 20 mg/mL [13]. Las muestras fueron incubadas en estufa (Fabricante: Memmert (Alemania). Modelo 255111) a 37°C durante 2 horas, transcurrido este periodo de tiempo la temperatura de la estufa fue aumentada, a 65°C por 15 minutos más, con la finalidad de inactivar la enzima. Luego se agregaron 300 μ L de NaCl (Riedel-Haën) 6M, agitando seguidamente por inversión hasta observar la homogenización de la solución. Las muestras fueron centrifugadas en frío durante 30 minutos a 12.000g en centrifuga Marca KHT Modelo 420B-Taiwan. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y estériles adicionando 1 volumen de isopropanol (Merck), mezclando por inversión. Las muestras se dejaron durante 12-18 horas a 4°C en una nevera convencional de 287 L. Marca: mabe-Colombia. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12.000g en frío por 30 minutos. Finalmente, el precipitado fue recuperado y resuspendido en 100 μ L de agua ultrapura.

Las muestras de ADN se reprecipitaron, adicionándole 50 μ L de NaCl (Riedel-Haën) 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (Merck), se dejaron a -20°C (congelador vertical FE22 (-17°C) Marca Electrolux – Venezuela), durante 12 horas; seguidamente se centrifugó por 10 minutos a 12.000g, y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70% frío, secado en estufa (Fabricante: Memmert (Alemania). Modelo 255111; con rangos de temperatura de 0 –200°C-capacidad 53 Lts) a 37°C [11], resuspendido y almacenado en 100 μ L de agua ultrapura.

Para la estimación de la concentración del ADN genómico obtenido se realizó una dilución del ADN en agua, para posteriormente realizar las medidas de absorbancia a 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro (Jenway Modelo 6305 UV/Vis – Reino Unido).

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis (BIO-RAD wide mini-subcell GT – Italia) en geles de agarosa (Agarose D-1 LE CQT \times 100g – Scientific Trade Corp Miami-EUA); para ello se prepararon geles de agarosa al 0,9% en buffer TBE 0,5X, pH 8,2 empleándose como marcador de peso

molecular λ Hind III (Invitrogen) y revelado con bromuro de etidio (PROMEGA). La electroforesis en agarosa fue realizada a 90 Voltios (fuente de poder: BIO-RAD powerPac Basic™ – EUA) durante 60 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV de 254 nm (BIO-RAD transilluminator UV 2000 – EUA). El registro fotográfico se efectuó con una cámara digital SONYCyber-shot modelo DSC-W100, 8.1 megapixels (Brasil), dotado de un filtro (#15 orange 40,5 mm-EUA).

Para evaluar la calidad de las muestras de ADN obtenidas para ser amplificadas mediante RCP, se realizó la siguiente mezcla de reacción: Buffer RCP (Tris-HCl 20 mM pH 8,3, KCl 50 mM) 5X; dNTP's (Invitrogen) 200 μ M; oligonucleótidos iniciadores (para el locus *D13Mit99* para ratón y *R-119* para rata) 0,3 μ M; MgCl 3 mM; y 1,5 unidades de Taq polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase – PROMEGA); ADN 20 ng; agua nanopure (18 M Ω) estéril, en un volumen final de 50 μ L. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados en el ensayo fueron adquiridos a través de Eurofins MGW Operon [3].

La selección de la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores (TABLA I) para el análisis del microsatélite *R-119* para la rata y para el análisis del *D13Mit99* de ratón, se realizó usando la información aportada en bases de datos internacionales [9, 14], respectivamente.

La amplificación de cada uno de los *loci* se realizó con un equipo termociclador BIO-RAD Gene Cycle™ (Japan).

Se efectuó una etapa inicial de 1 paso de 4 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de amplificación realizados de la siguiente manera: desnaturalización 45 segundos a 95°C, hibridación 45 segundos entre 51-55°C, dependiendo del oligonucleótido iniciador usado; y extensión 30 segundos a 72°C, posteriormente se realizó un último paso de 4 minutos a 72°C. Las muestras, posteriormente se guardaron en una nevera convencional Marca: Mabe-Colombia de 287 L, a temperatura de 4°C. Luego de un año, las muestras han mantenido su calidad (resultados no presentados).

El tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% en buffer TBE 1X pH 8,2 y revelados con bromuro de etidio (PROMEGA). La escalera de peso molecular utilizada fue Φ X174RF/Hae III (Life Technologies). Las muestras fueron corridas a 110 V (fuente de poder: BIO-RAD powerPac Basic™ – EUA) durante 70 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV de 254 nm (BIO-RAD transilluminator 2000 – EUA). El registro fotográfico se efectuó con una cámara digital SONYCyber-shot modelo DSC-W100, 8.1 megapixels (Brasil), dotado de un filtro (#15 orange 40,5 mm – EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores encontrados con respecto a la calidad del ADN obtenido, medidos mediante espectrofotometría son presentados en la TABLA II, donde se presentan valores prome-

TABLA I
SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS MICROSATÉLITES *D13Mit99* DE RATÓN Y *R-119* DE RATA

Microsatélites	Oligonucleótidos iniciadores
<i>D13Mit99</i>	5'-GGGATGACGTTTGGAGTTG-3'
	5'-CTGCTTGGGATGTGGGTC-3'
<i>R-119</i>	(1) 5'-CAACAGGCAGATTTGGTGG-3'
	(2) 5'-TATAGTGGCAACTTTCAGATGGA-3'

TABLA II
RELACIÓN A_{260}/A_{280} Y CONCENTRACIÓN DE ADN OBTENIDA EN LA EXTRACCIÓN MEDIANTE EL MÉTODO EVALUADO DE TEJIDO DE OREJA

	A_{260}/A_{280}	μ g/mL
<i>C57BL/6//Aly//BIO</i>	1,6-1,9	468,3
<i>Sprague Dawley: BIOULA</i>	1,8-1,9	567,1

El cálculo de la concentración de ADN (μ g/mL), se realizó mediante la fórmula $A_{260} \times 50 \times$ dilución de la muestra (el número 50 representa una constante relacionada con una solución de ADN doble hélice, cuya concentración es de 50 μ g/mL con $A_{260} = 1$).

dios para la relación de los valores de absorbancia (A_{260}/A_{280}) y concentración en μ g/ μ L, con una cantidad total promedio de 60,15 μ g para ratones y de 47,50 μ g para ratas. Los valores de la relación oscilan entre 1,6 y 1,9 indicando una buena desprotección de las muestras de ADN [11]. En relación a la concentración de ADN expresada en μ g/mL se observó que se obtuvieron cantidades altas de ADN por el método desarrollado.

La integridad obtenida del ADN de ratón se muestra en la FIG. 1, y la de la rata en la FIG. 2, en ambas se pueden observar bandas bien definidas y sin degradación. En las FIGS. 3 y 4 se presentan los productos de amplificación logrados para los *loci D13Mit99* de ratón y el microsatélite *R-199* para rata, respectivamente. El análisis de la condición genética (determinación de la condición consanguinidad) de los animales que se producen en el bioterio de producción de la Universidad de Los Andes se lleva a cabo mediante: registros y análisis de microsatélites. Este último requiere un ADN molde de calidad con el fin de que los productos de amplificación que se obtengan a partir de éste, sean un producto que verifique la condición genética de los animales. Diferentes métodos de extracción se han descrito, sin embargo, la mayoría son costosos y laboriosos. En la búsqueda de un método que permitiera extraer el ADN de una manera rápida y económica de un número grande de animales bajo directrices éticas que no perjudiquen al animal en el año 2005 se estandarizó en el laboratorio el método propuesto por Truett y col. [15], quienes presentaron una alternativa simple lisando el tejido en un medio alcalino y neutralizando posteriormente con un buffer adecuado. Sin embargo, aplicando este método (*HotSHOT*), los resultados fue-

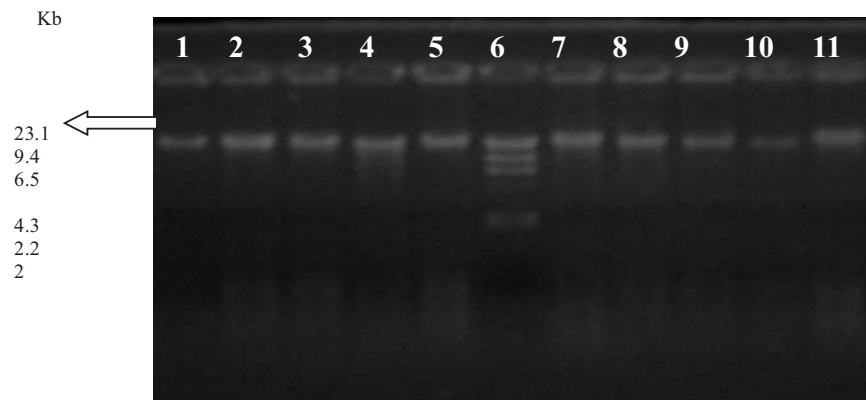


FIGURA 1. ADN EXTRAÍDO DE TEJIDO DE OREJA DE RATÓN. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 0,9% DONDE SE OBSERVAN LAS MUESTRAS DE ADN DE TEJIDO DE OREJA DE RATÓN EXTRAÍDAS MEDIANTE BROMELINA. CARRIL 6: MARCADOR *Hind* III. CARRILES 1-5 Y 7-11 MUESTRAS DE ADN.

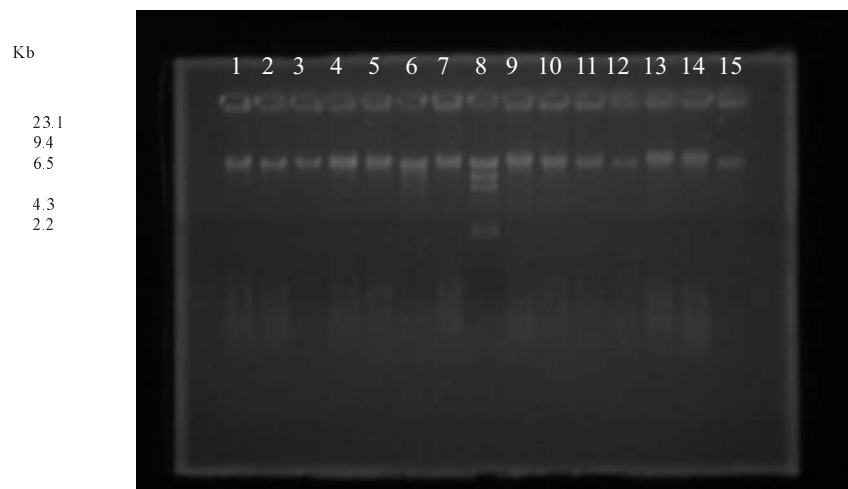


FIGURA 2. ADN EXTRAÍDO DE TEJIDO DE OREJA DE RATA. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 0,9% DONDE SE OBSERVAN LAS MUESTRAS DE ADN DE TEJIDO DE OREJA DE RATÓN EXTRAÍDAS MEDIANTE BROMELINA. CARRIL 8: MARCADOR *Hind* III. CARRILES 1-7 Y 9-15 MUESTRAS DE ADN.



FIGURA 3. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN USANDO ADN DE RATÓN (*C57BL/6//Aly//BIOULA*) EXTRAÍDO MEDIANTE EL MÉTODO EN PRUEBA, CON OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES *D13MIT99*. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2,5%: CARRIL 1: MARCADOR ϕ X174 *Hae* III. CARRIL 2: CONTROL NEGATIVO. CARRIL 3: CONTROL POSITIVO. CARRILES 3-13 PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE APROXIMADAMENTE 203 pb.

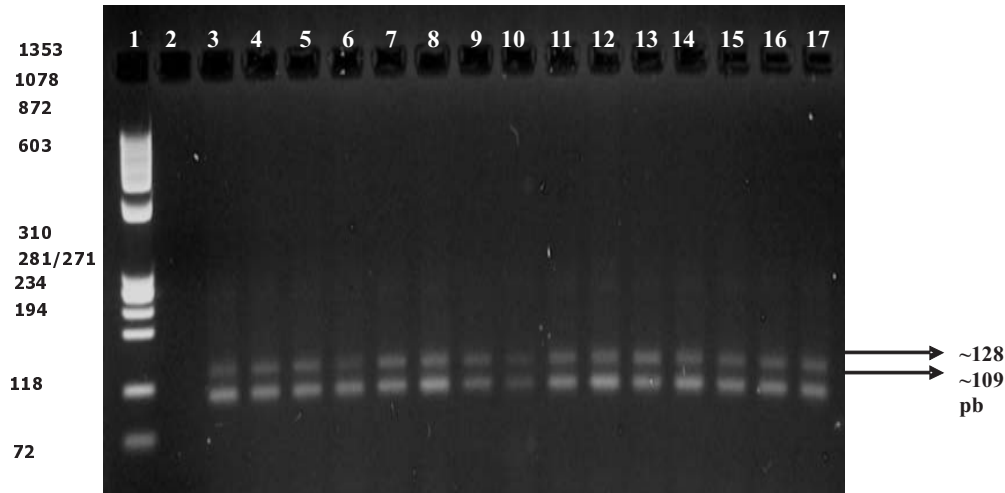


FIGURA 4. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN USANDO ADN DE RATA (*Sprague Dawley: BIOULA*) EXTRAÍDO MEDIANTE EL MÉTODO EN PRUEBA, CON EL PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES R-119. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2,5%: CARRIL 1: MARCADOR ϕ X174 *Hae* III. CARRIL 2: CONTROL NEGATIVO. CARRIL 3-13: PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.

ron variables. En esta oportunidad, al ensayar la extracción del ADN de tejido de oreja de ratón y rata utilizando la BROMELINA, no fue necesario un procesamiento posterior del mismo y los ADN aislados mantuvieron su integridad al menos por un año (datos no mostrados). El empleo del ADN extraído mediante esta metodología para la amplificación de los microsatélites descritos, mostraron productos consistentes y nítidos acordes con la calidad del ADN extraído.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas permiten proponer el uso de la enzima Bromelina como un excelente sustituto de la proteinasa K, en la extracción de ADN de tejido de ratones y ratas.

Esta proteína, la cual es el único principio activo de algunos antiinflamatorios es fácil de encontrar en las redes de farmacias de cualquier país, que además de ser económico lo hace accesible para cualquier laboratorio de investigación.

AGRADECIMIENTO

La investigación realizada recibió apoyo financiero del Centro de Desarrollo Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes-Mérida mediante el Proyecto N° C-1378-06-03-D.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] DE JESÚS, R.; MORENO, N.; MARTÍNEZ, J. A. Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos

mediante las reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XV(2): 134-140. 2005.

- [2] EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H.D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber". **Eur. J. Biochem.** 47 (1): 1-7. 1974.
- [3] EUROFINNS MGW OPERON. 2010. En Línea: http://www.mgw-biotech.com/html/s_synthesis/s_overview.shtml. 10.03.2010.
- [4] HILZ, H.; WIEGERS, U.; ADAMIETZ, P. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. **Eur. J. Biochem.** 56 (1): 103-8.1975.
- [5] HOFSTTER, J.R.; ZHANG, A.; MAYEDA, A.R.; GUSCAR, T.; NUMBERGER, J.I.; LAHIRI, D.K. A comparison of recovery methods and tissue sources. Genomic DNA from mice. **Biochem Mol Med.** 62:197-202. 1997.
- [6] HENNEBERG, C.; GRANTYN, R.; ROTHE, T. Rapid genotyping of newborn gene mutant mice. **J. Neurosci. Methods.** 100(1-2):123-6. 2000.
- [7] KUHAD, R.C.; KAPOOR, R.K.; LAL, R. Improving the yield and quality of DNA isolated from white-rot fungi. **Folia Microbiol.** 49: 112-116.2004.
- [8] MELDAARD, M.; BOLLEN, P.J.; FINSEN, B. Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. **Lab Anim.** 38(4):413-7. 2004.
- [9] RAT GENOME DATABASE. © Bioinformatics Program, HMGC at the Medical College of Wisconsin. En Línea: <http://rgd.mcw.edu>. 10.03.2010.
- [10] REN, S.; LI, M.; CAI, H.; HUDGINS, S.; FURTH, P.A. A simplified method to prepare PCR template DNA for

- screening of transgenic and knockout mice. **Contemp Top Lab Anim Sci.** 40:27-30. 2001.
- [11] SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Gel Electrophoresis of DNA. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** 2nd. Ed. Appendix E.1. and CH.6.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Pp: 4-34. 1989.
- [12] SLOBODANKA, K. El uso de animales en la investigación biomédica. **Rev Cien Hoy en línea.** 10: 62-66. 2000.
- [13] SPILVA, A.; MUKTANS, Y.; NAVARRETE, R. XV Productos para la lisis de los tejidos cicatriciales y de acción antiinflamatoria. **Guía SPILVA de las Especialidades Farmacéuticas.** XXX^a Ed. Global Ediciones, S.A. Caracas 745 pp. 2007.
- [14] THE JACKSON LABORATORY. 2010. En Línea: <http://www.jax.org/about/index.html>. 10.03.2010.
- [15] TRUETT, GE.; HEGGER, P.; MYNATT, RL.; TRUETT, A.A.; WALKER, J.A.; WARMAN, M.L. Preparation of PCR-quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). **Bio. Tech.** 29:52-54. 2000.