

Estandarización de un protocolo de obtención de ADN genómico para la cuantificación de 5mC en brotes epicórmicos de *Tectona grandis* L.

Elisa Quijala¹, Luis Valledor², Rodrigo Hazbun², Raúl Barbón¹, Manuel de Feria¹, Maité Chávez¹, Roberto Rodríguez². *Autor para correspondencia

¹Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e.mail: elisa@ibp.co.cu

²Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología, Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo, España.

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de definir un método de extracción y purificación que proporcionara ácido desoxirribonucleico (ADN) adecuado para determinar el porcentaje de 5 mC presente en el ADN genómico de brotes epicórmicos de *Tectona grandis* L. Durante la estandarización del protocolo de extracción de ADN se compararon cuatro métodos: 1- clásico basado en una solución amortiguadora salina con CTAB (hexadecil trimetil bromuro de amonio), 2- Kit de extracción de ADN de plantas DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) según el protocolo recomendado por el fabricante, 3- Kit de extracción de ADN de plantas DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) modificado con el empleo de fenol sin columnas de silicio, 4- Kit de extracción de ADN de plantas DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) con modificaciones que incluyeron el empleo de fenol y columnas de silicio. Las muestras extraídas con el método del CTAB, generaron en su totalidad electroferogramas no válidos por la presencia de nucleósidos. En cuanto a las muestras purificadas mediante el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) se pudo apreciar que solo se obtuvieron electroferogramas válidos cuando se empleó el fenol y adicionalmente las columnas de silicio, verificándose la pureza de las muestras, de cuya hidrólisis se obtienen solamente desoxinucleosidos. Se logró un método de extracción y purificación que proporcionó ADN genómico de teca, basado en el empleo de fenol y purificación del ADN con columnas de SiO₂, adecuado para determinar de forma precisa el porcentaje de metilación de residuos citosina en yemas de brotes epicórmicos de *Tectona grandis* L.

Palabras clave: extracción, metilación, metil citosina, purificación, Teca

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of defining an extraction and purification method that it provided deoxyribonucleic acid (DNA) appropriate to determine the percentage of 5mC in the genomic DNA of epicormics buds of *Tectona grandis* L. During the standardization of the protocol four methods were compared: 1 - classic based on saline shock solution with CTAB (hexadecil trimetil ammonium bromide), 2 - Kit of extraction of DNA plants DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) according to the protocol recommended by the maker, 3 - Kit of extraction of DNA plants DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) modified with phenol employment without silicon columns, 4 - Kit of extraction of DNA plants DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) modified with phenol and additionally silicon columns employment. The samples extracted with CTAB method, generated totally non valid electroferograms for the nucleosides presence. Valid electroferograms were obtained only when the DNA was extracted and purified with the Kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) modified with phenol and additionally using silicon columns, with this protocols only desoxinucleosides is obtained being verified the high purity of the samples. We described an extraction and purification method that provided genomic DNA of teak based on the phenol employment and purification with columns of SiO₂, appropriate to determine in a precise way the percentage of 5mC in the genomic DNA of epicormics buds of *Tectona grandis* L.

Keywords: extraction, methyl cytosine, metilation, purification, Teak

INTRODUCCIÓN

Dentro de los posibles mecanismos de control de la expresión génica, los cambios epigenéticos dependientes de metilación de residuos citosina del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico y específicamente de secuencias promotoras de genes concretos, regulan gran parte de las funciones del

genoma. A diferencia de las alteraciones genéticas, las modificaciones epigenéticas no cambian la propia secuencia física del ADN y, paradójicamente, a pesar de que ciertos cambios son heredables, la mayoría de cambios epigenéticos son potencialmente reversibles. En función del objetivo planteado, el análisis de los patrones de metilación puede abordarse como metilación global o metilación sitio-específica.

El aporte del grupo de investigación EPIPHYSAGE al estudio y dinámica de metilación, han permitido definir protocolos de cuantificación de porcentajes de metilación global de ADN genómico mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE). Estos están basados en hidrólisis ácida y separación de bases nitrogenadas (Fraga *et al.*, 2000) o hidrólisis enzimática y separación de desoxi-nucleosidos (Fraga *et al.*, 2002).

Sin embargo, en la mayoría de las especies leñosas la calidad y cantidad de ADN extraído, libre de ARN, susceptible de ser analizado por HPCE, varía entre especies del mismo género, tejidos de un mismo árbol y distintas épocas del año para un mismo tejido (Henry, 2001). Las especies caducifolias como la teca (*Tectona grandis*), poseen un contenido variable de polifenoles y polisacáridos, que al precipitar junto con el ADN en el proceso de extracción pueden interferir en el análisis correspondiente. La falta de un método universal de extracción de ADN, obliga a la adecuación de métodos específicos basados en CTAB (Santana *et al.*, 1999) o en una etapa inicial de aislamiento de núcleos en condiciones ácidas (Marinoni *et al.*, 2003). La utilización de métodos basados en la utilización de columnas de resina (ej. DNeasy, Qiagen) que en principio permiten extraer ADN de mayor calidad, es óptima de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, cuando se utilizan tejidos jóvenes o poco diferenciados, ya que contienen más células por masa fresca y menor proporción de polisacáridos y polifenoles, lo cual resulta en un mayor rendimiento de ADN purificado.

La purificación de ADN y/o ARN de buena calidad a partir de muestras diversas es esencial para la mayor parte de las metodologías empleadas en biología molecular y aplicaciones biotecnológicas. La digestión de ADN genómico es limitada por proteasas celulares que inactivan o degradan las enzimas utilizadas, etc. Estas y otras situaciones derivan en resultados analíticos inconsistentes, resultando imprescindible la eliminación de contaminantes específicos en función de los objetivos de investigación.

Cuando se plantea el estudio de la dinámica de metilación edad-dependiente en leñosas, ha de adecuarse la metodología para materiales vegetales en diferentes estados de crecimiento. En teca, a pesar de existir estudios morfológicos y moleculares sobre la diversidad genética de poblaciones naturales, así como la estabilidad genética de plantas procedentes del cultivo *in vitro*, no existen estudios asociados a variaciones epigenéticas.

El objetivo principal de este trabajo fue definir un método de extracción y purificación que

proporcionara ADN genómico adecuado para determinar, de forma precisa el porcentaje de metilación de residuos citosina presente en el ADN genómico de brotes epicórmicos de *Tectona grandis* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron brotes epicórmicos, los cuales fueron colectados dos semanas después de realizada la tala de árboles con más de 30 años de edad. Las yemas de los brotes epicórmicos fueron escindidas y utilizadas para los análisis de metilación de ADN global, los cuales se realizaron en el Departamento de Biología, Organismos y Sistemas de la universidad de Oviedo, España.

Extracción de ADN genómico

Preparación de los tejidos vegetales

Los tejidos fueron macerados en morteros de porcelana, para lo cual se utilizaron 100 mg de masa fresca por cada muestra. Posterior a la maceración, estas fueron mantenidas en nitrógeno líquido para evitar su descongelación. Finalmente, las muestras maceradas fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad.

Métodos de extracción

Durante la estandarización del protocolo de extracción de ADN genómico se utilizaron los siguientes métodos:

- 1-Clásico basado en un tampón salino con CTAB (hexadecil trimetil bromuro de amonio) y precipitación con alcoholes.
- 2- Kit de extracción de ADN de plantas *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) según el protocolo recomendado por el fabricante.
- 3- Kit de extracción de ADN de plantas *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) con modificaciones que incluyeron el empleo de fenol sin columnas de silicio.
- 4- Kit de extracción de ADN de plantas *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) con modificaciones que incluyeron el empleo de fenol y columnas de silicio.

Cuantificación del porcentaje de metilación en ADN genómico

Se utilizó la metodología desarrollada por Fraga *et al.* (2002), basada en hidrólisis enzimática de ADN y cuantificación de nucleósidos mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE), con las modificaciones que se indican en cada caso:

- Añadir a un tubo Eppendorf (0.2 ml) 10 μ l de muestra (5-10 μ g de ADN).

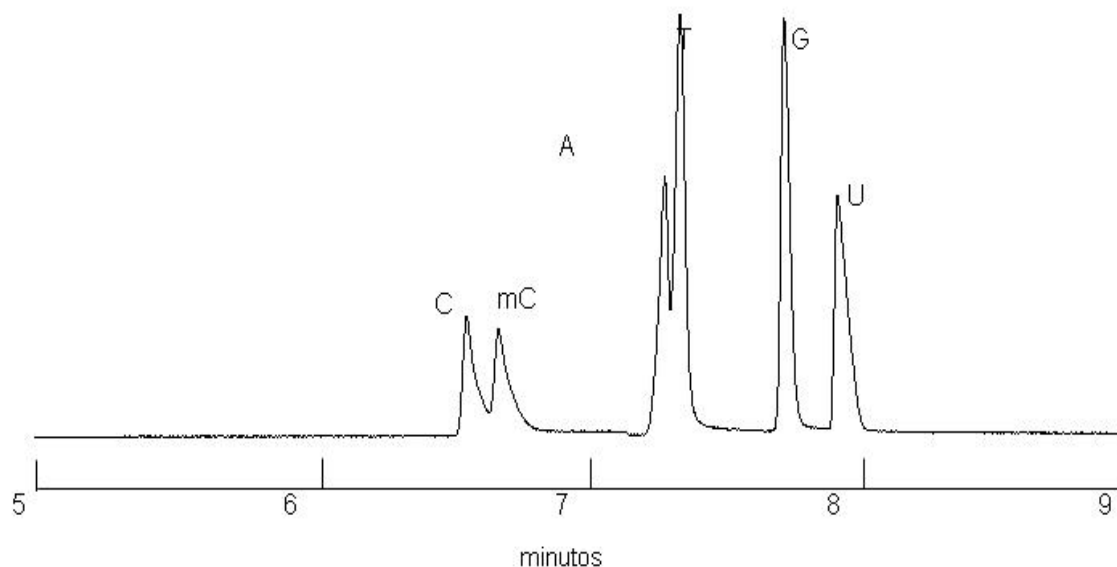


Figura 1. Electroferograma de patrones de bases, donde se puede observar la separación de todas las bases incluyendo el U y que sirvió de patrón de comparación para identificar los picos en las muestras analizadas.

- Incubar a 100°C durante 5 min. Enfriar rápidamente en hielo.
- Agregar 2.5 μ l nucleasa P1 (200 U m.l^{-1} en 30 mM $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$, Sigma) y 1.25 μ l ZnSO_4 (10 mM).
- Incubar a 37°C durante 16 h.
- Agregar 2.5 μ l Tris (0.5 M, pH 8.3) y 0.5 μ l fosfatasa alcalina (357 U m.l^{-1} en 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma).
- Incubar a 37°C durante 2 h.
- Centrifugar a 20 000 g durante 20 min a temperatura ambiente.
- Tomar dos alícuotas de 5 μ l.
- Almacenar a -20°C hasta su separación y cuantificación mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE).

Las separaciones se realizaron bajo condiciones descritas por Fraga *et al.* (2002). Cada muestra fue replicada cuatro veces. El estado de metilación del ADN se cuantificó mediante el cálculo del porcentaje relativo de 5-metil-2'-deoxicitidina (5-mdC) de la siguiente forma: $\text{área de 5-mdC} \times 100 / (\text{área 5-mdC} + \text{área dC})$.

Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, al inicio de cada día de medición, se analizó una mezcla estándar de desoxinucleósidos compuesta por dC, 5-mdC, dA, dT y dG (0.2 mM cada uno, Sigma) y ordenados por tiempo de retención. Fueron inyectados las veces necesarias para obtener cuatro cuantificaciones idénticas en cuanto al tiempo de retención de cada estándar, que además sirvió de patrón de comparación para identificar los picos de las muestras (Figura 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los métodos de extracción de ADN ensayados, permitieron obtener ADN genómico, sin embargo, su calidad varió en función del método de extracción (Tabla 1).

Clásicamente la extracción de ADN genómico en plantas, se ha realizado utilizando métodos basados en CTAB. Sin embargo, hay situaciones en las que no se logra obtener ADN de calidad adecuada. En este trabajo, empleado el método basado en CTAB se logró obtener ADN caracterizado por índices A_{260}/A_{280} y $B_{220-320}$ que indican pureza aceptable. Sin embargo, al analizar las muestras en geles de agarosa, se puso de manifiesto la presencia de ARN y no se obtuvieron electroferogramas resolutivos para la cuantificación del porcentaje de metilación. El factor calidad de ADN afectó su correcta cuantificación mediante espectrofotometría, ya que mediante esta técnica, no fue posible distinguir entre cadenas de nucleósidos y ribonucleósidos, con lo cual, la co-purificación con ARN provocó una sobrestimación de la cantidad y calidad de ADN extraído.

La cantidad e índice de pureza A_{260}/A_{280} de ADN extraído con el kit DNeasy Plant Mini, fue significativamente inferior a la obtenida con CTAB, aunque el espectro de absorción ($B_{220-320}$) derivado de ADN extraído siguió una tendencia similar con ambos métodos. Mediante electroforesis se comprobó una mayor eficacia del kit para la obtención de ADN libre de ARN.

Cuantificación del porcentaje de metilación

La relación entre el área bajo el pico correspondiente a 5-mdC y dC (porcentaje de metilación) obtenida en muestras extraídas con CTAB varió entre 60-95%, se visualizaron al menos siete picos y varios de ellos tenían tiempos de retención similares. Al agregar, secuencialmente, reducidas trazas de patrones de nucleótidos (C, A, U y G) a las muestras, se detectó un aumento de picos específicos. En el caso de la A se observó un aumento del pico correspondiente a 5-mdC. Estos antecedentes, unidos a la detección visual de ARN mediante electroforesis, señalan una cuantificación errónea del porcentaje de 5-mdC debido a la presencia nucleósidos en las muestras. Esta situación se agravó por la co-migración de A y 5-mdC, que al solaparse causaron sobreestimación del porcentaje de metilación. Las muestras extraídas con CTAB, generaron en su totalidad electroferogramas no válidos por la presencia de nucleósidos.

En cuanto a las muestras purificadas mediante el kit de extracción DNeasy Plant Mini se pudo apreciar que solo se obtuvieron electroferogramas válidos cuando se empleó el fenol y adicionalmente las columnas de silicio. Con este método aunque se obtuvo menor cantidad de ADN se logró la eliminación de ARN. Se detectaron claramente cinco picos, cuyos tiempos de elusión coincidieron plenamente con los estándares. Se verificó la pureza de las muestras, de cuya hidrólisis se obtuvieron solamente desoxinucleosidos.

Para la obtención de ADN libre de ribonucleósidos en mamíferos, se ha demostrado que el uso de una combinación de dos ribonucleasas (RNasa A y T1) es suficiente para eliminar completamente el ARN (Rubsam y Shewach, 1997). Sin embargo, en plantas, este tratamiento, solo o conjuntamente con una etapa de precipitación de ARN mediante LiCl, no es suficiente para eliminarlo por completo.

La base de esta resistencia podría estar en una estructura molecular especial del ARN de plantas (Johnston *et al.*, 2005) o mayor presencia en células vegetales de moléculas de ARN resistente a digestión, por ejemplo ARN de transferencia (ARNt), debido a su estructura secundaria y terciaria, dificulta o imposibilita la acción de las ribonucleasas (Libonati y Gotte, 2004). De hecho, el ARNt es muy abundante en lisados de tejidos vegetales (Johnston *et al.*, 2005). También, ha de tenerse en cuenta otras variables que inhiben o interfieren la actividad endonucleasa, como el

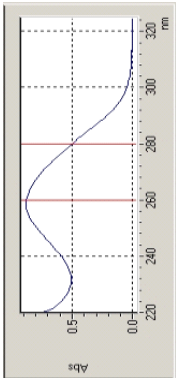
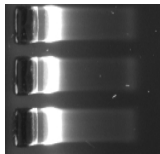

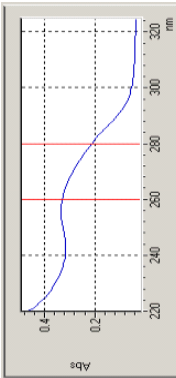
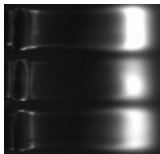

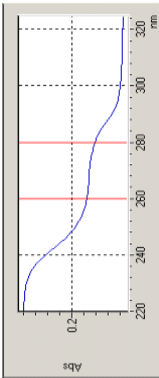
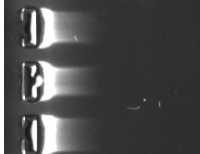

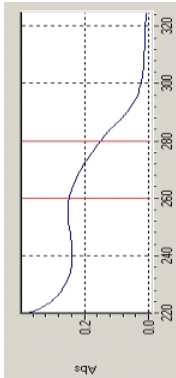
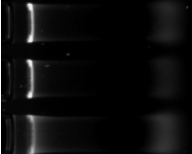
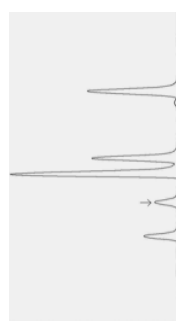
contenido iónico y carbohidratos unidos a moléculas de ARN o a la estructura de la enzima (Libonati y Sorrentino, 2001).

Se han descrito interacciones que mantienen covalentemente unido ARN a histonas (Lusser y Kadonaga, 2004) o ARN cromosomal, el cual, a diferencia del ARN mensajero (ARNm), tiene la capacidad de interactuar o unirse con ADN homólogo, formando híbridos resistentes a ribonucleasas (Sivolap y Bonner, 1971), lo cual conduciría a la co-precipitación de ADN y ARN durante el proceso de extracción.

La alternativa es el uso de técnicas de extracción y purificación de ADN genómico más específicas, tales como electroforesis en geles de agarosa y aislamiento de la banda de ADN o utilización de columnas de afinidad específica, que emplean tecnologías avanzadas y reducen los tiempos de purificación. El kit utilizado en este estudio, está basado en columnas de intercambio aniónico (DNeasy®, Qiagen), que presentan una alta afinidad por ácidos nucleicos, junto con la utilización de sales caotrópicas que rompen puentes de hidrógeno, aumentando la solubilidad de sustancias no polares en agua, afectando principalmente la estructura secundaria de polímeros tales como ADN, ARN y proteínas. La principal función de las sales caotrópicas es desnaturalizar las proteínas celulares y a la vez facilitar la unión de los ácidos nucleicos a la columna. Esta última propiedad de las columnas, permite depurarlos mediante soluciones de lavado sin necesidad de precipitarlos y suspenderlos en reducidos volúmenes de medio líquido.

Por los antecedentes expuestos es recomendable que, antes de utilizar una muestra para cuantificar el porcentaje de metilación del ADN genómico, se realice un chequeo previo para detectar ARN residual (Havliš y Trbušek, 2002). La forma clásica de detectar presencia de ARN en una suspensión de ADN es realizar una separación electroforética en agarosa, que ha sido el método utilizado en este estudio y con el cual fue posible deducir la causa de los electroferogramas anómalos. En el caso concreto de cuantificación de metilación de ADN genómico mediante hidrólisis enzimática y separación por HPCE, bajo las condiciones descritas por Fraga *et al.* (2002), es imprescindible realizar pruebas preliminares de cuantificación de metilación para confirmar la pureza de las muestras extraídas y de ser necesario ajustar el protocolo de extracción para la eliminación total de ARN.

Tabla 1. Cuadro resumen de las características de ADN de *Tectona grandis* L., extraído a partir de yemas de brotes epicórmicos con dos semanas de rebrote y su calidad para la cuantificación de 5mC mediante HPCE según el método de extracción utilizado.

Método de extracción	Concentración (µg/g)	A_{260}/A_{280}	Barrido entre 220-320 nm (B ₂₂₀₋₃₂₀)	Gel de agarosa	Electroferograma (CIA)
CTAB	390 ± 25	1.92 ± 0.2			
DNeasy Plant Mini Kit standard	290 ± 35	1.68 ± 0.7			
DNeasy Plant Mini Kit con fenol, sin columnas de silicio	310 ± 46	1.74 ± 0.5			
DNeasy Plant Mini Kit con fenol y columnas de silicio	160 ± 20	1.55 ± 0.05			

CONCLUSIONES

En todos los casos ensayados en este trabajo fue posible la detección de los picos generados por la hidrólisis del ADN, estos pudieron ser detectados claramente y se observó que la proporción de dA, dT y dG se mantuvo relativamente constante. Sin embargo, el factor calidad de ADN afectó notablemente su correcta cuantificación mediante espectrofotometría, especialmente por la co-purificación con ARN, el cual indujo a una sobrestimación de la cantidad y calidad del ADN. La obtención de ADN genómico adecuado para determinar de forma precisa el porcentaje de metilación de residuos citosina en yemas de brotes epicórmicos de *Tectona grandis* L, solo se logró cuando se utilizó el Kit de extracción de ADN de plantas DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) con modificaciones que incluyeron el empleo de fenol durante la extracción y adicionalmente las columnas de silicio durante la purificación del ADN.

REFERENCIAS

- Doyle, J, Doyle, J (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13- 15
- Fraga, M, Rodríguez R, Cañal, MJ (2000) Rapid quantification of DNA methylation by High Performance Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* 21: 2990-2994
- Fraga, MF, Uriol, E, Diego, LB, Berdasco, M, Esteller, M, Cañal, MJ, Rodríguez, R (2002) High Performance Capillary Electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: Application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis* 23:1677-1681
- Havliš, J, Trbušek, M (2002) 5-methyl-cytosine as a marker for monitoring of DNA methylation. *J. Chromatogr. B.* 781:373-392
- Henry, R (2001) Plant DNA Extraction. En: R Henry (Ed). *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants*, pp. 239-249. CAB International. London
- Johnston, J, Harding, K, Bremner, D, Souch, G, Green, J, Lynch, P, Grout, B, Benson, E (2005) HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:844–853
- Libonati, M, Gotte, G (2004) Oligomerization of bovine ribonuclease A: structural and functional features of its multimers. *Biochem. J.* 380:311-327
- Libonati, M, Sorrentino, S (2001) Degradation of double-stranded RNA by mammalian pancreatic-type ribonucleases. *Methods Enzymol.* 341:234–248
- Lusser, A, Kadonaga J (2004) Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nature Methods* 1:19-26
- Marinoni, D, Akkac, A, Bounous, G, Edwards, K, Botta, R (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Molecular Breeding* 11:127-136
- Rubsam, LZ, Shewach DS (1997) Improved method to prepare RNA-free DNA from mammalian cells. *J. Chromatogr. B.* 702: 61–68
- Santana, C, Oliveira, C, Valdivieso, T (1999) Molecular typing of rootstock hybrids (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*) and Portuguese *Castanea sativa* cultivars based on RAPD markers. *Acta Hort.* 494:295-301
- Sivolap, Y, Bonner, J (1971) Association of Chromosomal RNA with Repetitive DNA. *PNAS* 68:387–389