

Termoestabilidad del ADN deshidratado de *Mycoplasma gallisepticum*

Thermal stability of dehydrated DNA from *Mycoplasma gallisepticum*

Arianna Duque-Ortiz, Damarys Relova-Vento, Anisleidys Perez-Castillo, Yaima Burger-Pulgarón, Evelyn Lobo-Rivero[✉]

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: La preservación y el almacenamiento del material genético son de vital interés, sobre todo para micoplasmas, ya que se conoce que los métodos de conservación tradicionales reportados para estas especies no son completamente efectivos. El diagnóstico de estos microorganismos se realiza por métodos clásicos y moleculares, entre estos últimos se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Uno de los puntos críticos de este ensayo lo constituye la estabilidad del ácido desoxirribonucleico (ADN). El objetivo de este trabajo fue evaluar la termoestabilidad de fragmentos amplificados por PCR, a partir de ADN deshidratado, del gen ARNr 16S para la detección de la clase *Mollicutes* y de los genes ARNr 16S y *mgc2* para el diagnóstico de *M. gallisepticum*. El producto de cada extracción de ADN se deshidrató y conservó a 4, 20 y 37°C por un periodo de 90 días. La estabilidad en el tiempo de las diferentes regiones de diagnóstico se evaluó mediante la amplificación con el uso del PCR. Los resultados mostraron que el ADN de *M. gallisepticum* es termoestable a temperatura ambiente por un periodo de hasta 90 días. Además, se comprobó que la pureza del ADN extraído no afecta la estabilidad del mismo cuando este se conserva deshidratado. Los resultados evidenciaron que conservar el ADN de *M. gallisepticum* deshidratado permite su almacenamiento y traslado sin altos costos y sin afectar la calidad de las muestras para el diagnóstico.

Palabras clave: *Mycoplasma gallisepticum*, ADN, diagnóstico, PCR, termoestabilidad.

ABSTRACT: The preservation and storage of genetic material are of vital interest especially for mycoplasmas, since it is known that the traditional conservation methods reported for these species are not completely effective. The diagnosis of these microorganisms is carried out by standard and molecular methods; among the latter is the Polymerase Chain Reaction test (PCR). One of the critical points of this test is the stability of the deoxyribonucleic acid (DNA). The aim of this work was to evaluate the thermal stability of fragments amplified by PCR, from dehydrated DNA, from the 16S rRNA gene for the detection of *Mollicutes* and from the 16S rRNA and *mgc2* genes for the diagnosis of *M. gallisepticum*, targets commonly used in diagnosis. The product of each extraction was dried and stored at 4, 20 and 37 °C for a period of 90 days. The stability over time of the different regions of the diagnosis was assessed by amplification using PCR. The results showed that *M. gallisepticum* DNA was heat stable at room temperature for a period of 90 days. Furthermore, it was found that the purity of the extracted DNA did not affect its stability when kept

[✉] Autor para correspondencia: Evelyn Lobo-Rivero. E-mail: elobo@censa.edu.cu

Recibido: 9/6/2017

Aceptado: 10/11/2017

dehydrated. The results showed that preserving the DNA of *M. gallisepticum* dehydrated allows storage and transfer without high costs and without affecting the quality of the samples for diagnosis.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, DNA, diagnostics, PCR, thermal stability.

INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de las investigaciones genómicas necesita de la conservación de un gran número de muestras biológicas, que incluyen ADN, ácido ribonucleico (ARN), proteínas, células y tejidos (1). La preservación y el almacenamiento de estos materiales son de interés para la comunidad científica en una amplia gama de campos y disciplinas (2). Sin embargo, es importante señalar que, al considerar el significado de los términos "preservación" y "almacenamiento", se debe recordar que las perspectivas pueden variar considerablemente (3). Por ejemplo, la muestra necesaria para probar un producto farmacéutico tendrá que ser estable durante unos años, mientras que las que se utilizan en la biología evolutiva se conservan durante millones de años (1), por lo que las aplicaciones posteriores en las que pueden emplearse estas muestras son muy diferentes y, por tanto, la calidad y la cantidad de ADN requerido variarán (4).

En el caso de los micoplasmas, estos presentan un genoma circular de doble cadena, con una talla promedio de 1500 kpb, que se caracteriza por su bajo contenido de Guanina-Citosina (G-C) el cual oscila entre el 24-40 mol/%, según las especies; por ejemplo, para *Mycoplasma gallisepticum* esta proporción es de 31 % (5). Los ribosomas de estos microorganismos presentan las características típicas de las eubacterias, con un coeficiente de sedimentación de 70 S, tres ARN ribosomal (ARNr 5S, 16S y 23S), alrededor de 50 proteínas que presentan un perfil físico-químico similar a las proteínas ribosómicas de los bacilos Gram positivos (6). Este comportamiento está dado por el alto grado de conservación que poseen los genes de las proteínas ribosómicas en el genoma de los

micoplasmas, sin importar la pequeña capacidad genética del mismo (7).

El diagnóstico de estos agentes se realiza por métodos clásicos y moleculares, donde la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) constituye, en estos momentos, un ensayo de rutina para la detección, identificación y caracterización de estos agentes (8). Los genes mejor caracterizados en los micoplasmas son los del ARNr, lo cual se explica por varias razones: 1) los genes del ARNr y sus productos están muy conservados, lo cual los convierte en excelentes marcadores para estudios de filogenia; 2) la selección y la amplificación de los mismos es relativamente fácil; 3) la amplificación de los genes ribosomales sirve como prueba de detección e identificación de los micoplasmas en muestras clínicas; 4) el hecho de que estos genes no se encuentren repetidos en el genoma permite su utilización para estudios de mecanismos de control de síntesis de los ARNr (9).

Los micoplasmas están constantemente expuestos a condiciones de estrés causadas por la defensa del hospedero, efectos ambientales y elevadas temperaturas; por lo tanto, es interesante saber cómo estos organismos con genomas reducidos conservan la estabilidad del mismo en condiciones adversas (7). Se conoce que el método tradicional para el almacenamiento del ADN, a largo plazo, es en congelación a temperatura de -20°C, -80°C, o en nitrógeno líquido, pero estos son costosos de operar y mantener, así como sensibles al tiempo (10).

Sin embargo, nuevas tecnologías ofrecen la oportunidad de almacenar el ADN a temperatura ambiente, lo que reduce la degradación del mismo asociado a las congelaciones (11) pues, aunque la

contaminación por nucleasas siempre debe evitarse al manipular el ADN, la degradación es quien representa la mayor amenaza para la conservación del mismo (12). Muchos factores influyen en la degradación del ADN genómico (13), por esta razón su conservación a temperatura ambiente y en la forma deshidratada empieza a ganar un creciente interés, con vistas al exponencial aumento en el número de muestras a conservar, a la disminución del costo de almacenamiento y a la facilidad de transportación (10,14).

En tal sentido, no se tienen referencias de estudios previos relacionados con la termoestabilidad, a temperatura ambiente, del ADN de micoplasmas y solo se conoce de trabajos realizados con el uso de papel de filtro FTA® (Flinders Technology Associates) para la inactivación y el almacenamiento del ADN y su posterior uso en la PCR (15). Teniendo en cuenta lo antes mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la termoestabilidad del ADN deshidratado de *M. gallisepticum* a través de la amplificación, por PCR, de fragmentos correspondientes a tres regiones dianas: un fragmento del ARNr16S específico para la clase *Mollicutes*, otro fragmento específico para esta especie y el gen *mcg2*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas en el estudio

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó un cultivo de la cepa de referencia de *M. gallisepticum* Rlow perteneciente al cepario de MYCOLAB con una concentración de 10^8 UFC/ml y 10 aislados de campo de *M. gallisepticum*, procedentes de la provincia Mayabeque, previamente caracterizados en el laboratorio. La concentración de los aislados osciló entre 10^6 y 10^7 UFC/ml. Estos microorganismos se cultivaron en medio de cultivo para el aislamiento de micoplasmas aviares reportado por Jordan (16).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por dos métodos, el primero mediante la utilización del juego comercial QIAamp DNA (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante y el segundo, reportado por Fernández y Chávez (17), que combina el choque térmico y la centrifugación. Para determinar la concentración del ADN se utilizó un Nanodrop Colibri Titer Tek Berthold, y se prepararon las muestras a una concentración de 100ng/ μ l, teniendo en cuenta lo descrito por Ley (18) y Marois *et al.* (19).

Preparación de las muestras de ADN deshidratado

El número de alícuotas se determinó de acuerdo al tiempo de muestreo, a cada temperatura, y considerando el análisis de tres réplicas en cada momento de análisis. El ADN se distribuyó en alícuotas de 20 μ l, a las cuales se les adicionó 53,6 μ l de solución de precipitación de ácido nucleico, según la metodología descrita por Relova (20); seguidamente se centrifugó a 12000g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente hasta total deshidratación. Una vez obtenido el ADN deshidratado se conservó a 4°C, 20°C y 37°C por 90 días y se chequeó su estabilidad por PCR cada 15 días.

Realización del PCR

Para la realización de cada ensayo se resuspendieron las muestras de ADN deshidratado en 20 μ l de agua libre de nucleasas. Para la amplificación de los fragmentos de los genes ARNr 16S de *Mollicutes*, ARNr 16S y *mcg2* de *M. gallisepticum* se siguieron los protocolos descritos por Van Kuppeveld (21), Lauerma (22) y Hnatow (23), respectivamente. La Tabla 1 relaciona la secuencia de los cebadores utilizados en estos ensayos.

TABLA 1. Cebadores utilizados en el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). / *Primers used in polymerase chain reaction test (PCR).*

Microorganismos	Cebadore	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Talla del amplicón	Referencias
Clase <i>Mollicutes</i>	GPO-3	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	270 pb	(21)
	MGSO	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'		
<i>M. gallisepticum</i>	mgc2 2F	5'-CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACAA-3'	236-302pb	(22)
<i>mgc2</i>	mgc2 2R	5'-TAAACCCACCTCCAGCTTTATTTCC-3'		
<i>M. gallisepticum</i>	MG14F	5'-GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC -3'	183pb	(23)
ARNr 16S	MG13R	5'-GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC-3'		

La corrida se realizó en gel de agarosa al 2 % a 100V y la visualización se realizó en un transiluminador Macro Vue (Farmacia) (24).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es importante señalar que la integridad del ADN es un factor esencial que determina la veracidad de los resultados obtenidos en los ensayos moleculares (25). Algunos de los factores que influyen en la pérdida de la integridad estructural, la cantidad y la calidad del mismo son: el método de extracción empleado, las condiciones de las soluciones de almacenamiento, las sucesivas congelaciones y descongelaciones, la temperatura, la humedad y el tiempo de almacenamiento, entre otros (26).

Durante el almacenamiento prolongado de muestras biológicas pueden ocurrir daños en el ADN, donde las secuencias más largas se fragmentan; este es el cambio físico más común que se asocia con la degradación del ADN (27). Esta situación impide que el ADN se amplifique e identifique de forma adecuada y da un resultado falso negativo (28). A esto se suman las dificultades existentes para garantizar las temperaturas adecuadas durante el traslado de muestras, lo que se convierte en un verdadero problema (11). Por esta razón, en la actualidad las tecnologías de almacenamiento del ADN, de forma deshidratada a temperatura ambiente, ganan un creciente interés (29).

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de las regiones de los genes ARNr 16S de la clase *Mollicutes*, ARNr 16S y *mgc2* de *Mycoplasma gallisepticum* mostraron que a

los 90 días del ensayo no existió degradación aparente del ADN y se pudo amplificar de manera exitosa por la técnica de PCR convencional (Figuras 1 y 2). Estos resultados coinciden con los reportados por Ivanova (4), quien probó que el pellet seco garantiza seguridad al ADN almacenado a temperatura ambiente.

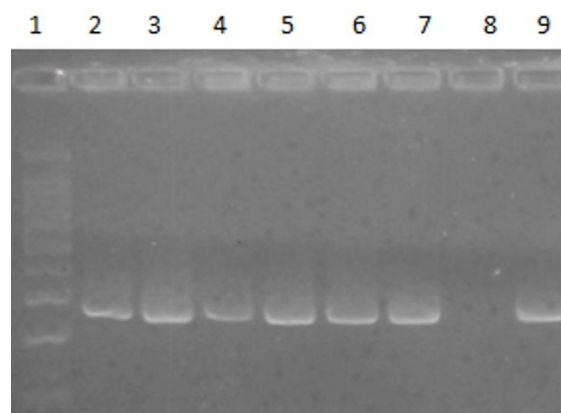


FIGURA 1. Electroforesis de los productos de PCR del gen *mgc2* de *M. gallisepticum* (MG) en gel de agarosa al 2 %. Línea 1: patrón de peso molecular de 100pb (Promega); Líneas 2-4: ADN de MG extraído por *shock* térmico conservado a 4, 20 y 37°C; Líneas 5-7: ADN de MG extraído por juego comercial Qiagen conservado a 4, 20 y 37°C; Línea 8: control negativo; Línea 9: control positivo. / Electrophoresis of PCR products of *mgc2* gene of *M. gallisepticum* (MG) at 2 % agarose gel. Line 1: 100 bp molecular weight marker (Promega); Lines 2-4: MG DNA extracted by thermal shock conserved at 4, 20 and 37°C; Lines 5-7: MG DNA extracted by the commercial kit Qiagen conserved at 4, 20 and 37°C; Line 8: negative control; Line 9: positive control.

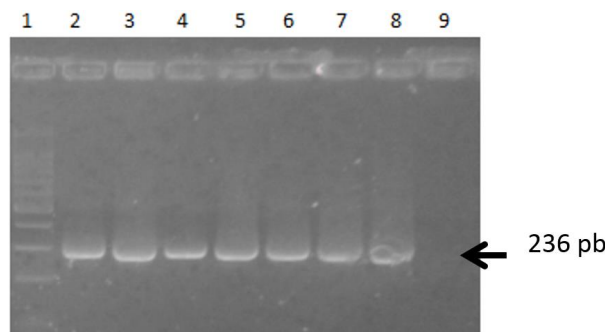


FIGURA 2. Electroforesis de los productos de PCR del gen ARNr16S de *Mollicutes* en gel de agarosa al 2 %. Línea 1: p atrón de peso molecular de 100pb (Promega); Líneas 2-4: ADN de MG extraído por *shock* térmico conservado a 4, 20 y 37°C; Líneas 5-7: ADN de MG extraído por juego comercial Qiagen conservado a 4, 20 y 37°C; Línea 8: control positivo; Línea 9: Control negativo)/ Electrophoresis of PCR products of ARNr16S gene of *Mollicutes* at 2% agarose gel. Line 1: 100 bp molecular weight marker (Promega); Lines 2-4: MG DNA extracted by thermal shock conserved at 4, 20 and 37°C; Lines 5-7: MG DNA extracted by the kit commercial Qiagen conserved at 4, 20 and 37°C; Line 8: *positive control*; Line 9: Negative control.

Por otra parte, se demuestra que a partir del ADN que se obtuvo con los dos métodos de extracción de ácidos nucleicos, se alcanzaron iguales resultados de amplificación en el estudio de estabilidad ([Figuras 1 y 2](#)). Esto se corresponde con lo reportado por otros autores ([31,32](#)), quienes describen que no es necesario tener un ADN puro, es decir, expuesto o libre de material celular para que se pueda detectar por esta técnica, sino que lo más importante es el empleo de cebadores que reconozcan una región específica del ADN de estos microorganismos. Esto ofrece la ventaja de tener como alternativa, para el diagnóstico de *M. gallisepticum*, un método rápido de extracción de ADN con la calidad requerida del material genético.

Además, se debe señalar que los ADN almacenados a -20 °C y los conservados en

ambiente anhidro a temperatura ambiente proporcionan recuperaciones de ADN similares ([Figuras 1 y 2](#)). Esto sugiere que la conservación del ADN deshidratado puede proteger las muestras de ADN con una eficacia similar a la del método de congelación tradicional, lo cual coincide con lo reportado por Wan ([30](#)), quien señala que esta tecnología es eficaz para la conservación de ADN a temperatura ambiente con un efecto protector más grande en muestras de ADN de menor concentración.

Por otra parte, varios estudios demuestran los efectos perjudiciales del calor, el oxígeno y el agua sobre la estabilidad del ADN ([26](#)). En tal sentido, trabajos previos ([25,28](#)) señalan que, además de reducir la movilidad molecular y la deshidratación, también eliminan el agua que puede participar en reacciones hidrolíticas y refieren varios métodos de eliminación de agua como el secado por pulverización, secado al aire o la liofilización. Esto puede ser otro elemento que sustente los resultados obtenidos en el trabajo sobre la termo estabilidad del ADN deshidratado.

El estudio de estabilidad de ambos genes evidenció robustez y permitió demostrar la estabilidad del ADN mediante este método de conservación por 90 días a las diferentes temperaturas evaluadas. Este resultado es de gran importancia, ya que posibilita un mayor rango de confianza en cuanto a la funcionalidad y seguridad del ensayo. A su vez, demuestra la conservación eficaz del material genético a partir de cultivos de cepas de referencias y de aislamientos de campo y su utilización como controles positivos en las diferentes técnicas moleculares empleadas en el diagnóstico de rutina.

De igual forma, se dispone de un método que elimina las dificultades en el intercambio de material genético entre laboratorios, garantiza la llegada de la muestra en óptimas condiciones y, con esto, la conservación del ADN, lo que garantiza la confiabilidad del resultado.

REFERENCIAS

1. The Molecular Genetics Company. DNA Storage and Quality. Oxford Gene Technology™. 2011. Disponible en: http://www.ogt.co.uk/resources/literature/403_dna_storage_and_quality.
2. Biomatrix. DNASTable, The Biostability Company. Disponible en: <http://www.biomatrix.com/dnastable.php>. (Consultado: 17 de Octubre 2013).
3. Nisoli C, Bishop AR. Thermomechanics of DNA: Theory of thermal stability under load. *Phys Rev Lett*. 2011;107:068102.
4. Ivanova NV. Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature. *Mol Ecol Resour*. 2013;13(5):890-898.
5. Demina IA, Serebryakova MV, Ladygina VG, Rogova MA, Zgoda VG, Korzhenevskiy DA, Govorun VM. Proteome of the bacterium *Mycoplasma gallisepticum*. *Biochemistry (Mosc)* 2009;74:165-174.
6. Fisunov GY, Alexeev DG, Bazaleev NA, Ladygina VG, Galyamina MA, et al. Core proteome of the minimal cell: comparative proteomics of three mollicute species. *PLoS One*. 2011;6:e21964.
7. Gorbachey A, Fisunov G, Izraelson M, Evsyutina D, Mazin P, et al. DNA repair in *Mycoplasma gallisepticum*. *BMC Genomics*. 2013;14:726.
8. Kamashev D, Oberto J, Serebryakova M, Gorbachev A, Zhukova Y, et al. *Mycoplasma gallisepticum* Produces a Histone-like Protein That Recognizes Base Mismatches in DNA. *Biochemistry*. 2011;50(40):8692-8702.
9. Maier T, Schmidt A, Güell M. Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. *Mol Syst*. 2011; 7:1-12.
10. Howlett SE, Castillo HS, Gioeni LJ, Robertson JM, Donfack J. Evaluation of DNA stable for DNA storage at ambient temperature. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;8(1):170-178. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.09.003.
11. Liu X, Li Q, Wang X, Zhou X, He X, et al. Evaluation of DNA/RNA shells for room temperature nucleic acids storage. *Biopreserv Biobank*. 2015;13(1):49-55. doi: 10.1089/bio.2014.0060.
12. Mee BC, Carroll P, Donatello S, Connolly E, Griffin M, et al. Maintaining Breast Cancer Specimen Integrity and Individual or Simultaneous Extraction of Quality DNA, RNA, and Proteins from Allprotect-Stabilized and Nonstabilized Tissue Samples. *Biopreserv Biobank*. 2011;9:389-398.
13. Santa Lucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95. 1998;1460-1465.
14. Kneibelsberger T, Steoger I. DNA Extraction, Preservation and Amplification. In: *DNA Barcodes Methods and Protocols* (eds Kress J & Erickson D). Humana Press, NY. 2012;311-338.
15. Moscoso H, Thayer SG, Hofacreb CL, Kleven SH. Inactivation, storage, and PCR detection of *Mycoplasma* on FTA filter paper. *Avian Dis*. 2004;48:841-850.
16. Jordan FTW: Recovery and identification of avian mycoplasmas. *Methods in Mycoplasmaology*. 1983;2:69-79.
17. Fernández C, Chávez Y. Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de micoplasmas en cultivos celulares. *Rev Salud Anim*. 1999;18(1):31-34.
18. Ley DH. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: *Diseases of Poultry*, Eleventh Edition, Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, eds. Iowa State University Press, Iowa, USA. 2003;722-744.
19. Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in

- environmental samples. *Avian Pathol.* 2002;31:163-168.
20. Relova D, Pérez L, Pereira C. Estabilidad de los genes M y HA comúnmente empleados en el diagnóstico del virus de influenza aviar. Tesis en opción al Grado de Master en Microbiología Veterinaria. CENSA. 2012.
 21. Van Kuppeveld F, Johansson K, Galama J, Kissing J, Bolske G, Van der Logt J, Melchers W. Detection of *Mycoplasma* Contamination in cell culture by *Mycoplasma* Group-Specific PCR. *Applied and Environmental Microbiol.* 1994;60(1):149-152.
 22. Hnатов LL, Keeler CL, Tessmer LL, Czymmek K, Dohms JE. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect Immun.* 1998;66:3436-3442.
 23. Lauerma LH. *Mycoplasma* PCR Assays. In: *Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases.* American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL. 1998;41-52.
 24. *Farmacopea Europea 8.0: Methods of analysis. Mycoplasmas. Appendix 2.6.7.* 2012
 25. Seelenfreund E, Robinson WA, Amato CM, Tan ACh, Kim J, Robinson SE. Long Term Storage of Dry versus Frozen RNA for Next Generation Molecular Studies. *Plos One.* 2014;9(11):e111827. doi:10.1371/journal.pone.0111827.
 26. Bonnet J, Colotte M, Coudy D, Couallier V, Portier J, Morin B, Tuffet S. Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage. *Nucleic Acids Research.* 2009;38(5):1531-1546. doi:10.1093/nar/gkp1060.
 27. Dualde JT, Sánchez A, Prats-van der Ham M, Gómez-Martín A, Paterna A, Corrales JC, de la Fe C, Contreras A, Amores J. Sensitivity of two methods to detect *Mycoplasma agalactiae* in goatmilk. *Vet J.* 2015; 68(1):21. doi:10.1186/s13620-015-0049.
 28. Lee SB, Clabaugh KC, Silva B, Odigie KO, Coble MD, et al. Assessing a novel room temperature DNA storage medium for forensic biological samples. *Forensic SciInt Genet.* 2012;6(1):31-40.
 29. Hernandez GE, Mondala TS, Steven R. Head. Assessing a novel room temperature RNA storage medium for compatibility in microarray gene expression analysis. *Biotechniques.* 2009;47(2): 667-670.
 30. Wan E, Akana M, Pons J, Chen J, Musone S, et al. Green technologies for room temperature nucleic acid storage. *Curr Issues Mol Biol.* 2009;(12):135-142.
 31. Barbeyrac B, Bebear C, Taylor-Robinson D. PCR: Preparation of DNA from clinical specimens. En: Tully JG, Razin S, editores. *Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasma.* Vol. II. New York: Academic Press Inc. 1996;61-74
 32. Amores J, Corrales JC, Martín AG, Sánchez A, Contreras A, de la Fe C. Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. capri in ear swabs taken from goats. *Vet Microbiol.* 2010;140(1-2):105-108.