



Comparación del ADN extraído de carne de pollo fresca y enlatada utilizando un protocolo modificado con cloruro de sodio

Leslie Alers, Axel Dorta, Yenilyz López, Pamela Reyes, Naiomy Ríos, Yolimar Robles, Tiara Rodríguez, Sheila Soto, Kiara Torrado, Misael Velázquez y Marilisa Amador



Resumen/Abstract

El uso de marcadores moleculares es grandemente utilizado hoy día, sin embargo esta herramienta depende de contar con una muestra adecuada de ADN. A pesar de que los protocolos de extracción con fenol-cloroformo son muy utilizados para extraer ADN genómico, la extracción con cloruro de sodio es una alternativa simple, fácil y no contaminante. Este estudio ensayó la metodología de extracción de ADN con NaCl con algunas modificaciones al método previamente informado por Lopera-Barrero y colaboradores (2008) y la utilizó para comparar el ADN extraído de carne de pollo fresca y enlatada. Los resultados obtenidos revelaron que la calidad, cantidad e integridad del ADN extraído de muestras de carne de pollo fresco es superior al ADN extraído de muestras de carne de pollo enlatado, esto debido quizás al tratamiento físico y químico que recibe esta carne en su procesamiento.

Introducción

Los marcadores moleculares son la principal herramienta utilizada hoy en día para la identificación de genotipos, el análisis de la diversidad genética, la selección asistida y el aislamiento y caracterización de genes específicos para usar en mejoramiento genético por transgenia. Sin embargo, esta herramienta depende de contar con una cantidad y calidad suficiente de ADN extraído de pequeñas muestras de tejido.

Los protocolos de extracción con fenol-cloroformo han sido métodos muy utilizados para obtener ADN genómico por sus buenos resultados. Sin embargo, es un método lento, laborioso y contaminante (1). La extracción de ADN usando el protocolo con sal común (NaCl) es una alternativa simple, fácil, rápida y no contaminante.

El propósito de este estudio fue ensayar la metodología de extracción de ADN con NaCl con algunas modificaciones al método previamente informado por Lopera-Barrero y colaboradores (2008) y utilizarlo para comparar el ADN extraído a partir de muestras de carne de pollo fresca y enlatada en términos de la cantidad y calidad del material genómico obtenido.

Materiales y Metodos

Muestras biológicas

Para el ensayo de las modificaciones al protocolo de extracción previamente informado por Lopera-Barrero y colaboradores (2008), se utilizaron 20 mg de tejido proveniente de gongolies. El método optimizado se utilizó para extraer ADN de muestras de carne de pollo fresco y pollo enlatado.

Aislamiento de ADN

Este procedimiento es una modificación del previamente informado por Lopera-Barrero y colaboradores (2008). Se trabajaron las muestras en triplicado, cada una con 20 mg de carne de pechuga de pollo fresca y de pechuga de pollo enlatada, respectivamente. El tejido se colocó en microtubos con 550 µl de solución amortiguadora de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% SDS y 50 mM de NaCl). Se agregó a cada microtubo 7 µl de proteinasa K (200 µg/ml). Se incubó a 55°C toda la noche. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se transfirieron 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio. Se agregó 300µl de NaCl 5M, se mezcló bien y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se transfirieron 600 µl del sobrenadante a un tubo limpio y se le añadió el doble del volumen de etanol absoluto. Se mezcló bien y se colocó a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se descartó todo el sobrenadante. El pellet de ADN se guardó con 750µl de etanol al 70% hasta resuspenderse en 50 µl de solución amortiguadora TE (10mTris pH 8.0 y 1mM EDTA). El ADN obtenido se guardó a -20°C.

Cuantificación de ADN

La cantidad y calidad del ADN obtenido se determinó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm.

Integridad del ADN

La integridad del ADN se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1X. Se cargó 1 µg de ADN de cada muestra. La electroforesis se realizó a 115 V. Posteriormente se trató la gel con una solución de bromuro de etidio (0.1%) durante 15 minutos.

Resultados

# Muestra	NaCl 5M añadido a la muestra lizada antes de centrifugar	NaCl 5M añadido al sobrenadante después de centrifugar la muestra lizada	Mismo volumen de muestra que de isopropanol para precipitar el ADN	Doble volumen de etanol que de muestra para precipitar el ADN	A 260/280	[DNA] µg/ml
1		✓	✓		1.67	13.0
2	✓			✓	0.49	27.8
3	✓			✓	1.56	22.1
4		✓	✓		1.57	6.7
5		✓		✓	1.39	9.0
6		✓		✓	1.82	7.6
7		✓	✓		0.78	2.2
8		✓		✓	No hubo lectura	
9		✓		✓	1.73	7.7
10	✓			✓	0.72	17.2
11		✓		✓	No hubo lectura	145.9
12	✓			✓	1.64	27.3
13	✓		✓		1.20	23.4
14	✓			✓	0.6	39.2

Tabla 1 Lectura de pureza y concentración de muestras de ADN genómico de tejido animal ensayando varias modificaciones al protocolo

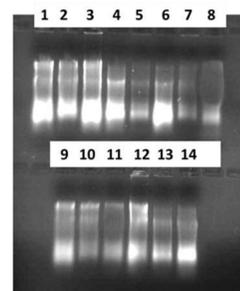


Foto 1 Electroforesis del ADN obtenido a partir de tejido animal ensayando varias modificaciones al protocolo. La identificación de las muestras corresponden a las de la Tabla 1.

Muestra	Abs260/Abs280	µg ADN/ml
E1	1.69	132.7
E2	1.58	162.1
E3	1.76	179.4
F1	1.90	664.6
F2	1.80	937.4
F3	1.94	511.9

Tabla 2 Lectura de la pureza y concentración de ADN genómico extraído a partir de carne de pollo fresca (F) y enlatada (E)

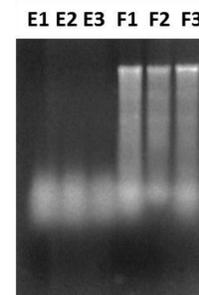


Foto 2 Electroforesis del ADN obtenido a partir de carne de pollo enlatada (E) y carne de pollo fresca (F)

Discusion de Resultados

Las modificaciones al protocolo de extracción de ADN previamente informado por Lopera-Barrero y colaboradores (2008), consistieron en añadir el NaCl 5M al sobrenadante, después en lugar de antes de centrifugar el tejido lizado; y en utilizar el doble en lugar de la mitad, de volumen de etanol absoluto que de muestra para precipitar el ADN. Según se observa en la Figura 1, todas las muestras ensayadas, excepto la #7 y #8, muestran un ADN íntegro, independiente de si el protocolo utilizado para su extracción era el original o el modificado. Sin embargo, en la Tabla 1 podemos ver que las muestras de ADN más puras, con un A260/280 más cerca de 2.0 son las #6 y #9, ambas obtenidas con las modificaciones al protocolo original.

El protocolo modificado se utilizó para comparar el ADN extraído a partir de muestras de carne de pollo fresca y enlatada en términos de la cantidad y calidad del material genómico obtenido. Los resultados obtenidos muestran que la calidad y cantidad del ADN extraído a partir de carne de pollo enlatado es menor que la del ADN extraído de carne de pollo fresca. Ver Tabla 2. En cuanto a la integridad del ADN, en la foto 2 (carriles E1, E2 y E3), se observa claramente un ADN degradado, de pequeño tamaño.

Considerando que se partió de la misma cantidad de tejido, tanto fresco como enlatado, y que se utilizó el mismo protocolo de extracción, los resultados obtenidos podrían explicarse por cambios en el ADN debido a los tratamientos realizados a la materia prima, tales como calentamiento y/o adición de diversas sustancias. Resultados similares fueron reportados por Aguilar y colaboradores (2011), ésto en muestras de atún.

Conclusiones

Las modificaciones ensayadas al al protocolo de extracción de ADN previamente informado por Lopera-Barrero y colaboradores (2008), mostraron ser más efectivas en la extracción de ADN genómico a partir de tejido animal.

La calidad, cantidad e integridad del ADN extraído de muestras de carne de pollo fresco es superior al ADN extraído de muestras de carne de pollo enlatado, esto debido quizás al tratamiento físico y químico que recibe esta carne en su procesamiento.

Bibliografía

- Aguilar, Amarys, Alonso, G y Barrero, M. (2011). Estandarización del método de extracción de ácidos nucleicos en muestras comerciales enlatadas de atún *Thunnus* sp. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 2 (1): 061-072.
- Falcon, L. y Valera, A. (2007) Extracción de ácidos nucleicos (Cap. 16). En *Las herramientas moleculares*.(pp 499-516). Mexico, D.F., Mexico.
- Lopera-Barrero, N., Povh, J, Ribeiro, R., Gomes, P., Jacometo, c. y da Silva, T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. Ciencia e Investigación Agraria 35 (1): 77-86.