

Extracción de ADN de semen bovino congelado

Extraction of DNA from frozen bovine semen

Benigno Ruiz Sesma¹
Reyna Isabel Rojas Martínez²
Paula Mendoza Nazar¹

RESUMEN

El semen congelado viene diluido con Tris, ácido cítrico, fructosa, glicerol, leche descremada en polvo y yema de huevo. Para extraer el ADN del semen es necesario eliminar el ADN exógeno, esto no se logra con las técnicas normales de extracción con semen fresco, por lo que es necesario recurrir a las técnicas forenses. El objetivo del presente estudio fue evaluar tres protocolos para la extracción de ADN de semen bovino congelado. El estudio se realizó en el laboratorio de fitopatología vegetal del Colegio de Postgraduados. Se utilizaron pajillas de ½ mL y ¼ mL. Las variables evaluadas fueron: Tiempo de ejecución del protocolo (T), pureza del ADN y concentración de ADN. Las técnicas evaluadas fueron: Tratamiento 1: Yoshida *et al.* (1995). Tratamiento 2: Penacino (1997). Tratamiento 3: Técnica rápida de Penacino (1997). El menor tiempo para ejecución del protocolo fue para el tratamiento tres con 100 minutos. En los carriles 1 al 4 y 7 al 10, se observa la presencia de proteína. Cuando se utilizaron una o dos pajillas de ¼ mL se observó poca proteína y mejor calidad del ADN. En carriles del uno al 10, los valores de la relación A260/A280 son inferiores 0.1. Los carriles 12 y 17 presentan valores cercanos al rango de pureza. Se concluye que para la extracción de ADN de semen bovino congelado se debe utilizar una pajilla de ¼ mL por muestra con la técnica Penacino (1997), y dos pajillas de ¼ mL por muestra para la técnica rápida Penacino (1997).

Palabras clave: semen, toros, criopreservado, extracción, ADN.

ABSTRACT

Frozen semen comes diluted with tris, citric acid, fructose, glicerol, skimmed milk powder and egg yolk. In order to extract the DNA from semen it is necessary to eliminate exogenous DNA. This is not achieved with the normal technique of extraction with fresh semen; it is necessary to resort to the forensic techniques. The objective of the present study was to evaluate three protocols for DNA extraction of frozen bovine semen. The study was carried out in the laboratory of vegetable fitopatology of Colegio de Postgraduados. Straws of ½ mL and ¼ mL were used. The variables considered were the following: time of execution of the protocol (T), purity of the DNA and DNA concentration. The techniques evaluated were the following: Treatment 1: Yoshida *et al.* (1995). Treatment 2: Penacino (1997). Treatment 3: Penacino (1997)'s rapid Technique. The shortest time of protocol execution was the one for the treatment 3 with a time of 100 minutes. In rails 1 to 4 and 7 to 10, the presence of protein was observed. When one or two ¼ mL straws were used, a lower amount of protein and better DNA quality were found. In rails 1 to 10, the values of the A260/A280 relationship are low 0.1. Rails 12 and 17 show values near the range of purity. It is concluded that for DNA extraction from frozen bovine semen, one ¼ mL straw per sample must be used with the Penacino technique (1997), and two ¼ mL straws per sample for the rapid Penacino technique (1997).

Key words: Semen, bulls, cryopreserved, extraction, DNA.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de mejoramiento genético animal están basados en la selección de individuos con características superiores, utilizándolos como reproductores con el fin de diseminar los genes de características productivas deseadas dentro de una población. La implementación de técnicas de identificación individual de los miembros de cada hato es imprescindible para establecer la referencia genealógica que determinara un me-

joramiento animal confiable. Las técnicas más comunes de identificación consisten en descripciones de fenotipo que incluyen la presencia de remolinos de pelo, manchas y color del pelaje, así como el empleo de tatuajes y marcas (Rojas *et al.*, 2006). A partir de la inseminación artificial y la transferencia de embriones se logró mayor precisión en las pruebas de progenie; sin embargo, se requería de registros genealógicos confiables, es decir, para el establecimiento de la genealogía en el ganado de registro, es de gran

¹ Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas. Km 8 Carretera al ejido Emiliano Zapata, Delegación Terán, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. C.P. 29020. Correo-e: brsesma@prodigy.net.mx

² Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera Mexico-Texcoco, Montecillo, Edo. de México. C.P. 56230.

importancia considerar un alto nivel de seguridad en la asignación exacta del parentesco, ya que al ocurrir errores en el pedigrí de animales registrados se puede afectar desfavorablemente la composición genética de la población, debido a que este tipo de animales son generalmente utilizados en el mejoramiento genético del hato (Riojas *et al.*, 2006).

En genética animal, el análisis del ADN se ha perfeccionado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), al considerar secuencias repetitivas cortas llamadas microsatélites o repeticiones cortas en tándem (STR), las cuales se encuentran en todo el genoma y presentan un gran polimorfismo por tamaño en pares de bases, dando con ello mayor utilidad en análisis genéticos, lo que permite disminuir considerablemente la probabilidad de error en la identificación de individuos (Georges *et al.*, 1991; Riojas *et al.*, 2006).

Considerando el alto grado de exactitud y el corto tiempo en la obtención de resultados, esta técnica se podría utilizar en el esclarecimiento de paternidad en animales de alto valor económico y zootécnico, además de tener aplicaciones de tipo productivo y de investigación (Ellis, 1986; Williams *et al.*, 1997; Riojas *et al.*, 2006). Por otro lado, es bien sabido que el semen bovino congelado en pajillas es el más utilizado para la diseminación de genes de reproductores con un mérito genético superior en los sistemas de producción, y considerando que la mayoría de estos toros carecen de estudio que identifique a sus padres o descendencia y además de los genes de importancia económica como el gen leptina, caseína, etcétera, que heredan a su descendencia; en este sentido, es necesario y urgente la aplicación de este tipo de estudios a los individuos que están diseminando sus genes en los sistemas de producción, para lograr lo antes mencionado es necesaria la extracción del ADN de cada individuo a identificar, sin embargo, muchas veces no se tiene acceso a los toros ya sea porque están en otro sitio o ya pecieron, y la única fuente para la obtención del ADN es el semen congelado. Éste generalmente, viene diluido con Tris, ácido cítrico, fructosa, glicerol, leche descremada en polvo y yema de huevo (Olivares & Urdaneta, 1985; Boeta & Zarco, 2000; Hernández *et al.*, 2003; Medina-Robles *et al.*, 2007), esto ocasiona que en la pajilla de semen se encuentre ADN exógeno y el ADN del espermatozoide de toros, por lo que es necesari-

rio eliminar el ADN exógeno antes de extraer el ADN del espermatozoide. El problema del ADN exógeno en las muestras del ADN del semen congelado se torna serio ya que comparten ADN de la misma especie y ambos podrían responder a los marcadores genéticos generando falsos positivos para el individuo estudiado. Para la eliminación del ADN exógeno, es necesario recurrir a las técnicas forenses, en este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar tres protocolos para la extracción de ADN de semen bovino congelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de los tres protocolos de extracción y purificación de ADN a partir de pajillas de semen bovino criopreservado se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular del Colegio de Postgraduados, Campus-Montecillo. Se utilizaron pajillas de semen bovino criopreservado de 0.5 mL y 0.25 mL. En el estudio se consideraron las variables: Tiempo de ejecución del protocolo (minutos), cantidad de muestra a utilizar 0.25 mL, 0.50 mL y 1.0 mL, y presencia de ADN en gel de agarosa. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: Tratamiento 1: Técnica descrita por Yoshida *et al.* (1995). Tratamiento 2: Técnica descrita por Penacino (1997). Tratamiento 3: Técnica rápida descrita por Penacino (1997). Para la cuantificación del ADN se utilizó el método de absorción de luz ultravioleta: Se efectuó a partir de diluciones 1/200 a 1/500 en agua destilada, para determinar la absorción de luz UV a las longitudes de onda 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro. Las relaciones 260/280 y 260/230 permitieron detectar la presencia de posibles contaminantes en las muestras. Se calcula el contenido de ADN asumiendo que una unidad de absorbencia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN doble cadena. Por otro lado, se procedió a verificar la calidad de la extracción del ADN de las muestras, en gel de agarosa al 0.8% (0.24 g de agarosa y 30 ml de buffer TBE 1X (Tris Borato-EDTA)), por medio de una electroforesis, utilizando una cámara modelo horizon 58 (Life Technologies®). En cada pozo se depositó un volumen final de 5 µl (2 µl de colorante Naranja G y 3 µl de ADN), usando como buffer de corrida TBE. Las condiciones de la electroforesis fueron de 40 minutos a 86 voltios. Transcurrido dicho tiempo los geles se tiñeron con bromuro

de etidio a una concentración final de (1 µg/ml) durante 30 minutos. Los resultados fueron evaluados en el fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000, Marca Bio Rad) de luz ultravioleta (UV) y se capturaron las imágenes por computadora en el programa Quantivone, para la evaluación de la calidad y cantidad del ADN. A las variables evaluadas se les realizó un análisis descriptivo (Steel, Torrie & Dickey, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tiempo de ejecución para tratamiento dos fue 940 min, seguido del tratamiento uno y tres con 825 y 100 min, respectivamente. En la figura uno se aprecia la calidad del ADN extraído. En los carriles 5, 11 y 17 se utilizaron 0.5 mL, en los carriles 6, 12 y 18 se utilizó 0.25 mL, en el resto de los carriles se utilizaron 1.0 mL. En los carriles donde se utilizaron 0.25 y 0.5 mL se observa buena calidad del ADN. Del Valle, Rodríguez y Espinoza (2004) mencionan que la diferencia en la cantidad y calidad de ADN observada en algunas extracciones podría deberse a la presencia de ARN. El tratamiento tres en los carriles 13, 14, 15 y 16 no se observó ADN, esto posiblemente debido a la cantidad de muestra utilizada, y al poco tiempo empleado para que se llevara a cabo la lisis celular ya que este protocolo únicamente considera 20 minutos en incubación a 60°C. Becton, Dickinson & Company (2008), y Durviz, (2008) mencionan que la baja o nula cantidad de ADN o lisis celular incompleta obtenida de algún protocolo, en algunas ocasiones se debe al exceso de muestra utilizado, por lo que es recomendable utilizar menor cantidad o prolongar el tiempo de incubación en el paso

correspondiente a la lisis. Las bandas de ADN observadas en los carriles 5, 11, 17 y 6, 12, 18, indican una desproteización aceptable, esto debido a la mejor relación solución de lisis y cantidad de muestra utilizada. Cattaneo *et al.* (1997), y Buttler, (2001) mencionan que una técnica que permite extraer el ADN de un medio que contenga contaminantes es mucho más prometedora que un método que busque extraer los contaminantes de la preparación. El extraer el ADN con un protocolo o método adecuado minimiza los problemas de contaminación puesto que no se requiere extraer todo el ADN allí presente sino obtenerlo en una cantidad y calidad suficiente, sobre todo cuando éste va a ser utilizado para pruebas moleculares. La remoción de los contaminantes del extracto es usualmente una tarea difícil que con frecuencia lleva a la inhibición de las reacciones o errores en la amplificación (Buttler, 2001). Tratándose de métodos fenólicos de desproteización, la no remoción adecuada de proteínas en los extractos para la obtención de ADN es un indicador de deficiencia en el procedimiento (Maniatis, 1982).

CONCLUSIONES

Con base en estos resultados se concluye que: el tratamiento tres utiliza menos tiempo para su ejecución, por lo que puede emplearse en la extracción del ADN de semen congelado de bovinos. La cantidad de muestra a utilizar debe ser de 0.25 a 0.5 mL del contenido de la pajilla, es decir una o dos pajillas de semen congelado de ¼ mL. No se recomienda utilizar dos o más pajillas de ½ mL por muestra con ningún protocolo de los aquí evaluados.

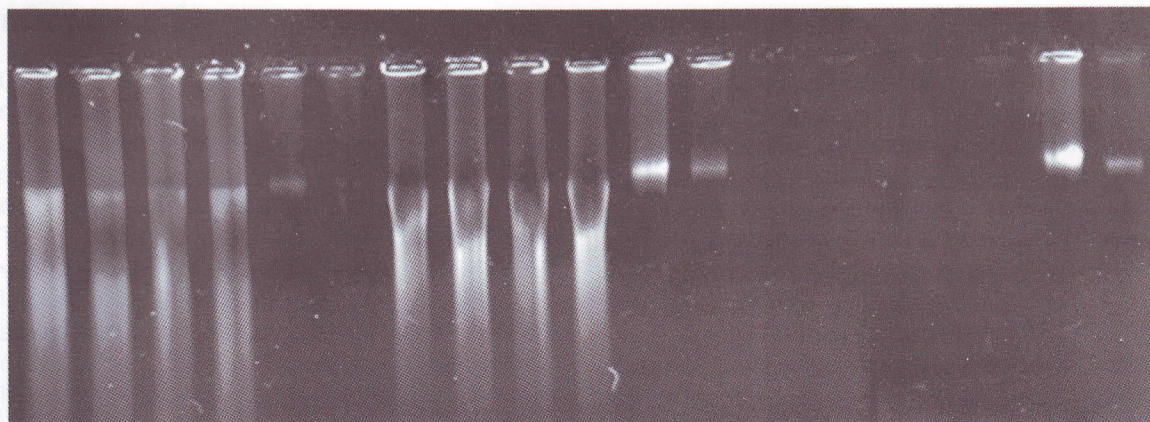


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) del ADN extraído con los diferentes protocolos. Carriles 1 al 6, tratamiento uno, 7 al 12, tratamiento dos y 13 al 18, tratamiento tres.

REFERENCIAS

- Becton, Dickinson, & Company. (2008). *Kit S QuickGene de extracción de ADN en Tejidos (DT-S). Para aislamiento de ADN genómico de muestras en tejidos. Manual.* Fuji Photo Film Co., Ltd. Life science products division. Nishiazabu 2-Chome, Minato-ku, TOKYO. JAPAN. 18 p.
- Boeta, M., & L. Zarco, (2000). Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas, *Veterinaria México*. Nota de investigación. No. 001.
- Buttler, J.M. (2001). *Forensic DNA Typing. Biology & Technology behind STR Markers.* San Diego: Academic Press.
- Cattaneo, C., O. Craig, N.R. James, & Sokol, (1997). Comparison of Three DNA Extraction Methods on Bone and Blood Stains up to 43 years old and Amplification of Three Different Gene Frequencies. *J. Forensic Sci.* 42: 1126-1135.
- De Jesús, R., N. Moreno, & J.A. Martínez, (2005). 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). *RC*, vol. 15, no.2, p.134-140. ISSN 0798-2259.
- Del Valle, C., A. Rodríguez, & M. Espinoza, (2004). Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. Complejo de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, Heredia, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (3): 717-725.
- Durviz, S.L. (2008). *Kit extracción DNA SSS. REA1. RBME01/RBME02.* 5 pp.
- Ellis, T.H.N. 1986. Restriction fragment length polymorphism markers in relation to quantitative characters. *Theor. Appl. Genet.* 72:1-2.
- Georges, M., A. Gunawardana, D.W. Threadgill, M. Lathrop, I. Olsaker, A. Mishra, L.L.S. Sargeant, A. Schoeberlein, M.R. Steele, C. Terry, D. S. Threadgill, Zhao, X., T. Holm, R. Fries, y J. E. Womack, 1991. Characterization of a set of variable number of tandem repeat markers conserved in Bovidae. *Genomics*, 11: 24-32.
- Hernández, P.J.E., R.F. Fernández, R.Y. Gutiérrez, I.A. Córdova, & N.E. Gómez, (2003). Adición de ácido ascórbico en el diluyente para congelar semen de bovino y su efecto en la motilidad y viabilidad de semen posdescongelado. *Rev. Salud Anim.* Vol. 25 No. 1. pp. 39-44.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, & J. Sambrook, (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Lab, New York, 468 p.
- Medina-Robles, V.M., E. Sánchez-Carvajal, Y.M. Velasco-Santamaria, & P.E. Cruz-Casallas, (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA) *Revista ORINOQUIA* -Universidad de los Llanos- Villavicencio, Meta. Colombia. Volumen 11(1) 75-86.
- Miesfeld, R. (1999). *Applied Molecular Genetics.* John Wiley, New York, USA. 293 p.
- Olivares, R., & R. Urdaneta, (1985). *Colección, evolución y procesamiento del semen de toros;* FONAIAP DIVULGA No. 17.
- Penacino, G.A. (1997). *Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular, con especial referencia a los estudios post-mortem.* Tesis doctoral. Unidad de Análisis de ADN, Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos, Buenos Aires, Argentina.
- Riojas, VVM., FJC. Gómez, MJA. Salinas, LR. Montes de Oca, GA. Wong, 2006. Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos brahmán y brangus en México. *Ciencia UANL*, Vol. IX, Número 1. pp. 41-50.
- Schultz, D.J., R. Craig, D.L. Cox-Foster, R.O. Mumma, & J.I. Medford, (1994). RNA isolation from recalcitrant plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 310-316.
- Steel, R.G.D., J.H. Torrie, & D.A. Dickey, (1997) *Principles and Procedures of Statistics*, 3rd. ed. McGraw-Hill.
- Williams, J.L.; A. P. Usha, B.G.D. Urquhart, y M. Kilroy, 1997. Verification of the identity of bovine semen using DNA microsatellite markers. *The Veterinary Record.* 140:446-449.
- Yoshida, K., K. Sekiguchi, N. Mizuno, K. Kasai, I. Sakai, H. Sato, & S. Seta, (1995). The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Science International. National Research Institute of Police Science. Chiyoda-ku, Tokyo. Japan (72):*25-33.