

Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura

**Optimización de dos
métodos de extracción de
ADN genómico a partir de la
concha de abanico peruana
Argopecten purpuratus L.**

**Susana Sirvas Cornejo
Betty Gamero Collado**

OPTIMIZACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE
ADN GENÓMICO A PARTIR DE LA CONCHA DE
ABANICO PERUANA *ARGOPECTEN PURPURATUS* L.
(genética de poblaciones)

Primera edición digital

Diciembre, 2014

Lima - Perú

© Susana Sirvas Cornejo
Betty Gamero Collado

PLD 1641

Editor: Víctor López Guzmán



<http://www.guzlop-editoras.com/>
guzlopster@gmail.com
[facebook.com/guzlop](https://www.facebook.com/guzlop)
twitter.com/guzlopster
731 2457 / 959 552 765
Lima - Perú

PROYECTO LIBRO DIGITAL (PLD)

El proyecto libro digital propone que los apuntes de clases, las tesis y los avances en investigación (papers) de las profesoras y profesores de las universidades peruanas sean convertidos en libro digital y difundidos por internet en forma gratuita a través de nuestra página web. Los recursos económicos disponibles para este proyecto provienen de las utilidades nuestras por los trabajos de edición y publicación a terceros, por lo tanto, son limitados.

Un libro digital, también conocido como e-book, eBook, ecolibro o libro electrónico, es una versión electrónica de la digitalización y diagramación de un libro que originariamente es editado para ser impreso en papel y que puede encontrarse en internet o en CD-ROM. Por, lo tanto, no reemplaza al libro impreso.

Entre las ventajas del libro digital se tienen:

- su accesibilidad (se puede leer en cualquier parte que tenga electricidad),
- su difusión globalizada (mediante internet nos da una gran independencia geográfica),
- su incorporación a la carrera tecnológica y la posibilidad de disminuir la brecha digital (inseparable de la competición por la influencia cultural),
- su aprovechamiento a los cambios de hábitos de los estudiantes asociados al internet y a las redes sociales (siendo la oportunidad de difundir, de una forma diferente, el conocimiento),
- su realización permitirá disminuir o anular la percepción de nuestras élites políticas frente a la supuesta incompetencia de nuestras profesoras y profesores de producir libros, ponencias y trabajos de investigación de alta calidad en los contenidos, y, que su existencia no está circunscrita solo a las letras.

Algunos objetivos que esperamos alcanzar:

- Que el estudiante, como usuario final, tenga el curso que está llevando desarrollado como un libro (con todas las características de un libro impreso) en formato digital.
- Que las profesoras y profesores actualicen la información dada a los estudiantes, mejorando sus contenidos, aplicaciones y ejemplos; pudiendo evaluar sus aportes y coherencia en los cursos que dicta.
- Que las profesoras y profesores, y estudiantes logren una familiaridad con el uso de estas nuevas tecnologías.
- El libro digital bien elaborado, permitirá dar un buen nivel de conocimientos a las alumnas y alumnos de las universidades nacionales y, especialmente, a los del interior del país donde la calidad de la educación actualmente es muy deficiente tanto por la infraestructura física como por el personal docente.
- El personal docente jugará un rol de tutor, facilitador y conductor de proyectos

de investigación de las alumnas y alumnos tomando como base el libro digital y las direcciones electrónicas recomendadas.

- Que este proyecto ayude a las universidades nacionales en las acreditaciones internacionales y mejorar la sustentación de sus presupuestos anuales en el Congreso.

En el aspecto legal:

- Las autoras o autores ceden sus derechos para esta edición digital, sin perder su autoría, permitiendo que su obra sea puesta en internet como descarga gratuita.

- Las autoras o autores pueden hacer nuevas ediciones basadas o no en esta versión digital.

Lima - Perú, enero del 2011

“El conocimiento es útil solo si se difunde y aplica”

Víctor López Guzmán
Editor

Optimización de dos métodos de extracción de ADN genómico a partir de la concha de abanico peruana *Argopecten purpuratus* L.

Susana Sirvas Cornejo, Betty Gamero Collado

Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV),

Calle Roma 340, Miraflores, Lima, Perú.

e-mail: susansirvas@hotmail.com, bettygamero@hotmail.com

Palabras Clave: Extracción ADN, concha de abanico, *Argopecten purpuratus*

Resumen

Se realizaron extracciones de ADN, de branquias frescas, sin usar fenol, a través del método de Bruford utilizado para primates, y del método de CTAB, recomendado para muestras con alto contenido de mucopolisacáridos. La concentración de ADN, se midió por espectrofotometría de luz UV, y la pureza a través de la relación A_{260}/A_{280} . Los resultados indicaron que el método más adecuado fue el de CTAB, con concentraciones de ADN y pureza, mayores a las obtenidas por el método de Bruford.

Introducción

La concha de abanico es un recurso muy importante en los mercados interno y de exportación. Su distribución geográfica va desde Paita (Perú) hasta Coquimbo (Chile) siendo los bancos más importantes los de Chimbote, Callao y Pisco. La producción de concha de abanico en nuestro país ha tenido muchas fluctuaciones ya sea por factores climáticos o por la disminución en la captación de semilla debido al deterioro de las poblaciones en los bancos naturales.

Actualmente la producción del recurso se basa en la captación de semilla de los ambientes naturales y el engorde posterior en sistemas de cultivo de fondo o suspendido. Se han realizado investigaciones y estudios en lo referente a su crecimiento y dinámica poblacional en ambientes naturales (Mendo *et al.*, 1988, Rubio & Taipe, 1996), y cultivo en ambientes controlados (Valdivieso *et al.*, 1989).

Se requiere estudios sobre las características genéticas de las diferentes poblaciones para poder seleccionarlas más adecuadamente e iniciar programas de produc-

ción de semilla mejorada. Las regiones de Samanco, Playa Dorada, Los Chimus, Salinas y Casma, son actualmente las más utilizadas para el cultivo.

La producción de concha de abanico de 1993 al 2002 fue de 300 a 2500 TM, con mediciones muy fluctuantes y presentó un repunte del 2000 al 2002, pero aún la producción fue muy baja. En el mes de Setiembre del 2003 se estableció la prohibición (RM N° 327-2003-PRODUCE) en relación a la extracción concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), en la jurisdicción de la Región Lambayeque y en el ámbito de la Dirección Regional de Pesquería de Piura, con el objetivo de garantizar la preservación y explotación racional de los este recurso.

El presente trabajo constituye el inicio de una serie de estudios sistemáticos a nivel molecular de esta especie, y tiene por objetivo extraer ADN genómico de concha de abanico, utilizando dos métodos: el primero que es una modificación del método de Bruford (1992), y el segundo que utiliza el detergente catiónico CTAB (cetil trimetil bromuro de amonio), usado en la purificación de ADN de organismos ricos en mucopolisacáridos (Murray & Thompson, 1980).

Metodología

Se utilizaron conchas de abanico provenientes del mercado local, o directamente de la zona de cultivo de Los Chimus, en cuyo caso hubo que realizar un acondicionamiento y mantenimiento de las conchas en el laboratorio, ya que llegaban de Los Chimus en horas de la noche o de la madrugada manteniéndolas a una temperatura de 19°C.

Extracciones de ADN

Método de Bruford (Modificación de Bruford *et al.*, 1992)

Se extrajeron las branquias de conchas frescas, se pesó 50 mg, se homogenizó en un mortero, se agregó 3 mL de buffer TNE, y se disolvió. Se agregó 300 µl de Tris HCl 1 M pH 8.0, 5 unidades de proteinasa K, y 80 µl de SDS al 20 %. Se incubó a 37°C toda la noche. Se agregó 1 / 3 del volumen de muestra de ClNa 6 M y se agitó en el vortex por 15 segundos. Luego se centrifugó a 5 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente (18–20°C). Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se agregó 2 volúmenes de etanol al 100 %. Se mezcló invirtiendo el tubo suavemente. Se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante. Se enjuagó el

pellet con 500 µl de etanol al 70 %. Se eliminó cuidadosamente el etanol y se colocó los tubos boca abajo en un papel toalla, donde se dejó secar hasta que no hubiera olor a etanol. Finalmente, se resuspendió el pellet en 300 µl de buffer TE, y se almacenó a -20 °C.

Método de CTAB (Modificación del método de Wood *et al.*, 2003)

Se extrajeron las branquias de conchas de abanico frescas, se pesó 50 mg, se homogenizó en un mortero, se agregó 300 µl de buffer CTAB (Tris HCl 100mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2 %) y se disolvió. Se transfirió a un microtubo limpio y agregó 0.15 mg de proteinasa K. Se incubó a 55°C por 2 horas. Luego se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (18 - 20°C). Se transfirió el sobrenadante a un microtubo y se agregó un volumen de cloroformo isoamil alcohol. Luego se centrifugó como anteriormente, y se transfirió la fase superior a un microtubo. Se agregó nuevamente un volumen de cloroformo isoamil alcohol y se centrifugó como anteriormente. Se transfirió la fase superior a un microtubo y se agregó 1 volumen de ClNa 1 M. Se agregó 2 volúmenes de etanol al 100 % y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se enjuagó el precipitado con etanol al 70 %, invirtiendo el tubo suavemente. Luego se extrajo el etanol. Se repitió el enjuague con etanol. Se dejó secar el tubo boca abajo en un papel toalla hasta que no hubiera olor a etanol. Se resuspendió cuidadosamente el precipitado en 300 µl de buffer TE, y se almacenó a -20°C.

Visualización del ADN en geles de electroforesis (Sambrook & Russell, 2001)

Se utilizó el buffer de corrida TAE (Tris 2 M, EDTA 0,1 M, pH 8,0 ajustado con ácido acético) y 100 ml de gel de agarosa al 1.5 % en buffer TAE. Se corrió el gel a 100 voltios por 45 minutos, hasta que el frente de corrida alcanzó aproximadamente 8 cm. Se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio (0.01 %) por 15 minutos. El gel se enjuagó con agua potable y se observó a través del transiluminador ultravioleta a 302 nm.

Medición de la concentración y pureza del ADN

La concentración se midió por triplicado, a través de espectrofotometría de luz ultravioleta, aplicando la siguiente fórmula:

Concentración de ADN = 50 µg.mL⁻¹ x A₂₆₀ x Factor de dilución.

La pureza de las soluciones se determinó aplicando la relación A₂₆₀/A₂₈₀ donde valores de 1,7 – 1,9 indicarían una pureza de 85 – 90 %.

Resultados y Discusión

La figura 1 muestra los acuarios con las conchas en agua de mar, donde se mantuvieron bien hasta la extracción.

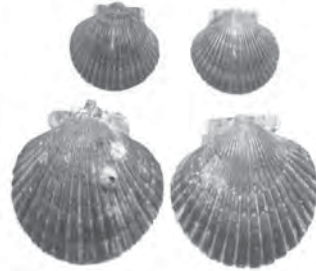


Figura 1. Acondicionamiento de las conchas de abanico en el Laboratorio de Genética Aplicada.

La figura 2 es un gel de agarosa mostrando el ADN genómico de las conchas de abanico, extraído por los métodos de Bruford y CTAB.

concentraciones de ADN que aquellas extraídas con el método de Bruford. La pureza obtenida fue mayor utilizando el método de CTAB que aquella obtenida con el método de Bruford, encontrándose dentro del rango de pureza aceptable para usos posteriores. Además, la extracción por el método de CTAB se lleva a cabo en 4 h, mientras que con el método de Bruford se requieren 2 días.

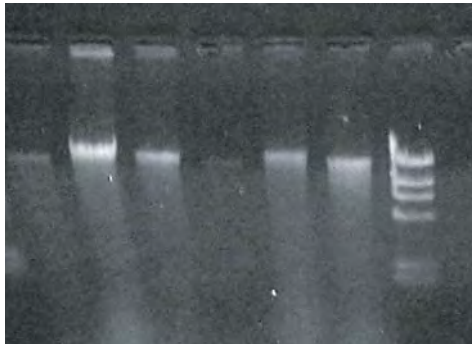


Figura 2. ADN genómico de concha de abanico extraído por el método de Bruford (1,2,3) y por el método de CTAB (4,5,6); marcador Lambda (7).

Tabla 1. Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y pureza (A_{260}/A_{280}) de ADN genómico de *Argopecten purpuratus*.

Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Pureza (A_{260}/A_{280})	
Bruford	CTAB	Bruford	CTAB
38,33	35,00	1,4237	1,8913
38,33	78,73	1,5473	1,8913
45,00	191,67	1,6027	1,9220

Una de las ventajas de cualquiera de los dos métodos, es que en ninguno de ellos se incluye fenol, ya que debido a su toxicidad existe actualmente una tendencia a evitar su uso en protocolos de extracción de ADN.

Las concentraciones y purezas de ADN obtenidas fueron similares a aquellas reportadas para otros organismos ricos en polisacáridos, como es el caso de micelios de hongos, de donde se obtuvo $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ADN (Faleiro *et al.*, 2004); o el caso de raíces frescas de cactus, de donde se obtuvo $10 - 20\ \mu\text{g}$ de ADN por gramo de muestra fresca (Tel-Zur *et al.*, 1999), mientras que las concentraciones más bajas obtenidas en nuestro laboratorio fueron de $10.5\ \mu\text{g}$ de ADN por gramo de branquias frescas; Chen & Ronald (1999) reportaron concentraciones de ADN de $153\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en sus soluciones a partir de hojas de arroz, uvas, maíz, menta y nueces, bastante similares a las concentraciones más altas obtenidas en el presente trabajo ($191\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Se puede concluir que con los dos métodos utilizados se puede extraer ADN genómico a partir de concha de abanico, sin embargo sólo con el método de CTAB se obtiene ADN de buena calidad como para un uso posterior en digestiones con enzimas de restricción, y PCR.

Referencias

- Bruford, M.; Hanotte, O.; Brookfield, J.; Burke, T. 1992. Single multilocus DNA fingerprinting. In: A. Hoelzel (ed.) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford University Press, New York. p. 225-266.
- Chen, D. H.; Ronald, P. C. 1999. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 53–57.
- Faleiro, F. G.; Niella, G. R.; Cerqueira, A. R. R. N.; Damaceno, V. O.; Gomes, L. M. C.; Faleiro, A. S. G. 2004. Mycelial production of *Crinipellis pernicioso* on four culture media for DNA extraction. *Fitopatologia Brasileira*, 29:312-315.

- Mendo, J.; Valdivieso, V.; Yamashiro, C. 1988. Crecimiento de la concha de abanico *Argopecten purpuratus* en la Bahía Independencia, Pisco-Perú. In: Recursos y dinámica del ecosistema de afloramiento peruano. *Boletín del Instituto del Mar del Perú*, Extraordinario: 153-162.
- Murray, M. G.; Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321 - 4325.
- Rubio, J.; Taipe, A. 1996. Evaluación de la población de concha de abanico en la Isla de Lobos de Tierra y Bahía Sechura. *Instituto del Mar del Perú, Informe Progreso*, 46: 63-110.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Tel-Zur, N.; Abbo, S.; Myslabodski, D.; Mizrahi, Y. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 249 -254.
- Valdivieso, V.; Loyola, C.; Gallegos, F. 1989. Producción experimental de concha de abanico en ambiente controlado. *Red Acuicultura. IMARPE, Boletín*, 2: 20-22.
- Wood, A. R.; Beaumont, A. R.; Skibinski, D. O. F.; Turner, G. 2003. Analysis of the nuclear - DNA marker for species identification of adults and larvae in the *Mytilus edulis* complex. *Journal of Mollusc Studies*, 69: 61-66.



Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura

Coloquio Internacional
27 de Junio - 1 de Julio de 2005
Iquitos, Perú

Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica

Editores:

J.-F. Renno

C. García-Dávila

F. Duponchelle

J. Nuñez

