

**Series: Producción Animal
Comunicaciones Técnicas
ISSN 1667-4014**

**COMUNICACION TECNICA N°648
AREA PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Protocolo de extracción de ADN para
la detección de *Brucella melitensis* en
tejidos**

**Dra. Lucía Paula Alvarez
MV, MSc Carlos Alejandro Robles**

2016

■ **Ediciones**

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Centro
Regional Patagonia Norte
Estación Experimental Agropecuaria Bariloche. "Dr. Grenville Morris"



Protocolo de extracción de ADN para la detección de *Brucella melitensis* en tejidos

Dra. Lucía Paula Alvarez
MV, MSc Carlos Alejandro Robles
Grupo de Salud Animal – INTA
CC: 277 (8400) Bariloche
e-mail: alvarez.lucia@inta.gob.ar
e-mail: robles.carlos@inta.gob.ar

Adaptado de Matrone, M., Keid, L.B., Rocha, V.C., Vejarano, M.P., Ikuta, C.Y., Rodriguez, C.A., Ferreira, F., Dias, R.A., Ferreira Neto, J.S., 2009. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* pcr detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. Braz J Microbiol. 40, 480-489.

Protocolo 1: Extracción con fenol/coloroformo

- 1- Agregar 1000 ul de TE a 500 ul de tejido macerado en solución fisiológica y pipetear.
- 2- Centrifugar a 13000 g por 5 min y remover el sobrenadante. Repetir.
- 3- Resuspender el sedimento en 500 ul de buffer de lisis (tiene 20 µl de proteinasa K 10 mg/ml por cada ml de buffer).
- 4- Incubar a 37 °C ON a 600 rpm.
- 5- Agregar 500 ul de fenol:clorof: IAA (Invitrogen), mezclar por inversión 20 seg.
- 6- Centrifugar a 13000 g por 5 min a 4°C.
- 7- Transferir 200 ul de la fase acuosa a un tubo nuevo. NO PIPETEAR LA INTERFASE!
- 8- Agregar 300 ul de clorof:IAA (24:1), mezclar por inversión 10 seg.
- 9- Centrifugar a 13000 g por 5 min a 4°C.
- 10- Transferir 200 ul de la fase acuosa a un tubo nuevo. NO PIPETEAR LA INTERFASE!
- 11- Agregar 200 ul de isopropanol frío o 400 ul de etanol 100% y homogeneizar por inversión.
- 12- Mantener a -20 °C toda la noche.
- 13- Centrifugar a 13000 g por 30 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante.
- 14- Agregar 500 ul de etanol 70%.
- 15- Centrifugar a 13000 g por 10 min a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 16- Repetir pasos 13 y 14 si se hace con isopropanol. Si se precipitó con etanol hacerlo una sola vez.
- 17- Secar 15 min en estufa a 37°C (hasta no ver gotas en la pared del tubo).
- 18- Agregar 30 ul de TE a pH 8 o de agua bidestilada autoclavada.
- 19- Incubar a 56 °C por 15 min.
- 20- Guardar a -20 °C.

Protocolo 2: Extracción con Chelex y proteinasa K

- 1- Agregar 20 µl de tejido macerado en solución fisiológica o líquido de cuajo y 5 µl de proteinasa K 20 mg/ml a 150 µl de Chelex 5 %
- 2- Agitar en vortex 15 s.
- 3- Incubar a 37 °C durante 1 h.
- 4- Incubar a 100 °C durante 8 min
- 5- Agitar en vortex 15 s.
- 6- Centrifugar a 10000 g durante 3 min.
- 7- Pasar el sobrenadante a un tubo limpio.
- 8- Medir la concentración y pureza del ADN a 260 nm y 280 nm en un Nanodrop.

Buffers utilizados

Buffer de lisis

Tris HCl 1M 1 ml
EDTA 0,5M 0,5 ml
NaCl 0,585 g

Ajustar a pH 8.

Llevar a 100 ml con agua destilada.

Autoclavar 15 min a 1 atm.

Agregar 1g de SDS.

En el momento de usar agregar 20 µl de proteinasa K 10 mg/ml (30U/mg) a 980 µl de buffer de lisis.

TE buffer (10:1) - pH 7,5.

1 ml de Tris-HCl 1M + 0,2 ml de EDTA 0,5 M. Llevar a 100 ml con agua destilada.

Ajustar pH a 7,5.

Autoclavar 15 min a 1 atm.

EDTA 0,5M - pH 8 (PM: 372,24)

18,612 g en 100 ml de agua destilada.

Ajustar a pH 8 con NaOH.

Autoclavar 15 min a 1 atm.

Tris-HCl 1M - pH 7,5

12,11 g de Trizma base en 80 ml de agua destilada.

Ajustar pH con 6 ml de HCl concentrado. Llevar a 100 ml con agua destilada.

Autoclavar 15 min a 1 atm.

O

78,78 g de Tris-HCl en 375 ml de agua destilada. Disolver con agitación.

Ajustar a 500 ml con agua destilada.

Autoclavar.

Nota: Si Ud. usa este protocolo, no olvide citarlo en la bibliografía de la siguiente manera: Alvarez, L.P.: Robles, C.A. - Protocolo de extracción de ADN para la detección de *Brucella melitensis* en tejidos. Comunicación Técnica, Area Producción Animal, INTA Bariloche, ISSN 1667-4006.