

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Boopedon nubilum* PARA ESTUDIOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA**

René Torres-Ricario, Ruth Elizabeth Alanis-Bañuelos, J. Natividad Gurrola-Reyes, Laura Anabel Páez-Olivan, Eli Amanda Delgado-Alvarado, José Roberto Medina-Medrano, Alfonso Reyes-Martínez, Marcos Cobaleda-Velasco, Hugo Monreal, Ana Chaidez-Ayala

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional, Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, Durango, Durango, México, 34220  
Correo electrónico: renetr27@gmail.com

**RESUMEN**

La extracción de ADN ha sido un factor limitante en estudios genéticos que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en digestiones del ADN, por lo que es importante utilizar protocolos que permitan obtener cantidades suficientes de ADN con una pureza elevada. En el presente trabajo se evaluaron dos métodos de extracción de ADN a partir de tejido muscular del fémur posterior de *Boopedon nubilum* (Orthoptera: Acrididae) basados en CTAB y SDS; las cantidades promedio obtenidas fueron 286 y 302 ng/ $\mu$ L, respectivamente que son suficientes para la amplificación por PCR de algún tipo de marcador molecular; las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.82$ ). El ADN obtenido con el método que usa CTAB presentó mayor contaminación con proteínas ( $A_{260}/A_{280} = 1.46$ ) que el obtenido con el método que usa SDS ( $A_{260}/A_{280} = 1.97$ ). El ADN obtenido con el método de SDS fue de mayor tamaño molecular y presentó menor degradación que el obtenido con el método de CTAB, además pudo ser digerido con enzimas de restricción con mayor reproducibilidad que el obtenido con el método con CTAB. La inclusión del detergente SDS en el método de extracción de ADN de *Boopedon nubilum* permite obtener este material en cantidad y calidad adecuadas para estudios de variabilidad genética de esa especie.

**PALABRAS CLAVE:** Extracción de ADN, digestión de ADN, calidad de ADN, SDS, CTAB

**ABSTRACT**

DNA isolation has been a limiting step for genetic studies based on polymerase chain reaction (PCR) and DNA digestions, because of that it is important to use protocols which help to achieve good DNA quality and quantity. In the present study, two protocols based on CTAB and SDS were evaluated to obtain DNA from *Boopedon nubilum* (Orthoptera: Acrididae), obtaining 286 ng/ $\mu$ L from the CTAB method and 303 ng/ $\mu$ L from the SDS one; no significant differences between methods ( $p=0.82$ ) were found. The DNA purity was higher by using the SDS protocol ( $A_{260}/A_{280} = 1.97$ ) than using the CTAB protocol ( $A_{260}/A_{280} = 1.46$ ). Besides, the DNA obtained with the SDS method was digested with restriction enzymes. The use of SDS to isolate DNA from *Boopedon nubilum* allows obtaining this substance in an adequate quantity and quality for studies of genetic variability.

**KEY WORDS:** DNA extraction, DNA digestion, DNA quality, SDS, CTAB

**INTRODUCCIÓN**

Los estudios de variabilidad genética son una medida del potencial evolutivo de las especies de responder a los cambios y a la adaptación a lo largo del tiempo (Rodríguez-Muñoz *et al.*, 2006; Toro y Caballero, 2005). Esta diversidad se refiere principalmente a una variación de alelos y genotipos entre individuos y poblaciones, que se ve reflejado en diferencias fisiológicas, morfológicas o de comportamiento entre ellos (Frankham, 2002). Una pérdida en la diversidad genética puede afectar el potencial evolutivo y aumentar el riesgo de extinción de las poblaciones (Chapuis *et al.*, 2012). El conocimiento acerca de los efectos demográficos y su relación con la variabilidad genética de invertebrados, como los insectos, ha sido poco estudiada, además que este tipo de información es generalmente escasa en la fauna ortóptera por lo cual cada vez se realizan más estudios de este tipo (Chapuis *et al.*, 2012; Clarke y Spier-Ashcroft, 2003; Chapuis *et al.*, 2008; Sword *et al.*, 2005; García, 2006).

Una gran cantidad de herramientas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han tomado importancia en investigaciones con insectos

para estudios taxonómicos, de genética poblacional y evolutivos (Lagisz *et al.*, 2010). Siendo la extracción de ADN un paso vital e incluso limitante en algunos casos, una gran variedad de métodos se han desarrollado, así como kits comerciales están disponibles, estos métodos son evaluados con base en su eficiencia, costo, y efectos colaterales, como degradación del ADN durante la extracción. Los métodos basados en SDS y CTAB son de los más comúnmente usados en una gran variedad de organismos (Chen *et al.*, 2010). Los marcadores moleculares basados en PCR necesitan cantidades mínimas de ADN para poder ser amplificados (Rodríguez-Romero *et al.*, 2011). Pero existen técnicas como los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) que requieren una digestión completa de ADN genómico con enzimas de restricción ya que la mínima cantidad de ADN sin digerir puede suponer algún tipo de banda detectable, interpretando estas bandas como falsos polimorfismos (Štys y Kerzhner, 1975). Por lo que un ADN degradado o sin la pureza requerida puede perjudicar este tipo de estudios.

En el presente trabajo se evaluaron dos métodos de extracción de ADN en la especie de chapulin *Boopedon nubilum* para su uso en estudios de variabilidad genética, en los que se requiere una pureza alta del ADN genómico para su digestión con enzimas de restricción y cantidades mínimas para su amplificación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tejidos animales

Se analizó, de manera independiente, tejido muscular del fémur anterior (Chiappero *et al.*, 2004) de 20 individuos de *Boopedon nubilum* en estado adulto, colectados en diferentes puntos del estado de Durango, colocados en alcohol al 75% para su preservación, y mantenidos en congelación a -20°C hasta su uso.

### Extracción de ADN

Método que incluye CTAB en el regulador de extracción

Se utilizó el método reportado por Barragán-Valencia *et al.* (2009). Los insectos se lavaron cuatro veces con una solución al 0.065% de NaCl para remover el etanol e impurezas. Los tejidos se homogenizaron con una solución de buffer CTAB (2%CTAB, 1.4M NaCl, 0.2% 2-mercaptoetanol, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8) a 60°C durante una hora. Posteriormente se agregó un volumen de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente, y se centrifugó a 6000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se recuperó, se combinó con dos volúmenes de isopropanol frío, se mezcló, y se mantuvo a temperatura

ambiente durante 20 minutos para que ocurriera la precipitación de los ácidos nucleicos. Después, se centrifugó a 6000g durante 10 minutos; el sobrenadante se descartó y la pastilla resultante se lavó dos veces con etanol al 75%. Finalmente la pastilla de ácidos nucleicos se resuspendió en 50µL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.4). En todo el procedimiento se utilizó material esterilizado.

Método que incluye SDS en el regulador de extracción

Se empleó el método reportado por Aljanabi y Martínez (1997), este método ha sido empleado con una gama amplia de grupos de organismos. Los tejidos fueron homogenizados en 400 µL de un regulador, conteniendo 0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, durante 5 minutos mínimo por muestra, Después, se agregaron 40µL de una solución de SDS al 20% (concentración final del 2%) y 8µL de una solución 20mg/mL de proteinasa K (400µg/mL concentración final), se mezcló en vortex. Las muestras fueron incubadas entre 55 a 65°C durante dos horas. Después se agregaron 300µL de una solución 6M de NaCl, se mezclaron y se centrifugaron durante 30 minutos a 10000g. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y estéril. Se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló vigorosamente y las muestras se incubaron a -20°C durante una hora, después se centrifugó durante 20 minutos a 10000 g (4°C). La pastilla de ácidos nucleicos se lavó dos veces con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 500µL de agua bidestilada. En todo el procedimiento se utilizó material esterilizado.

### Medición de cantidad y estimación de la pureza de ADN

Los métodos para determinar la cantidad y pureza del ADN fueron los mismos para los dos protocolos; se realizaron las mediciones de forma espectrofotométrica. Para estimar la cantidad de ADN se tomaron 10µL de ADN extraído por el método de SDS y se combinaron con 990µL de agua bidestilada (factor de dilución de 99), y 4µL de ADN extraído con el método de CTAB y se mezclaron con 996µL de agua bidestilada (factor de dilución de 250). Se midió la absorbancia a 260nm. Considerando que una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50ng/µL de ADN, se hizo el ajuste correspondiente al valor de absorbancia obtenido para calcular la cantidad de ADN presente en cada muestra (Chan, 1992). La pureza se determinó de manera espectrofotométrica de acuerdo a (Sambrook y Russell, 2001). Se registraron las medidas de absorbancia a 260nm y 280nm, y se calculó la relación  $A_{260nm}/A_{280nm}$ .

### Integridad del ADN

La integridad del ADN extraído se evaluó por medio de

electroforesis en geles de agarosa al 1%, usando 4 $\mu$ L de muestra más 1 $\mu$ L de syber gold (INVITROGEN) para su visualización.

#### Digestión de ADN genómico

La integridad y pureza del ADN extraído también se evaluó por medio de enzimas de restricción mediante el protocolo modificado de Vos *et al.* (1995). Se tomó 1 $\mu$ g de ADN y se sometió a digestión durante una hora a 37°C con 5U de la enzima EcoRI y 5U de la enzima Tru9I (combinadas) en 40 $\mu$ L de buffer de digestión (10mM Tris-HAc pH 7.5, 10mM MgAc, 50mM KAc, 5mM DTT, 50ng/ $\mu$ L BSA). El ADN digerido se visualizó en geles de agarosa al 1.5%.

#### RESULTADOS

Se analizaron 20 individuos de *Boopedon nubilum*, de los cuales se obtuvieron resultados positivos de las extracciones en el 100% de los casos con los dos métodos. El tiempo promedio

de extracción para el protocolo de CTAB fue de alrededor de tres horas, y para el método de SDS se incrementó hasta cuatro horas.

Las cantidades de ADN y las relaciones de absorbancia entre 260nm y 280nm se presentan en la Tabla 1. El método de extracción no mostró diferencias estadísticas significativas con respecto a la cantidad de ADN obtenido, teniendo valores promedio de 286 ng/ $\mu$ L para el método de CTAB y de 303 ng/ $\mu$ L para el método de SDS ( $F = 1.68$ ,  $gl = 40$ ,  $p=0.82$ ). La pureza del ADN medida por la relación  $A_{260}/A_{280}$  presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.02$ ), obteniendo una media de 1.46 para el método de CTAB y de 1.97 para el método de SDS.

A pesar de que ambos métodos permitieron obtener cantidades suficientes de ADN, la pureza obtenida, estimada con el valor de la relación  $A_{260}/A_{280}$ , indicó la presencia de una mayor cantidad de proteína en el ADN aislado con el método basado en CTAB que con el basado en SDS (Tabla 1).

Tabla 1. Cantidad y calidad de ADN de chapulines de la especie *Boopedon nubilum*, obtenido con dos métodos de extracción y tiempo de realización.

	CTAB	SDS
Cantidad de ADN (ng/ $\mu$ L)	286.9 $\pm$ 275.4*	303.36 $\pm$ 212.3*
Pureza ( $A_{260}/A_{280}$ )	1.46 $\pm$ 0.59**	1.97 $\pm$ 0.76**
Tiempo (h)	3.2	4.1

Los valores representan la media y desviación estándar. \* No existe diferencia significativa ( $p=0.82$ ), \*\* Existen diferencias significativas ( $p=0.02$ )

La integridad del ADN se visualizó en geles de agarosa al 1% (Figura 1), éstos mostraron una mayor degradación de las muestras de ADN obtenidas por el método de CTAB que por el método de SDS, como lo indicó la presencia de un fondo ("background") fluorescente a lo largo de los carriles de los geles conteniendo muestras de ADN aislado con el método de CTAB. Las muestras que se presentan en la Figura 1 fueron las que presentaron mayor pureza de cada método. Esas mismas muestras fueron digeridas con enzimas de restricción (EcoRI y TRU91 en digestión combinada) para probar su pureza, ya que esas enzimas son activas sobre un ADN con alto grado de pureza. Los fragmentos de restricción generados se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% (Figura 2).

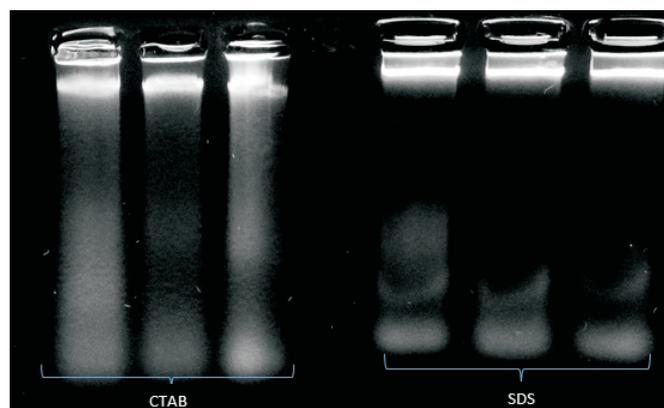


Figura 1. Integridad del ADN de *Boopedon nubilum* obtenido con dos métodos de extracción, CTAB (izquierda) y SDS (derecha)

Sólo una de las muestras obtenidas por el método de CTAB fue digerida por las enzimas de restricción (Figura 2), en cambio, las tres muestras analizadas obtenidas con el método de SDS fueron digeridas, lo que se aprecia por el "background" a lo largo de los carriles correspondientes del gel de la Figura 2. La mayor contaminación con proteínas de las muestras de ADN obtenidas con el método basado en CTAB (Tabla 1) pudo haber inhibido la actividad de las endonucleasas.

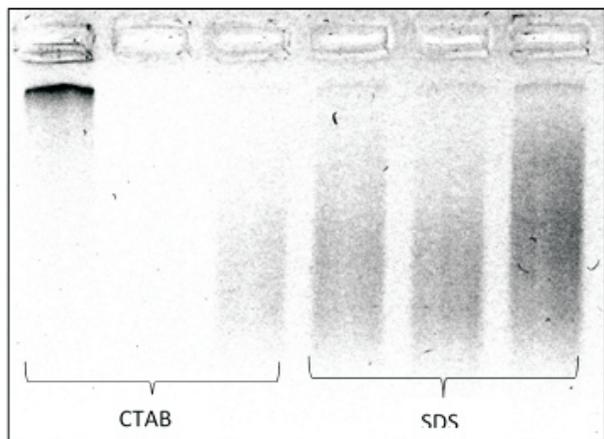


Figura 2. Digestión, con una combinación de las enzimas EcoRI y Tru9I, de ADN genómico de *Boopedon nubilum* obtenido por dos métodos de extracción, CTAB (derecha) y SDS (izquierda).

## DISCUSIÓN

Los métodos de extracción evaluados permitieron obtener cantidades suficientes de ADN para estudios moleculares. Sin embargo, la pureza del ADN aislado con el protocolo basado en SDS fue mayor que la de las muestras obtenidas con el basado en CTAB. El método de CTAB originalmente fue desarrollado para obtener ADN de plantas, la modificación llevada a cabo por Barragán-Valencia *et al.* (2009) fue para usarse en insectos (*Diabrotica virgifera zea* Krysan y Smith y *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte); esos autores obtuvieron cantidades de ADN superiores a las obtenidas en el presente trabajo, que variaron entre 827 y 926 ng/ $\mu$ L de ADN, comparado con la cantidad promedio (286 ng/ $\mu$ L) del presente estudio. La pureza promedio del ADN de *Boopedon nubilum* obtenido con el método basado en CTAB fue menor ( $A_{260}/A_{280} = 1.46$ ) que la obtenida por Barragán-Valencia *et al.* (2009) ( $A_{260}/A_{280} = 1.9$ ) para ADN de especies de *Diabrotica*.

El método basado en SDS produjo cantidades promedio menores de ADN (303 ng/ $\mu$ L) que los obtenidos por Aljanabi y Martínez (1997), que fueron entre 500 y 800 ng/ $\mu$ L, pero el obtenido en el presente trabajo fue de mayor pureza ( $A_{260}/A_{280} = 1.9$ ) que el reportado por esos mismos autores ( $A_{260}/A_{280} = 1.7$ ). En el presente trabajo y en el de Aljanabi y Martínez (1997) se

obtuvieron resultados positivos con respecto a la digestión del ADN con enzimas de restricción.

El ADN de *Boopedon nubilum* no presentó diferencias significativas ( $P = 0.82$ ) con respecto a la cantidad obtenida con los dos métodos evaluados en el presente estudio, pero sí mostró diferencias significativas ( $p = 0.020$ ) entre protocolos con relación a la pureza. A pesar de que la temperatura de lisis es semejante en ambos protocolos, un factor que podría haber generado las diferencias encontradas, además del tipo de detergente, fue el tiempo de lisis, ya que en el método de CTAB solo se necesita una hora mientras que para el método de SDS se necesita más de una hora (Shahjahan *et al.*, 1995). Debido a la naturaleza de los saltamontes, la cantidad de proteínas y monosacáridos presentes en su exoesqueleto (Blomquist *et al.*, 1987; Adeyeye, 2005) pueden inhibir el proceso de extracción de ADN, por lo que la proteinasa K presente en el protocolo de SDS pudo haber favorecido la obtención de ADN más puro, como se observó en el presente estudio. Son necesarios análisis más detallados acerca de la composición química de los chapulines de la especie *Boopedon nubilum* para poder identificar algún compuesto que pueda favorecer o afectar el aislamiento de ADN (Rossen *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el método basado en SDS, previamente reportado por Aljanabi y Martínez (1997), permite obtener ADN de *Boopedon nubilum* en cantidad y calidad adecuadas para su uso en futuros estudios de variabilidad genética y de genética poblacional de esa especie.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeyeye, E. 2005. Amino acid composition of variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Tropical Science* 45: 141-143.
- Aljanabi, S. M., I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Barragán-Valencia, G., N. Almaraz-Abarca, R. Álvarez-Zagoya, E. A. Delgado-Alvarado, J. F. Pérez-Domínguez. 2009. DNA Isolation from *Diabrotica virgifera zea* Krysan and Smith y *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) by a CTAB simplified procedure. *Southwestern Entomologist* 34: 289-294.
- Blomquist, G. J., D. R. Nelson, M. De Renobales. 1987. Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 6: 227-265.
- Clarke, G. M., F. Spier-Ashcroft. 2003. A review of the conservation status of selected Australian non-marine invertebrates, Department of the Environment and

- Heritage. Australia.
- Chan, T. W. V. 1992. Extraction of nucleic acids from clinical samples and cultured cells. In: Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach. (Eds. ) IRL Press, Oxford, pp. 1-23.
- Chapuis, M. P., M. Lecoq, Y. Michalakis, A. Loiseau, G. Sword, S. Piry, A. Estoup. 2008. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular Ecology* 17: 3640-3653.
- Chapuis, M. P., R. Streiff, G. Sword. 2012. Long microsatellites and unusually high levels of genetic diversity in the Orthoptera. *Insect Molecular Biology* 21: 181-186.
- Chen, H., M. Rangasamy, S. Y. Tan, H. Wang, B. D. Siegfried. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS One* 5: e11963.
- Chiappero, M. B., C. Parise, D. A. Martin, C. J. Bidau, C. N. Gardenal. 2004. Distribution of genetic variability in populations of two chromosomal races of *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae) and their hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 76-82.
- Frankham, R. 2002. Introduction to conservation genetics, Cambridge University Press. United Kingdom.
- García, E. R. 2006. An annotated checklist of some orthopteroid insects of Mapimi Biosphere Reserve (Chihuahuan desert), Mexico. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 22: 131-149.
- Lagisz, M., G. Port, K. Wolff. 2010. A cost-effective, simple and high-throughput method for DNA extraction from insects. *Insect Science* 17: 465-470.
- Rodríguez-Muñoz, R., P. M. Mirol, G. Segelbacher, A. Fernández, T. Tregenza. 2006. Genetic differentiation of an endangered capercaillie (*Tetrao urogallus*) population at the Southern edge of the species range. *Conservation Genetics* 8: 659-670.
- Rodríguez-Romero, A., P. Posos Ponce, B. Peteira, M. Suris. 2011. Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN en insectos del orden Thysanoptera. *Revista de Protección Vegetal* 26: 187-190.
- Rossen, L., P. Nørskov, K. Holmstrøm, O. F. Rasmussen. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* 17: 37-45.
- Sambrook, J. J., D. D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Shahjahan, R., K. Hughes, R. Leopold, J. Devault. 1995. Lower incubation temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *Biotechniques* 19: 332.
- Štys, P., I. Kerzhner. 1975. The rank and nomenclature of higher taxa in recent Heteroptera. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 72: 65-79.
- Sword, G., A. Joern, L. Senior. 2005. Host plant-associated genetic differentiation in the snakeweed grasshopper, *Hesperotettix viridis* (Orthoptera: Acrididae). *Molecular Ecology* 14: 2197-2205.
- Toro, M. A., A. Caballero. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 360: 1367-78.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van De Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

