

**COMUNICACION TECNICA N°649**  
**AREA PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Protocolo de extracción de ADN para  
la detección de *Brucella ovis* en semen**

**Dra. Lucía Paula Alvarez**  
**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 ovis* en semen

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

**Protocolo 1: Extracción con fenol/cloroformo:** 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.

- 1- Agregar 1000 ul de TE a 500 ul de semen 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. Sui 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:** Adaptado de E.C.B. Silva, M.A. Pelinca, A.C. Acosta, D.M.F. Silva. 2014. Comparative study of DNA extraction methodologies from goat sperm and its effects on polymerase chain reaction analysis. Genet. Mol. Res. 13(3):6070-6078.

M.A. Gomes Filho<sup>3</sup> and M.M.P. Guerra<sup>1</sup>

1- Agregar 25  $\mu$ l de semen, 7.4  $\mu$ l de DTT 1M (Cf: 31 mM) y 5  $\mu$ l de proteinasa K 20 mg/ml a 150  $\mu$ l de Chelex 5 %.

2- Agitar en vortex 15 s.

3- Incubar a 37 °C durante 45 min.

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  $\mu$ l de proteinasa K 10 mg/ml (30U/mg) a 980  $\mu$ l 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. Protocolo de extracción de ADN para la detección de *Brucella ovis* en semen. Comunicación Técnica, Area Producción Animal, INTA Bariloche, ISSN 1667-4006.