

Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras

Standardising a simple protocol for extracting yeast from genomic DNA

*Esteban Osorio-Cadavid¹, Mauricio Ramírez²,
William Andrés López², Luz Adriana Mambuscay²*

Resumen

Se estandarizó un protocolo rápido, sencillo y de bajo costo para la extracción de ADN genómico de levaduras a partir de lisis de la pared celular mediante tratamiento enzimático y precipitación por alcoholes. El empleo de la enzima Beta-glucuronidasa en reemplazo de la enzima Zimolasa, permitió obtener ADN en alta concentración ($124,9 \pm 30,2$ ng/ μ l) y de buena calidad (A_{260}/A_{280} nm = $1,86 \pm 0,1$), ideal para su uso en estudios de biología molecular. Además, se adicionó un paso de incubación del ADN obtenido a 100° C para inactivar ADNasas. La calidad del ADN obtenido fue evaluada por medio de la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2, presentando bandas definidas y cuantificables (entre 380 y 880 pb) ideales para estudios de identificación molecular y filogenia.

Palabras clave: levadura, extracción de ADN, Beta-Glucuronidasa.

Abstract

A quick, simple and low-cost protocol for extracting genomic DNA from yeast by cell wall lysis involving enzymatic treatment and alcoholic precipitation was standardised. Higher DNA yields (124.9 ± 30.2 ng/ μ l) were obtained by using beta-glucuronidase instead of zymolyase; these had very high quality (A_{260}/A_{280} nm = 1.86 ± 0.1) and would be suitable for use in molecular biology assays. Moreover, a DNase inactivation step was also introduced by incubation at 100° C to further ensure DNA stability. DNA quality was assayed by PCR amplification

-
- 1 Profesor Titular, Sección de Genética, Departamento de Biología, Universidad del Valle. Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos, Departamento de Biología, Universidad del Valle. esosca@univalle.edu.co
 - 2 Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos, Departamento de Biología, Universidad del Valle. mauriciogeteg@gmail.com. willi8702@gmail.com. luza607@hotmail.com





of the ITS1-5.8S-ITS2 region, revealing defined, quantifiable 380 to 880 bp bands. These results show that the protocol is ideal for molecular identification and phylogenetic studies.

Key words: Yeast, DNA extraction, beta-glucuronidase.

Recibido: febrero 28 de 2009

Aprobado: mayo 29 de 2009

Introducción

La extracción del ADN de cualquier organismo, a un bajo costo y sin mucho esfuerzo de trabajo en el laboratorio, que se obtenga con una suficiente concentración y pureza en poco tiempo, es importante para muchos investigadores interesados en el estudio o en la comprensión de la clasificación y filogenia de organismos. De manera especial, esto es relevante para aquellos investigadores dedicados a la clasificación, identificación y filogenia de las levaduras, donde está demostrado que las técnicas existentes, bioquímicas, fisiológicas, metabólicas y genéticas no alcanzan a ser suficientes para una identificación definitiva del género o de la especie (Esteve-Zarzoso et ál., 1999).

Numerosos métodos para la extracción de ADN de levaduras se han descrito (Kurtzman y Fell, 1998). Éstos se diferencian básicamente en qué procedimiento ha sido utilizado para la lisis de la pared celular de la levadura, y qué protocolo es usado para la purificación del ADN. Casi todos los métodos empleados son variaciones tanto de procedimientos de agitación con perlas de vidrio (Hoffman y Winston, 1987; Ros-Chumillas et ál., 2007) como de lisis de pared celular por tratamiento enzimático (Querol et ál., 1992).

Hoffman y Winston (1987) proponen un protocolo en el cual el rompimiento de la pared celular se produce mediante fraccionamiento mecánico con perlas de vidrio, seguido por una purificación usando una mezcla de fenol-cloroformo. Sin embargo, cuando se procesa un gran número de muestras, el uso de perlas de vidrio es insuficiente.

Querol et ál. (1992) presentan un protocolo de extracción de ADN, donde el rompimiento celular se lleva a cabo mediante lisis con la enzima Zimolasa, y la liberación del ADN no requiere el uso de fenol-cloroformo. Esta metodología ha sido ampliamente acogida ya que elimina el uso del fenol.

La enzima Beta-glucuronidasa (EC 3.2.1.31) es usada rutinariamente para la hidrólisis de glucurónidos de orina, plasma y otros fluidos, antes del análisis por inmunoensayos, espectrometría de masas, cromatografía de gases, HPLC, y otros medios. La Beta-glucuronidasa cataliza la reacción Beta-D-glucuronósido + H₂O ↔ D-glucuronato + Alcohol (Xu et ál., 2002). En levaduras, esta enzima ha sido usada para obtener protoplastos en diferentes especies y con distintos propósitos (Torres-Bauzá y Riggsby, 1980).

Este trabajo reporta el uso de la enzima Beta-glucuronidasa (Sigma-Aldrich), como una enzima alternativa para la lisis de la pared celular, la cual permite una rápida obtención de ADN, en buena concentración y de alta calidad, permitiendo una disminución de tiempo y costos.

Materiales y métodos

Levaduras empleadas en el estudio

Para este estudio se usaron levaduras aisladas a partir de diferentes tipos de chicha, elaboradas artesanalmente usando diversos sustratos. *Saccharomyces* (31), *Pichia* (74), *Candida* (50), *Hanseniaspora* (31), *Rhodotorula* (2), *Dekkera* (1), *Kazachstania* (4), *Kluyveromyces* (1), *Yarrowia* (1) *Debaromyces* (1), *Cryptococcus* (1) y *Torulaspora* (1) fueron previamente identificadas por medio de PCR-RFLP, empleando la base de datos Yeast-id.com (Universidad de Valencia, España). Como control para el protocolo de extracción se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* RH218 (ATCC) (investigación en proceso).

Extracción de ADN genómico

Los cultivos de las levaduras se dejaron crecer durante 16 horas en agitación (120 rpm) o hasta obtener más de 100 millones de células/ml a 28 °C, en 5 ml de YPED (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%). Las células se colectaron por centrifugación (Microcentrífuga Eppendorf) a 8000 rpm durante 5 min en un tubo de microcentrífuga. Posteriormente, las células se resuspendieron en 0,5 ml de una solución de sorbitol 1M, EDTA 0,1M, (pH 5), que contenía 50 Unidades (U) de la enzima Beta-glucoronidasa (Sigma-Aldrich). La suspensión con la enzima fue incubada en baño maría a 37 °C durante 60 min, agitando periódicamente (en ocasiones se supervisó la pérdida de la pared celular colocando las células en agua destilada y verificando al microscopio óptico la reducción de la densidad celular).

Los esferoplastos se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y el precipitado se resuspendió en 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM (pH 7,4). Luego, se añadió 50µl de SDS al 10% y se incubó en baño María a 65 °C por 30 min. Inmediatamente se añadieron 0,2 ml de acetato de potasio (KAc) 5M (pH 4,8), se resuspendió (mínimo 30 seg.), y se dejó en baño de hielo por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se trasladó el sobrenadante a otro tubo. Se centrifugó de nuevo por 5 min para eliminar otras impurezas y se trasladó el sobrenadante a otro tubo. Se adicionó 1 ml de isopropanol (conservado a -20 °C) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min agitando suavemente el tubo. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 0,5 ml de etanol al 70% (conservado a -20 °C), se centrifugó a 14000 rpm por 5 min, y se descartó el sobrenadante, dejando secar el precipitado a temperatura ambiente.

Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µl de TE (Tris-EDTA pH 7,4), se incubó por 5 min en baño maría a 100° C, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se verificó la extracción del ADN usando 3µl (120-500 ng) en un gel de agarosa al 1% usando TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) a 100-110 v, durante 30 min. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso posterior. La cuantificación y pureza del ADN se determinó mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm (Warburg y Christian, 1942).

Amplificación y digestión de la región ITS1-5.8S-ITS2

La calidad del ADN obtenido fue verificada usando este ADN como molde para la amplificación mediante PCR y la digestión del producto con diferentes enzimas de restricción.





Las dos regiones variables que flanquean el gen 5.8S rARN se amplificaron en un termociclador (M.J. Research, USA), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, apareamiento a 55 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 2 min, con una extensión final de 10 min a 72 °C.

Para la amplificación se añadieron aproximadamente 20 ng (7µl) de ADN a 28µl de mezcla de PCR para un volumen final de 35µl: 50mM ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), 50 mMITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Invitrogen) (White et ál., 1990; Suárez et ál., 2007), 0,25 mM de coctel de dNTP, 1X Buffer Taq con (NH₄)₂SO₄ (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), 2,5 mM MgCl₂, y 1U de Taq Polimerasa (Fermentas, USA).

El producto amplificado de la PCR se analizó sin purificar con las enzimas de restricción: *Hba*I (*Cfo*I), *Bsu*R I (*Hae*III) y *Hin*fl (Fermentas, USA), siguiendo las condiciones del fabricante. Los productos de la PCR y de la digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados y registrados mediante transiluminador UV y cámara con filtro UV.

Por último, los tamaños de las bandas fueron analizadas mediante el marcador de peso molecular, Generuler 50pb (Fermentas, USA), y su tamaño estimado en pares de bases, con el software UviGelStartMw v11.0 ©.

Diseño experimental

Se evaluó la concentración de enzima necesaria para obtener el rompimiento de la pared celular, comparando la concentración de ADN obtenida usando 50, 100 y 200 U de la enzima, en las cepas *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia sp.* con tres repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando un Anova factorial con el paquete estadístico Statistica 7.0 ®

Resultados y discusión

Se evaluaron 198 aislados puros de levaduras obtenidas a partir de chichas de diferentes procedencias (piña, arracacha y maíz) para la extracción de ADN (investigación en proceso). Se obtuvo una concentración media de 124,8±30,2 ng/µl a partir de un cultivo de 5 ml.

De acuerdo con la cuantificación por espectrofotometría se pudo evidenciar la cantidad (A 260) y pureza (relación A260/A280 de 1,86±0,1) de ácidos nucleicos obtenidos a partir de la extracción. Para amplificar el ADN se realizaron diluciones 1:100. El ADN obtenido fue usado durante varios meses en stock, manteniéndose sin degradar, por lo cual no fueron necesarias extracciones posteriores.

En las figuras 1 y 2 se muestran los productos de PCR y Digestión con tres enzimas de restricción de la región ITS1-5.8S-ITS2.

En la figura 1 se muestran los amplificados obtenidos a partir del ADN extraído con el protocolo propuesto. Además, estos amplificados fueron digeridos con

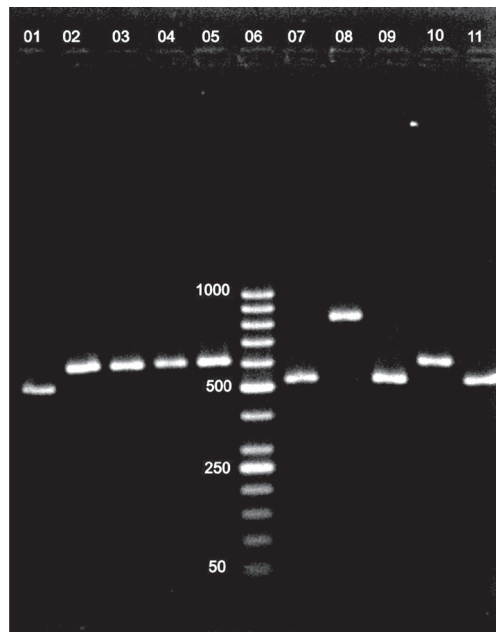


Figura 1. Verificación de producto de PCR (4µl/pozo) en gel de agarosa 1,5%. En el carril 6 se encuentra el marcador de peso molecular, Generuler 50pb (Fermentas, USA). Bandas de tamaños entre 400 y 900 pb. 01-03, 07, 09, 11: *Candida*, 04, 05, 10: *Pichia*, 08: *Saccharomyces*.

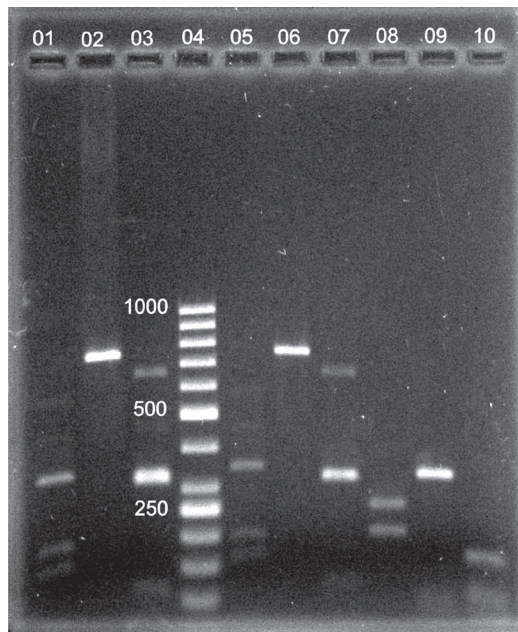


Figura 2. Verificación de los fragmentos obtenidos a partir de la digestión del amplificado (7µl/pozo) en gel de agarosa 1,5%. En los carriles 1, 5 y 8 digestión con *CfoI*, en los carriles 2, 6 y 9 digestión con *HaeIII*, y en los carriles 3, 7 y 10 digestión con la enzima *HinfI*. 1-3, 5-7: *Hanseniaspora guilliermondii*, 8-10: *Pichia fermentans*. En el carril 4 se encuentra el marcador de peso molecular, Generuler 50pb (Fermentas, USA). Bandas observables entre 100 y 800 pb.



tres enzimas de restricción en la región ITS1-5.8S-ITS2 (figura 2), la cual es de gran importancia en identificación molecular (Esteve-Zarzoso et ál., 1999; Osorio-Cadavid et ál., 2008) y estudios de filogenia (Querol et ál., 2003), observándose bandas claras y definidas desde 880 pb hasta 50 pb en un gel de agarosa 1,5%, que pudieron ser cuantificadas y analizadas automáticamente por el software.

Este protocolo propuesto presenta algunas modificaciones notables al planteado por Querol et ál. (1992), el cual es un método de uso universal para la extracción de ADN de levaduras con fines moleculares. El paso de recolección de células a partir del medio YPED fue reducido a la mitad del tiempo (de 10 a 5 min), sin notar cambios relevantes en la cantidad de precipitado. Sin embargo, el cambio más significativo fue el reemplazo de la enzima Zimolasa por la Beta-glucoronidasa para la degradación de la pared celular y obtención de esferoplastos, reduciendo los costos de extracción por muestra en relación con la enzima (cada muestra requiere una inversión de 100 pesos con la enzima Beta-glucoronidasa, 1.000.000 U permite la obtención del ADN de 20.000 muestras, mientras que con Zimolasa se requiere una inversión mayor a 200 pesos por muestra). Mediante un análisis de varianza (Anova) se demostró que no existen diferencias significativas en la cantidad de ADN obtenido al usar 50, 100 y 200 U de enzima, ni tampoco entre especies diferentes de levadura ($p > 0,05$).

A pesar de que el empleo de esta enzima no ha sido descrito en la literatura para romper pared celular de levaduras en técnicas de extracción de ADN, se ha utilizado en la obtención de protoplastos para mejoramiento genético (Cuervo et ál., 1999; Lozano 1999). Una de las características más importantes de esta enzima es su alta estabilidad en suspensión (presentación comercial), lo que facilita su mantenimiento y aprovechamiento durante años (experiencias en nuestro laboratorio lo han demostrado, para este estudio se usó una enzima comprada en el año 1998 y conservada en refrigeración) (Cuervo et ál., 1999). Finalmente, como paso adicional, el ADN extraído se incubó a 100° C por 5 min, inactivando ADNasas libres que pudieran degradar el ADN, asegurando su estabilidad por tiempo prolongado.

Conclusiones

Se logró la estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras, el cual permite una reducción de costo y obtención de ADN de alta concentración y pureza.

Este protocolo fue utilizado para la obtención de ADN genómico a partir de diferentes géneros y especies de levaduras, sin que se haya observado una diferencia significativa.

La enzima Beta-glucoronidasa puede reemplazar a la enzima Zimolasa en el proceso de extracción de ADN genómico de levaduras, por generar una cantidad suficiente de esferoplastos y garantizar una óptima liberación del ADN.

El calentamiento del ADN a 100 °C por 5 min, durante la etapa final de la extracción, inactiva posiblemente las enzimas ADNasas presentes, garantizando la estabilidad del ADN por largo tiempo.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Convocatoria Interna 2007 de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle (CI: 7752). Además, se agradece especialmente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas de la Universidad de Valencia (España), por permitir el uso de la base de datos Yeast-id.com.

Referencias bibliográficas

- Cuervo, R. A., Cerón, F. E., Gómez, R. F., García, S., Niño, R., Osorio, E. 1999. Transformación, purificación y caracterización del antígeno de superficie del virus de la hepatitis b producido en *Saccharomyces cerevisiae* RH218. Revista de la asociación colombiana de ciencias biológicas 21, 63-68.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematics of Bacteriology 49, 329-337.
- Hoffman, C. S., Winston, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene 57, 267-272.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. 1998. *The yeasts: a taxonomic study*. 4 ed. Amsterdam: Elsevier.
- Lozano, A. 1999. Estandarización de dos técnicas usadas ampliamente en biología molecular de levaduras: fusión de protoplastos y optimización del medio de cultivo. Tesis de pregrado, Departamento de Biología, Universidad del Valle.
- Osorio-Cadavid, E., Chávez-López, C., Tofalo, R., Paparella, A., Suzzi, G. 2008. Detection and identification of wild yeasts in champú's, a fermented colombian maize beverage. Food microbiology 25, 771-777.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. Systematics of applied microbiology 15, 439-446.
- Querol, A., Belloch, C., Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E. 2003. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. Internacional microbiology 6, 201-205.
- Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., López-Gómez, A., Weiss, J. 2007. Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. Food control 18, 33-39.
- Suárez, B., Pando, R., Fernández, N., Querol, A., Rodríguez, R. 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. Food microbiology 24, 25-31.
- Torres-Bauzá, L. J., Riggsby, W. S. 1980. Protoplasts from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. Journal of General Microbiology 119, 341-9.
- Warburg, O., Christian, W. 1942. Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase. Biochemistry. 310, 384-421.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, E., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis et ál. (ed.). Academic Press, pp. 315-322.
- Xu, X., Ziegler, R. G., Waterhouse, D. J., Saavedra, J. E., Keefer, L. K. 2002. Stable isotope dilution high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry method for endogenous 2- and 4-hydroxysterones in human urine. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 780, 315-330.

