

Comparación de Tres Métodos para el Aislamiento de ADN en Girasol

Francisco Castillo Reyes

UAAAN, Depto. de Fitomejoramiento. Estudiante de maestría

Alma Patricia García Villanueva y Martha Gómez Martínez

UAAAN, Departamento de Fitomejoramiento, Técnicos académicos

M. Humberto Reyes Valdés

UAAAN, Departamento de Fitomejoramiento

Abstract. *Comparison of three methods for DNA isolation in sunflower. To obtain good quality DNA in a given species testing of different isolation methods is often required. Three methods of DNA isolation were tested in sunflower, and evaluated according to the concentration, purity and electrophoretic behavior of Puregene® DNA purification kit (Gentre systems), Doyle and Doyle (1990) and Graham et al. (1994). Two of those methods were acceptable for DNA isolation in terms of absorbance ratio, concentration and electrophoretic aspect. The method of Doyle and Doyle (1990) was selected for having a lower cost.*

Key words: sunflower, DNA.

Resumen. Para obtener ADN de buena calidad en una especie en particular, frecuentemente se requiere del ensayo de diferentes métodos de aislamiento. Se compararon tres métodos de aislamiento de ADN en girasol en términos de su concentración, pureza y comportamiento electroforético: Puregene® DNA purification kit (Gentre systems), Doyle y Doyle (1990) y Graham *et al.* (1994). Dos de estos métodos resultaron aceptables para aislamiento de ADN en términos de razón de absorbancia, concentración y aspecto electroforético. Se seleccionó el método Doyle y Doyle (1990) por tener un menor costo

Palabras clave: girasol, ADN.

Introducción

La mayoría de los métodos en genómica requieren del aislamiento del ADN puro y de alto peso molecular. La extracción del ADN no es siempre simple y los protocolos publicados no son necesariamente reproducibles para cualquier especie, debido a que un gran número de plantas producen metabolitos secundarios tales como alcaloides, flavonoides, fenoles, polisacáridos, terpenos, quininas y nucleasas que dificultan su aislamiento (Khanuja, *et al.*, 1999; Fellers, *et al.*, 2002; Chen y Ronald, 1999).

La literatura exhibe un gran número de procedimientos, muchos de los cuales son variantes de los métodos generales. El contar con un protocolo de extracción de ADN es importante especialmente cuando se trabajan con especies donde el protocolo de extracción específico no se ha establecido; tal es el caso del girasol (*Helianthus annuus* L.).

En general los métodos para extracción de ADN encontrados en la literatura buscan rapidez, calidad y economía, para que el producto se pueda utilizar con diferentes objetivos. Los métodos que se usan para extraer ADN se valen de diferentes agentes con actividad enzimática, proteica y detergentes como el ácido etilendiamino-tetracético (EDTA), EGTA y la fenentrolina; la proteinasa K; el duodecil sulfato de sodio (SDS); el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y el Tween a concentraciones diversas, según la especie que se analice.

Dentro de los métodos basados en el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), el cual se adiere fuertemente al ADN, desplaza las proteínas y previene la degradación, se encuentra el de Doyle y Doyle (1990) que consiste en la extracción con una solución con CTAB y mercaptoetanol, en la remoción del CTAB con cloroformo-alcohol isoamílico y en la precipitación con

isopropanol; el de Graham *et al.* (1994) en el que durante el proceso de extracción se usa albúmina sérica bovina en lugar de marcaptoetanol, y durante el de precipitación, etanol en lugar de isopropanol, además de que se le añade acetato de amonio.

Los métodos como el Edwards *et al.* (1991), Cheung *et al.* (1993) y Orad y Dronovalli (1992) utilizan dodecil sulfato de sodio (SDS), sarcosilato y mecaptoetanol, respectivamente, seguidos de precipitación. Los métodos de Guidet (1994) y Chunwongse *et al.* (1993) requieren extracción con Tween y proteinasa K, y chelex, respectivamente, además de incubación y centrifugación. El de Wang *et al.* (1993) requiere hidróxido de sodio.

La extracción con SDS permite precipitar proteínas y polisacáridos a partir de los extractos, lo que propicia que el ADN se mantenga en solución. La precipitación selectiva se lleva a cabo por el detergente SDS y altas concentraciones de acetato de potasio; la principal ventaja de este método es que no hay extracción con solventes orgánicos.

La extracción combinada de la proteinasa K y del EDTA inhibe o destruye completamente a las nucleasas. Una posterior dilución permite la remoción tanto del EDTA como del lauril sarcosina.

Actualmente se encuentran en el mercado paquetes de reactivos completos para el aislamiento de ADN de especies tanto vegetales como animales, como Puregene® DNA purification kit (Gentre systems). La ventaja del uso de estos paquetes es que el procedimiento se vuelve demasiado simple y se acortan los tiempos de aislamiento; la desventaja es su alto costo.

La presente investigación se llevó al cabo con el propósito de seleccionar un método de aislamiento de ADN en girasol, que permita obtener un producto de calidad en términos de pureza, concentración y peso molecular.

Materiales y Métodos

Diseño

El experimento consistió en la comparación sistemática de tres métodos que previamente habían permitido aislar ADN en girasol (Cuadro 1) en el Laboratorio de Análisis de Genomas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. El material biológico consistió en la línea de girasol cultivado HA-89, y una población silvestre de *H. annuus* spp. *texanus* (Ac-8-2) recolectada en Saltillo, Coah, México.

Cuadro 1. Métodos de extracción.

Método	Nombre del método de extracción
1	Puregene® DNA purification kit (Gentre systems)
2	Doyle & Doyle (1990)
3	Graham <i>et al.</i> (1994)

La extracción de ADN se efectuó a partir de hojas meristemáticas de plántulas desarrolladas en invernadero. Los tratamientos constaron de dos repeticiones por cada tipo de girasol, lo que representó un total de cuatro repeticiones para cada una de las metodologías.

Las variables cuantitativas evaluadas en cada método fueron concentración y tasa de absorbancia (RA) de ADN (A_{260}/A_{280}). Por otra parte, se evaluó visualmente el comportamiento electroforético de cada muestra. Con ADN aislado por medio del método seleccionado se hizo una serie de reacciones de la ADN polimerasa en cadena (PCR) con un iniciador pseudoaleatorio (Williams *et al.*, 1990). Con el fin de validar la eficiencia de este método en girasol cultivado, para la PCR se extrajo ADN de la variedad Primavera.

Métodos de extracción

Método 1. Puregene® DNA purification kit (Gentre systems)

Soluciones:w

- Solución de lisis
- Solución de ARNasa al 10 % (marca Epicentre)
- Solución de precipitación de proteínas
- Isopropanol absoluto
- Etanol al 70%
- Solución TE 1X.

Se congelaron 0.03 g de tejido en un ultracongelador marca Revco, se pulverizó la muestra en un mortero y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y 300 µl de la solución de lisis. Se mezcló e incubó a 65 °C durante 60 min, se agregó ARNasa a una concentración final de 10 mg/ml y se mezcló por inversiones suaves e incubó a 37°C durante 20 min.

Se agregaron 100 µl de solución de precipitación de proteínas, se mezcló por inversiones y se colocó en hielo por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min en una centrífuga marca Eppendorf, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo al que se le agregaron 300 µl de isopropanol (2-propanol) y se mezcló por inversiones suaves para precipitar el ADN. Se

centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante, se lavó con 300 µl de etanol al 70 % y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente se hidrató con TE 1X y se almacenó a -20°C.

Método 2. Doyle y Doyle (1990) con modificaciones menores, consistentes en aumentar la cantidad de buffer de extracción y usar isopropanol para la precipitación.

Soluciones:

Solución de extracción [CTAB 2%, NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM (pH 8), Tris 100 mM (pH 8) y 2-mercaptoetanol 2%], adicionado inmediatamente antes de su uso.

Solución de lavado [etanol al 76%, acetato de amonio 10 mM].

Solución TE 1X [Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM].

Solución de Cloroformo–alcohol isoamílico (24:1, V/V)

Isopropanol absoluto

Solución de ARNasa (10 mg/ml) (marca Epicentre)

Se congelaron 0.2 g de tejido en un ultracongelador marca Revco, se pulverizó la muestra en un mortero y se colocó en un tubo para microcentrífuga, se le agregaron 800 µl de solución de extracción recién preparada y se incubó a 65°C en baño María. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min en una centrífuga marca Eppendorf, y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo. Inmediatamente se agregó un volumen igual de cloroformo–alcohol isoamílico y se mezcló por inversiones suaves. Se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 min y se separó nuevamente la fase superior en un tubo nuevo. Para la eliminación de ARN se trató con ARNasa (10 mg/ml) incubando durante 30 min. a 37°C. En seguida se agregaron 800 µl de isopropanol a -20°C, y se colocó una hora en el congelador para precipitar el ADN. Para formar la pastilla de ADN, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min. Se tiró el sobrenadante, se lavó la pastilla con 400 µl de solución de lavado una y otra vez, con 400 µl de alcohol al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en una cantidad 1:1 de solución TE 1X.

Método 3. Método Graham *et al.* (1994).

Soluciones:

Solución de extracción [CTAB 2%, NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM (pH 8), Tris 100 mM (pH 8) y albúmina sérica bovina al 2%)

Solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, V/V)

Acetato de amonio 7.5 M

Etanol absoluto

Etanol al 70%

Solución TE 1X [Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM].

Se congelaron 0.2 g de tejido en un ultracongelador marca Revco, se pulverizó la muestra en un mortero y se colocó en un tubo; se agregó 1 ml de solución de extracción y se mezcló e incubó a 55°C durante 20 min. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm en una centrífuga marca Eppendorf, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló por inversiones suaves y se volvió a centrifugar. Se separó nuevamente la fase superior, se le agregó 1/10 de volumen de acetato de amonio al 7.5 M y dos volúmenes de etanol congelado. Se mezcló suavemente y se colocó en el congelador para precipitar. Se volvió a centrifugar a las mismas condiciones, se decantó y lavó la pastilla con alcohol al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente y por último se hidrató con solución TE 1X.

Evaluación del ADN extraído

La cuantificación de la concentración y razón de absorbancia (RA) se midió en un espectrofotómetro marca BioMate^{MT} serie 3, bajo longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. La concentración del ADN en cada muestra se determinó con la fórmula µg/ml de ADN = Absorbancia de 260 X 50 X factor de dilución, donde 50 es un factor para ADN de doble cadena. El indicador de pureza del ADN se estimó del cociente de los valores de absorbancia de 260 nm y 280 nm con la media de cuatro lecturas de espectrofotometría.

Asimismo, la calidad del ADN aislado se corroboró por electroforesis, lo cual se analizó visualmente el grado de barrido en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta de 360 nm.

Amplificación por PCR del ADN aislado

Se efectuó una mezcla para la reacción de amplificación descrita por Williams *et al.* (1990) de 25 µl, compuesta por 14 µl de H₂O, 4 µl de buffer 10X adicionado con MgCl₂, 0.5 µl de la mezcla dNTP (10 mM de cada dNTP), 1.0 µl iniciador TGCCGAGCTG (40 mM), 0.5 µl Taq DNA polimerasa (5 units/µl) y 5 µl de ADN. Tanto la Taq polimerasa como el buffer y los dNTPs fueron marca Roche.

Por último se adicionó aceite mineral y se efectuó la PCR en un termociclador marca MJ Research bajo el siguiente programa: 1 ciclo de 1 min a 94°C (desnaturalización) y 44 ciclos de 1 min a 92°C, de 1 min a 36°C, de 2 min a 72°C, y de 7min a 72°C para extensión final.

Los productos de PCR amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1 %, en solución TBE y visualizado por tinción con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

Las concentración y razón de absorbancia de ADN obtenido de las muestras de los tres métodos fue sometida a análisis de varianza con dos factores: metodologías y subespecies (SAS System v8).

Resultados y Discusión

Los análisis de varianza para concentración, RA y producción de ADN no revelaron diferencias significativas entre los tres métodos (Cuadro 2, 3 y 4), lo cual sugiere que las discrepancias entre las medias pueden deberse a efectos de muestreo.

Cuadro 2. Análisis de varianza para concentración de ADN

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Metodologías	2	105.22	52.61	2.51	0.14
Subespecies	1	0.27150	0.27	0.01	0.91
Error	8	167.44	20.93		
Total	11	272.93			
C.V. = 74.49511					

Cuadro 3. Análisis de varianza para razón de absorbancia (RA) de ADN.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Metodologías	2	0.11	0.05	1.69	0.24
Subespecies	1	0.02	0.02	0.60	0.46
Error	8	0.26	0.03		
Total	11	0.38			
C.V. = 11.79479					

Cuadro 4. Análisis de varianza para producción de ADN.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Metodologías	2	1.07	0.53	0.98	0.42
Subespecies	1	0.10	0.10	0.19	0.68
Error	8	4.39	0.55		
Total	11	5.56			
C.V. = 59.82800					

La concentración de ADN varió numéricamente entre métodos (Cuadro 5). La mayor proporción en concentración se obtuvo con Graham *et al.* (1994) y menor en Puregene® DNA purification kit (Gentre systems). Así mismo, el método que se ajustó a los rangos de pureza del ADN fue el de Doyle y Doyle (1990), determinado por la razón de absorbancia y considerando que una muestra libre de proteína se encuentra en el rango de 1.6 a 1.8. Las diferencias en concentración de ADN y RA se pueden deber a un efecto de muestreo, ya que el análisis de varianza no dio resultados significativos.

Respecto a la cantidad relativa de ADN obtenida por gramo de tejido y tiempo requerido para el proceso de extracción (Cuadro 5) con el método del Kit Puregene® se logró aislar mayor cantidad de ADN por gramo de tejido y en menor tiempo (en 1 día) que con el resto de los métodos, los cuales requieren de 2 días para aislar y verificar la calidad del ADN.

Cuadro 5. Comparación de tiempo, concentración y razón de absorbancia (RA) entre muestras de ADN de girasol extraídas por 3 métodos de aislamiento.

Método de extracción	Tiempo (Días)	Concentración DNA (µg/ml)	Pureza (RA)	Producción ADN (µg/gr)
Puregene® DNA purification kit (Gentre systems)	1	1.98	1.45	1.66
Doyle & Doyle (1990)	2	7.80	1.65	0.98
Graham <i>et al.</i> (1994)	2	8.64	1.44	1.08

En general, la producción de ADN obtenida con ambas metodologías es superior o similar a la reportada en la literatura con otras metodologías. Según Doyle y Doyle (1990) la cantidad de ADN que se obtiene por gramo de tejido es un miligramo y, aunque depende mucho de la edad y calidad del tejido, y de la especie, también indica que la cuantificación por absorbancia a 260 nm puede propiciar resultados erróneos por interferencia de residuos de CTAB en las muestras, por eso su estimación no es confiable. En este caso, la determinación de la concentración por espectrofotometría se considera buena, pues los mismos resultados se comprobaron con la intensidad de las bandas en el gel de agarosa. Así, el ADN que se aisló con el método Doyle y Doyle (1990) y el kit comercial no presentó barrido, lo que indica un ADN de calidad; también se observó una banda de peso molecular alto. Sin embargo, en el ADN aislado con Graham *et al.* (1994) sí se observó barrido, lo que representa degradación del ADN y, por lo tanto, mala calidad.

De los tres métodos de extracción evaluados para el aislamiento de ADN en girasol, el que mejor se ajustó a totalidad de los criterios de concentración, pureza, electroforesis y costo fue el de Doyle y Doyle (1990). No obstante, la falta de diferencias significativas en pureza y concentración, la evaluación visual o electroforética y su bajo costo, hacen a este método elegible para ser adoptado en tecnología de ADN en girasol.

Después haber considerado los criterios de selección y optar por la metodología de Doyle y Doyle (1990) como práctica estándar en el laboratorio, el ADN se sometió a amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores para RAPDs bajo diferentes diluciones de ADN con el objetivo de determinar la dilución en función del mejor patrón de bandas. La dilución en la cual se observó un mejor patrón de bandas (productos de PCR) fue en la de 1 ng/μl.

Este método ofrece una alternativa interesante y eficiente al eliminar los kits, que son muy costosos, y obtener ADN de calidad para realizar análisis de PCR como los RAPDs y AFLPs.

Conclusiones

Los métodos de Puregene® DNA purification kit y Doyle y Doyle (1990) permitieron aislar ADN de buena concentración y calidad. Sin embargo, el método de Doyle y Doyle (1990) es de más bajo costo por lo cual es elegible si existen restricciones económicas.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó al cabo con fondos provistos por el CONACYT (Ref. 39035-B) y la UAAAN (Ref. 02.03.0203.2401).

Literatura Citada

Chen, D.H. and Ronald P.C. 1999. A Rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17:53-57.
 Cheung, W.Y., Hubert, N., and Landry, B.S. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, ani-

mal, and insect suitable for RAPD and other PCR analysis. *Technical Tips*, 3:69-70.

Chunwongse, J., Martin, G. B. and Tanksley, G. B. 1993. Pregermination genotypic screening using PCR amplification of halfseeds. *Theor. Appl. Genet.* 86: 694-698.
 Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
 Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for analysis. *Nucleic Acids Res.* 19:1349.
 Fellers, J. P., Hill-Ambroz K.L., and Brown-Guedira, G.L. 2002. Modified rapid DNA extraction protocol for high throughput microsatellite analysis in wheat. *Crop Science* 42:2088-2091.
 Graham, G. C., Mayer, P. and Henry, R. J. 1994. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques* 16:48:50.
 Guidet, F., 1994. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.* 22: 1772-1773.
 Henry, R.J. 1997. Practical applications of plant molecular biology. First edition. Chapman & Hall. Great Britain. 258 p.
 Khanuja, S.P.S., Ajit, K.S, Darokar, M.P. and Kumar, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17:1-7. <http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ispmb/ispmb17/17074-1.pdf> (24/10/2003).
 Orad, J. H., and Dronavalli, S. 1992: Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10: 236-241.
 Wang H, Qi, M. and Cutler, A.J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.
 Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalsky, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.