

## Evaluación de distintos métodos de extracción de ADN en equinos como etapa inicial para la identificación del gen dominante Tobiano.

Daniela Estévez <sup>1-2</sup>, Juan Arioni <sup>1</sup>, Enrique Género <sup>1-2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. <sup>2</sup> IIPAAS, Instituto de investigación sobre Producción Agropecuaria, Ambiente y Salud.

### Introducción

Tobiano es un patrón de manchas blancas en los caballos causado por un gen dominante, Tobiano (TO). TO se asocia con una gran inversión cromosómica paracéntrica en el cromosoma de caballo 3 ECA3 (Gen de la enzima convertidora de Angiotensina). La inversión no interrumpe ningún gen identificado, sino que comienza aproximadamente a 100 kb aguas abajo del gen KIT. Esta inversión puede interrumpir las secuencias reguladoras para el gen KIT y causar el patrón de manchas blancas (Brooks *et al.*, 2007) (Figura 1).

Los caballos homocigotos para la inversión son normales y saludables, lo que sugiere que este reordenamiento cromosómico no está asociado con efectos nocivos para la salud. Los individuos heterocigotos pueden tener una fertilidad reducida debido a la producción de gametos genéticamente desequilibrados (Madan, 1995). En un estado heterocigoto, un solo evento de recombinación dentro de la inversión da como resultado un gameto no viable; dos eventos de recombinación simultáneos dentro de la inversión mantendrán la estructura cromosómica normal. (Brooks *et al.*, 2007). Se identificaron las secuencias de ADN que flanquean la inversión y se desarrolló una prueba de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para detectarla.



**Figura 1.** (A) Caballo con patrón tobiano, la imagen muestra la típica línea blanca en el lomo y los parches blancos en las extremidades. (B) Caballo criollo sin patrón de coloración tobiano, no posee la característica línea blanca en el lomo.

## Materiales y Métodos

### Obtención de las muestras:

Se analizaron hasta el momento 3 ejemplares de los cuales se extrajo entre 5 y 10 ml de sangre venosa, con jeringa previamente tratada con EDTA y estéril (Moncaleano *et al.*, 2007). El pelaje del animal fue limpiado apropiadamente con alcohol para evitar el arrastre de contaminación por parte de la aguja.

Métodos de extracción evaluados:

#### A) Extracción de ADN con Kit comercial DNA Purification Kit de Promega®

1. En un tubo de microcentrífuga estéril, a 300 µl de la muestra (sangre entera) se le agregó 900 µl de solución de lisis celular.
2. Se agitó suavemente el tubo que contenía la sangre junto con la solución de lisis (*Cell Lysis Solution*) para permitir que se integre la sangre con el buffer de Lisis.
- 3 Se lo dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente realizando inversiones del tubo de manera constante.
4. A continuación se realizó un centrifugado rápido utilizando una minicentrífuga (*"Spin"*).
5. Se descartó el sobrenadante, se agitó vigorosamente en un vortex (*"vortexeo"*) durante 20 segundos.
6. Se le agregó a cada tubo 300 µl de la Solución *"Lisis de Núcleo"* (*NucleiLysisSolution*) y se resuspendió de 5 a 6 veces para lisar las células blancas de la sangre.
7. Luego se realizó una incubación a 37°C durante 1 hora con agitación de los tubos cada diez minutos.
8. Se agregó 1,5 µl de la solución de RNasa (20 mg/ml) al lisado nuclear, y se mezcló la muestra invirtiendo suavemente de 2 a 5 veces el tubo.
9. Se incubó a 37°C a baño María durante 15 minutos y luego se la dejó enfriar a temperatura ambiente.
10. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se le agregó 100 µl de la solución de *"Precipitación de Proteínas"* (*Protein Precipitation*) al lisado nuclear.
11. Se *"vortexeo"* de 10 a 20 segundos.

12. Se realizó una centrifugación a 16.000 RPM durante 6 minutos a temperatura ambiente (se observó un pellet de color marrón que contiene a la parte proteica de la muestra)
13. Se extrajo el sobrenadante y se lo colocó en tubos de 1,5 ml estériles, los cuales contenían previamente 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
14. Se mezcló suavemente, se realizó un “spin” de 1 minuto y luego se descartó el isopropanol dejando el ADN precipitado (pellet) en el fondo del tubo.
15. Posteriormente se agregó etanol 70% para limpiar el ADN.
16. Se realizó “spin” durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
17. Se dejó secar las muestras durante 15 minutos para eliminar por completo el alcohol y se las resuspendió en 50 µl de TE 1X, se lo incubó durante 1 hora a 65°C.
18. Por último, se lo almacenó en freezer a -20°C para su posterior uso.

#### **B) Extracción de ADN con Kit comercial Quick DNA Miniprep Plus Kit de Zymo®**

1. Se agregó 200 µl de la muestra sanguínea a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y luego 200 µl de BioFluid & Cell Buffer (Rojo) y 20 µl de Proteinasa K.
2. Se mezcló bien y luego se incubó el tubo a 55°C durante 10 minutos.
3. Finalizada la incubación, se agregó 1 volumen de Genomic Binding Buffer a la muestra digerida y se mezcló bien.
4. Se transfirió la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IIC-XLR en un tubo de recolección y se centrifugó ( $\geq 12.000$  RPM?) durante 1 minuto. Finalizada la centrifugación, se desechó el contenido del tubo colector.
5. Se agregaron 400 µl de DNA Pre-Wash Buffer a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 12.000 RPM. Finalizada la centrifugación, se desechó el contenido del tubo colector.
6. Luego se agregaron 700 µl de g-DNA Wash Buffer y se centrifugó durante 1 minuto a 12.000 RPM. Finalizada la centrifugación, se desechó el contenido del tubo colector.
7. Nuevamente se agregaron 200 µl de g-DNA Wash Buffer y se centrifugó durante 1 minuto a 12.000 RPM. Finalizada la centrifugación, se desechó el contenido del tubo colector.

8. Para eluir el ADN, se transfirió la columna a un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml y se le agregó 50 µl DNA Elution Buffer, se lo dejó incubar durante 5 minutos y luego se lo centrifugó durante 1 minuto a 12.000 RPM.

9. Por último, se lo almacenó en freezer a -20°C para su posterior uso.

### **C) Extracción de ADN con método Fenol-Cloroformo.**

1. Se centrifugó cada muestra a 10.000 RPM durante 10 minutos para lograr una buena separación de los componentes sanguíneos. Luego se tomaron 15 µl de sangre de la fase blanca, con el fin de obtener las células nucleadas (linfocitos). A cada tubo se le incorporó 12,5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y se llevó a incubación en baño térmico durante 3 horas a 56°C.

2. Una vez transcurrido este periodo, se centrifugó a 12.000 RPM durante 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se descartó el tubo anterior.

3. Se añadió igual volumen de Fenol-Cloroformo-alcohol Isoamílico (25:24:1) y se lo mezcló por inversión de forma cuidadosa de 3 a 5 veces.

4. Se centrifugó a 12000 RPM durante 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, evitando tomar la interface, y se descartó el tubo anterior.

5. Para una mejor extracción, se añadió a éste igual volumen de Fenol-Cloroformo-alcohol Isoamílico (24:24:1), y se lo mezcló por inversión de forma cuidadosa de 3 a 5 veces.

6. Luego se centrifugó a 12000 RPM durante 5 minutos y se tomó nuevamente el sobrenadante transfiriéndolo a un tubo nuevo.

7. Posteriormente, se adiciono ½ volumen de Acetato de Amonio 7,5 M y 2 volúmenes de etanol al 100% frío. Para mejorar la eficiencia del precipitado, se lo enfrió a -20°C durante 10 minutos.

8. Para finalizar, se lavó el ADN con 1 ml de etanol al 70% frío y se lo agitó por inversión. Se realizó una centrifugación a 12.000 RPM durante 5 minutos.

9. Se descartó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente.

10. Para conservarlo, se resuspendió la muestra en 100 µl de TE y se lo conservó en freezer a -20°C hasta su uso.

### **Corrida electroforética en geles de agarosa**

Para visualizar la presencia/ausencia y calidad de las extracciones de ADN, los productos obtenidos fueron sometidos a electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa al

0,8%, en Buffer TAE (Tris, Acetato, EDTA). Por cada muestra de ADN se formó un mix constituido por 1 µl de ADN, 2 µl de Gel Red (tiñe al ácido nucleico para su posterior visualización), 2 µl de Loading Buffer (buffer de corrida).

Una vez finalizada la electroforesis, los productos fueron visualizados en un transiluminador con el software Gel Capture.

### Cuantificación del ADN

Para la cuantificación del material extraído se utilizó el Fluorómetro Qubit 2.0 de Invitrogen. El mismo posee 4 soluciones diferentes utilizadas para cuantificar ADN. Solución A, llamada Qubit Be Reange, Solución B, que es un Buffer y dos soluciones conocidas como S1 y S2, las cuales indican los extremos de la curva de concentración que se indica en la pantalla del equipo.

Para la preparación de las muestras a cuantificar, se realizó la mezcla de la solución A con la solución B, en las siguientes cantidades: 1 µl de la solución A más 199 µl de solución B por cada muestra, obteniéndose un volumen final de 200 µl de solución AB. Por otra parte se prepararon 200 µl de la solución AB para S1 y otros 200 µl para S2.

Para medir la concentración se realizó lo siguiente:

En un tubo de 0,5ml se colocó 10 µl de solución S1 con 190 µl de la solución AB y se procedió a medir su concentración.

Luego se colocó en un tubo de 0,5ml, 10 µl de solución S2 con 190 µl de la solución AB y se midió su concentración.

Una vez realizado esto, se colocó en un tubo de 0,5ml 2 µl de la muestra de ADN y 198 µl de la solución AB y se midió su concentración.

Este paso se repitió con cada muestra.

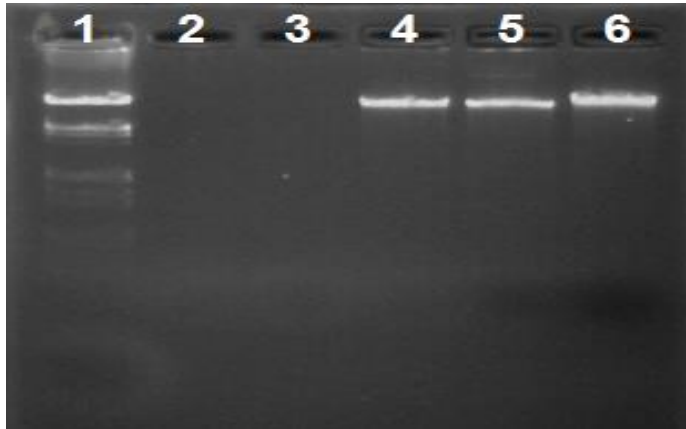
Las concentraciones ideales de ADN extraído para realizar la amplificación por PCR oscilan entre 50 y 100 ng/ml

### Resultados

Las extracciones realizadas con **DNA Purification Kit de Promega** no dieron resultados positivos, no se obtuvo ADN en ninguna de las muestras analizadas (Figura 2). Los motivos no están del todo claros, ya que este kit se utilizó para extracción de ADN a partir de sangre en bovinos y los resultados fueron satisfactorios; el ADN era de buena calidad y de alta concentración.

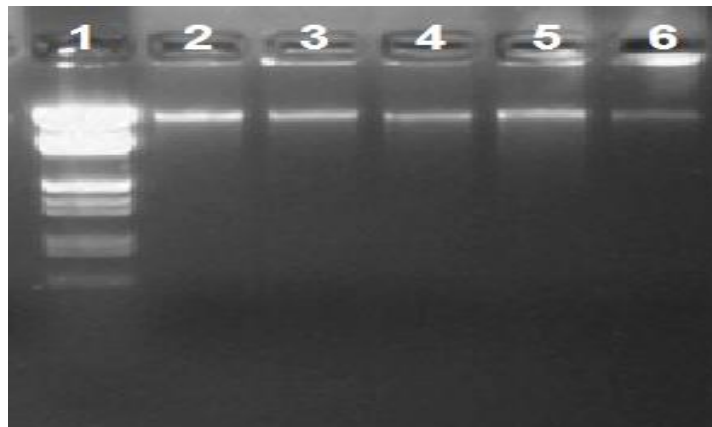
Se realizaron 4 repeticiones en la extracción de ADN de las muestras y, al no obtener resultado alguno, se descartó este método.

En lo que respecta a la extracción de ADN con el kit **Quick DNA Miniprep Plus Kit de Zimo®**, los resultados fueron positivos, se obtuvo concentración adecuada de ADN, limpio y de manera muy rápida (Figura 3). Además, requiere poco material para realizar la extracción.



**Figura 2.** Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8%. Calle 1: Marcador de peso molecular EcoRI. Calles 2 y 3: Extracción de ADN con **DNA Purification Kit de Promega**. Calles 4, 5 y 6: Extracción de ADN con **Quick DNA Miniprep Plus Kit de Zimo®**.

En relación al método de **extracción de ADN con Fenol- Cloroformo**, los resultados fueron positivos, se obtuvo ADN de buena calidad, en una alta concentración (Figura 3), pero a diferencia del método del kit **Quick DNA Miniprep Plus Kit de Zimo®**, éste es mucho más laborioso y requiere más tiempo. Además, al utilizar solo la fracción blanca, el rendimiento de cada extracción de sangre realizada al animal resulta bajo.



**Figura 3.** Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8%. Calle 1: Marcador de peso molecular EcoRI. Calles 2-6: Extracción de ADN con **método Fenol-Cloroformo**

## Consideraciones finales

De los métodos utilizados, el más adecuado fue la extracción realizada con el kit Quick DNA Miniprep Plus Kit de Zymo®. Esto nos permitirá obtener material de buena calidad y adecuada concentración para determinar la presencia del alelo dominante tobiano (TO) o el alelo recesivo (to), permitiéndonos así probar su relación con la inversión en el cromosoma 3 en caballos existentes en Argentina.

Cabe destacar que el kit utilizado por la mayoría de los autores, para extracción de ADN en equinos es el DNeasy Blood & Tissue Kits de QIAGEN, pero debido a su costo se han utilizado los Kits disponibles en Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias.

La puesta a punto de esta metodología de PCR para la inversión de ECA3 será útil para los criadores interesados en encontrar un stock de reproductores homocigotos para el pelaje Tobiano, ya que son fenotípicamente indistinguibles de los animales que son portadores.

Por otro lado, las inversiones de cromosomas polimórficos de la población de equinos en Argentina que como esta son fácilmente detectables, pueden usarse para estudiar los efectos de las inversiones sobre el fenotipo, la tasa de recombinación y la evolución de los cromosomas. Además, esta inversión ilustra la importancia de las organizaciones genómicas alternativas como contribuyentes a la heterogeneidad genética (Brooks *et al.*, 2007) Las inversiones y otros reordenamientos están surgiendo como una fuente de diversidad genética que anteriormente se había pasado por alto (Lupski, 2006).

## Agradecimientos

Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley Nº 26.899, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Programa LomasCyT FCA 067. Argentina, Buenos Aires. Análisis citogenético clásico y molecular de variaciones cromosómicas asociadas a disminución de fertilidad en Tobianos (*Equus caballus*)

A los Señores Agustín Sadauskas y Fabián Gonzales por su colaboración para la toma de muestras.

## Bibliografía

Brooks SA, Lear TL, Adelson DL, Bailey E. (2007). "A chromosome inversion near the KIT gene and the Tobiano spotting pattern in horses". *Cytogenetic and Genome Research*,119(3-4): 225-230.

Madan K. (1995). "Paracentric inversions: a review". *Human Genetics*,96(5): 503-515.

Moncaleano JS, Jiménez LM, Sánchez CA. (2007). "Mosaicismo leucocitario asociado a infertilidad en cuatro yeguas". *Orinoquia*,11(1): 87-91.

Lupski JR. (2006). "Genome structural variation and sporadic disease traits". *Nature Genetics*,38(9): 974.