

## EVALUACIÓN DE CUATRO MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE DNA BACTERIANO DE MUESTRAS DE CONTENIDO RUMINAL.

Balmes<sup>1</sup>, G., Serrano<sup>1</sup>, A., Bach<sup>1,2</sup>, A. y Arís<sup>1</sup>, A.

<sup>1</sup>Unidad de Rumiantes, IRTA-Torre Marimon, Caldes de Montbui, España <sup>2</sup> ICREA, Barcelona-España. [Anna.aris@irta.es](mailto:Anna.aris@irta.es)

### INTRODUCCIÓN

El análisis de la microbiota ha sido realizado tradicionalmente mediante técnicas de cultivos microbianos basadas en el uso de medios selectivos. La principal limitación de estas técnicas se basa en que sólo unas pocas especies de microorganismos son cultivables (Penders et al., 2007; Zoetendal et al., 2004). Además, incluso en el caso de los microorganismos cultivables, la completa identificación de especies microbianas requiere de tests bioquímicos que a menudo están asociados a interpretaciones intuitivas (Guarner and Malagelada, 2003; Tannock, 2001). El desarrollo de nuevos métodos moleculares dirigidos al estudio de la ecología microbiana ha permitido su aplicación a la investigación de comunidades microbianas intestinales. Estos métodos de biología molecular se basan en la variabilidad genética de genes como el *16SrRNA* o genes *hsp* (que codifican proteínas de estrés térmico). Las regiones variables y hipervariables de estos genes pueden ser usadas para la tipificación y cuantificación específica de microorganismos (Penders et al., 2007; Zoetendal et al., 2004; Jian et al., 2001). Para llevar a cabo estas técnicas es necesario realizar un primer paso de extracción de DNA microbiano siendo, en el caso de muestras complejas como las de contenido ruminal, un paso crítico y difícil de optimizar debido a la gran variabilidad estructural microbiana que existe. El estudio de la mejora de estos métodos de extracción pretende establecer protocolos que aseguren un mismo rendimiento de obtención de ácidos nucleicos de diferentes microorganismos, independientemente de cuales sean sus características estructurales. El objetivo de este trabajo ha sido la comparación de cuatro métodos de extracción de DNA microbiano a partir de la evaluación de la eficiencia de extracción de DNA genómico de 4 especies bacterianas de interés en microbiología ruminal y con diferentes propiedades estructurales.

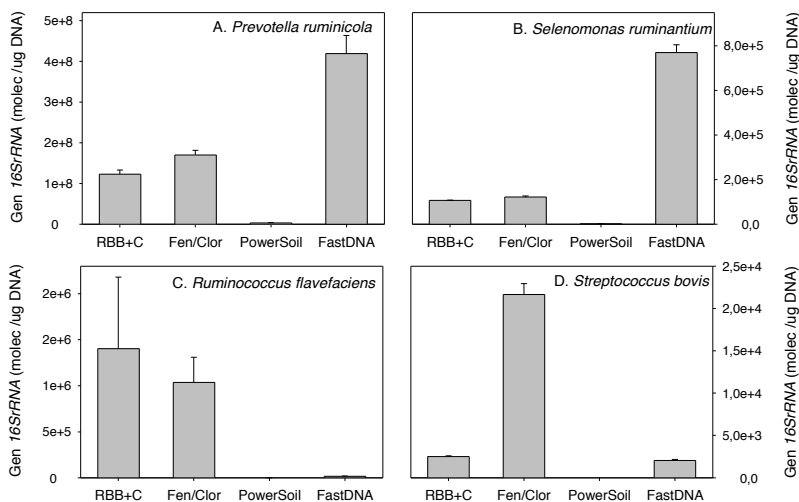
### MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de contenido ruminal utilizadas en este estudio fueron obtenidas de terneros *Holstein*, sacrificados a un año de edad con 510 Kg. de peso medio, que habían sido alimentados con una dieta pobre en fibra basada en un kilo de paja para cada ocho kilos de concentrado. El contenido ruminal fue homogenizado y distribuido en diferentes alícuotas que fueron congeladas a -80°C hasta su utilización para la extracción de DNA. Se comparó la eficiencia de cuatro métodos de extracción de DNA microbiano: 1) el método RBB+C, que combina la lisis celular por *bead beater* con la purificación de DNA por columnas de sílica (Yu y Morrison, 2004), 2) el método clásico de extracción de DNA con fenol-cloroformo combinado con una lisis celular por *bead beater* (Whitford et al., 1998), 3) el kit Power Soil (MO BIO Laboratories, Inc) y 4) el kit Fast DNA® SPIN Kit (Qbiogene, Inc.). Cada método se realizó por sextuplicado siguiendo la metodología indicada en las referencias bibliográficas citadas o bien siguiendo las instrucciones del fabricante en el caso de los kits comerciales. El DNA extraído se analizó por espectrofotometría a 260nm, 280nm y 230 nm. La integridad del DNA fue monitorizada con geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio. A partir del DNA obtenido con los diferentes métodos, se cuantificaron los microorganismos modelo *Prevotella ruminicola*, *Selenomonas ruminantium*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Streptococcus bovis*. La cuantificación se realizó por real time-PCR utilizando *primers* específicos para el gen *16SrRNA* y estándares basados en plásmidos linealizados, contruidos por procesos de clonaje con vectores comerciales pGEM-T (Invitrogen) y portadores de las secuencias microbianas específicas a amplificar.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con todos los métodos de extracción evaluados se obtuvo DNA microbiano, siendo el método clásico de extracción por fenol-cloroformo combinado con la lisis celular por *bead*

*beater*, el que daba un mejor rendimiento. La visualización del DNA en geles de agarosa indicó que había DNA genómico degradado en todos los casos pero con menor grado en el caso del método RBB+C. Las ratios  $A_{260}/A_{230}$  eran bajas después de aplicar todos los protocolos, indicando una contaminación por compuestos orgánicos que es esperable en este tipo de muestras de origen ruminal. El DNA con menor grado de contaminación proteica era el obtenido con el método RBB+C, con una ratio  $A_{260}/A_{230} = 1,798$ . Tras la cuantificación microbiana por RT-PCR de las 4 especies bacterianas tomadas como modelo de análisis, los resultados indicaron que el DNA de los microorganismos gram negativos *Selenomonas ruminantium* y *Prevotella ruminicola* se extraía con mayor eficiencia utilizando el método Fast DNA® SPIN Kit mientras que para los gram positivos *Ruminococcus flavefaciens* y *Streptococcus bovis* funcionaba mejor el método de extracción con fenol-cloroforno combinado con lisis celular por *bead beater* (Figura 1). El hecho que los métodos Fast DNA® SPIN Kit y fenol-cloroforno extrajeran DNA parcialmente degradado y a la vez dieran las mayores cuantificaciones microbianas indica que la integridad del DNA genómico no es un punto crítico en la aplicación de RT-PCR, como mínimo en el caso de amplicones de un tamaño menor o igual a unos 900 pb. A pesar que la eficiencia de extracción dependía en todos los métodos de las características estructurales de los microorganismos, el método de extracción por fenol/cloroforno era el método que daba una eficiencia aceptable con todos los microorganismos evaluados en el estudio.



**Figura 1.** Cuantificación de las moléculas de DNA codificantes para el 16SrRNA de los microorganismos gram negativos *Prevotella ruminicola* (panel A) y *Selenomonas ruminantium* (panel B) y de los gram positivos *Ruminococcus flavefaciens* (panel C) y *Streptococcus Bovis* (panel D), en un microgramo de DNA microbiano total.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guarner, F. & Malagelada, J.R. 2003. *Lancet*. 361, 512-519.
- Jian, W., Zhu, L. & Dong, X. 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1633-1638.
- Penders, J., Thijs, C., van den Brandt, P.A., Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F., Adams, H., van, R.R. & Stobberingh, E.E. 2007. *Gut*. 56, 661-667.
- Tannock, G.W. 2001. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 410S-414S.
- Whitford, M.F., Forster, R.J., Beard, C.E., Gong, J., and Teather, R.M. (1998). *Anaerobe*. 4, 153-163.
- Yu, Z. and Morrison, M. 2004. *Biotechniques*. 36, 808-812.
- Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I., and Gaskins, H.R. 2004. *J. Nutr.* 134, 465-472.

## EVALUATION OF FOUR METHODS FOR EXTRACTION OF BACTERIAL DNA FROM RUMINAL CONTENTS

**ABSTRACT:** The objective of this study was to compare four DNA extraction methods for the purification of microbial DNA from ruminal contents. The evaluated methods were 1) the RBB +C method which combines the cell lysis by bead beater with DNA extraction by silica columns, 2) the phenol-chloroform extraction method plus a cell lysis step by bead beater, 3) the Power Soil kit (MO BIO Laboratories, Inc) and 4) the Fast DNA® SPIN Kit (Qbiogene, Inc.). We compared the efficiency in terms of quantity and quality of extracted DNA, which was used for RT-PCR quantification of four bacteria species in order to evaluate whether there was any bias in the DNA extraction yield depending on the microbial structural features. The results indicated that the DNA of Gram negative *Selenomonas ruminantium* and *Prevotella ruminicola* was extracted more efficiently with the Fast DNA® SPIN Kit whereas the yield of extracted DNA of Gram positive *Ruminococcus flavefaciens* and *Streptococcus bovis* was higher with the phenol-chloroform method. Although in all tested methods the DNA extraction yield was related to the microbial structural properties, the phenol-chloroform method combined with bead beating gave acceptable yields for all the microorganisms evaluated in this study.

**Keywords:** DNA extraction, microorganism, ruminal content.