

## Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de adn a partir de quesos frescos, semi-curados y curados de cabra

Canales, A.M.<sup>1</sup>®; Baquero, M.R.<sup>2</sup>; Delgado, J.V.<sup>1</sup>; y Martínez, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de genética. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

<sup>2</sup> Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Santa Cruz de Tenerife. España.

### PALABRAS CLAVE

Laboratorio.  
Maduraciones.  
Calidad.  
Concentración.  
Bajo costo.

### RESUMEN

El queso es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche total o parcialmente desnatada, coagulado total o parcialmente por la acción del cuajo, por un proceso de acidificación o por la adición de una enzima proteolítica (coagulación enzimática). Muchos quesos de cabra se elaboran con leche de una raza determinada y así queda recogido en el pliego de condiciones de las denominaciones de origen, aunque no se dispone de un sistema de trazabilidad genética para verificarlo. La trazabilidad genética se basa en la identificación de los animales y sus productos a través del estudio de secuencias específicas de ADN variables entre los individuos que permiten distinguir entre ellos. El futuro de las razas autóctonas pasa por el reconocimiento y valoración de sus productos. El disponer de un método para verificar la raza productora de la leche utilizada en la elaboración de los quesos sería una importante herramienta para detectar fraudes en estos productos protegidos vinculados a un genotipo determinado. Para realizar la trazabilidad genética es necesario analizar ADN con una suficiente concentración y pureza, pero los métodos de extracción de ADN disponibles hasta el momento producen un bajo rendimiento de ADN. El objetivo del presente estudio fue la estandarización de un método de extracción de ADN, que diera una buena calidad a partir de diferentes maduraciones de quesos de cabra. Se seleccionaron 15 muestras de queso de leche de cabra 100% con diferentes tipos de maduración: 5 quesos frescos, 5 quesos semicurados y 5 quesos curados. En el protocolo de extracción se utiliza un buffer de incubación de Edwards (Tris 10mM, pH = 8; EDTA20mM, 0,5% SDS, NaCl 2mM), 2-Mercaptoethanol-d6, una modificación del buffer de lisis de Tiocianato de Guanidina (NH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub> · HSCN) y columna de sílice. Terminado el proceso de extracción, se procede a la cuantificación utilizando 2 µL de ADN extraído, obteniendo la concentración de ADN y las ratios de absorbancia con los parámetros de 260/230 y 260/280. Con el método de extracción de ADN modificado y estandarizado se obtuvieron suficientes concentraciones de ADN, que van de 21,05 a 214,70 ng/µL. Se ha estandarizado un protocolo sencillo y barato para la extracción de ADN genómico a partir de muestras de quesos de cualquier tiempo de maduración que puede ser utilizado en posteriores análisis genómicos.

### Standardization of a simple protocol for dna extraction from fresh, semi-cured and cured goat cheeses

### SUMMARY

Cheese is the fresh or matured product, solid or semi-solid, obtained from totally or partially skimmed milk, coagulated totally or partially by the action of rennet, by an acidification process or by the addition of a proteolytic enzyme (enzymatic coagulation). Many goat cheeses are made with milk from a specific breed and this is stated in their specifications as part of the protected designations of origin, however, there is no traceability system for this factor. Genetic traceability is based on the identification of animals and their products through the study of specific DNA sequences that vary between individuals and allow them to be distinguished from one another. The future of native breeds depends on the recognition and valuation of their products. The availability of a method for identifying the breed that produces the milk used in the production of cheese would be an important tool for preventing fraud in these protected products linked to a specific genotype. The availability of a DNA extraction technique with which a sufficient concentration and purity can be obtained at a low cost, without much work effort in the laboratory and in a short time is of interest to many researchers and technicians. The objective of the present study was the standardization of a DNA extraction method, which would give a good quality from different ripening of goat cheeses. Fifteen samples of 100% goat milk cheese with different types of ripening were selected: 5 fresh cheeses, 5 semi-cured cheeses and 5 cured cheeses. In the extraction protocol, an Edwards incubation buffer (Tris 10mM, pH = 8; EDTA20mM, 0.5% SDS, NaCl 2mM), 2-Mercaptoethanol-d6, a modification of Guanidine Thiocyanate lysis buffer (NH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub> · HSCN) and silica column are used. After the extraction process was completed, quantification was performed using 2 µL of extracted DNA, obtaining DNA concentration and absorbance ratios with the parameters of 260/230 and 260/280. With the modified and standardized DNA extraction method, sufficient DNA concentrations were obtained, ranging from 21.05 to 214.70 ng/µL. A simple and inexpensive protocol has been standardized for the extraction of genomic DNA from cheese samples, with any type of maturity and which allows obtaining no impurities and high concentrations of DNA for genomic analysis.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Laboratory.  
Maturations.  
Quality.  
Concentration.  
Low cost.

### INFORMATION

Cronología del artículo.  
Recibido/Received: 11.04.2019  
Aceptado/Accepted: 10.04.2022  
On-line: 15.04.2022  
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:  
mcanales87@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

El queso es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de alguno de estos productos, coagulado total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados. La coagulación es el proceso en el que la leche pierde su estado líquido y se transforma en un gel por un proceso de acidificación (coagulación láctica), por la adición de una enzima proteolítica (coagulación enzimática), o una combinación de ambos procesos (coagulación mixta). Dependiendo del tipo de queso, después de la coagulación se produce el desuerado, moldeado, prensado y salado. Los quesos que no se consumen frescos se someten a un proceso de maduración, que puede durar varios años, que modifica las características físico-químicas y sensoriales del producto debido a los fenómenos de glicolisis, proteólisis y lipólisis de los componentes de la leche (Molina *et al.* 2006).

Muchos quesos de cabra se elaboran con leche de una raza determinada y así queda recogido en su pliego de condiciones como es el caso de las denominaciones de origen protegidas (DOP) o el logo 100% raza autóctona (Molina *et al.* 2006), no obstante, no se dispone de un sistema de trazabilidad genética para este factor. La trazabilidad genética se basa en la identificación de los animales y sus productos a través del estudio de secuencias específicas de ADN variables entre los individuos que permiten distinguir entre ellos (Molina *et al.* 2006). La característica más importante y estratégica del ADN reside en que permanece inalterable, no sólo durante la vida del animal, sino durante el procesamiento de los alimentos que del mismo se derivan. Un ejemplo de esta aplicación es la certificación de los productos del cerdo Ibérico en España utilizando las frecuencias alélicas obtenidas con un set informativo de marcadores de microsatélites (Molina *et al.* 2006).

El futuro de las razas autóctonas pasa por el reconocimiento y valoración de sus productos. El disponer de un método para evidenciar la raza productora de la leche utilizada en la elaboración de los quesos significaría una importante herramienta para evitar los fraudes en estos productos protegidos vinculados a un genotipo determinada.

El ADN que aparece en los quesos procede de las células somáticas de la leche que quedan retenidas en la matriz proteica que se forma durante el proceso de coagulación de la misma. Las micelas de caseína precipitan y flocculan formando una red en la que también queda retenida la grasa, vitaminas, minerales y parte del agua (Molina *et al.* 2006). Dependiendo del tipo de leche y tiempo de maduración el contenido en grasa de los quesos (Molina *et al.* 2006) es muy variable, desde quesos semidesnatados (< 10% grasa sobre el total de extracto seco) a extra grasos (> 60%).

La presencia de grasa dificulta la obtención de ADN de estos productos lácteos. Cuando se trabaja con queso, los ácidos nucleicos están contenidos dentro de la estructura compacta de la cuajada y la obtención de un lisado homogéneo puede presentar dificultades

debido a la imposibilidad o lentitud para romper las estructuras proteicas contenidas dentro de la materia biológica, resultando en un bajo rendimiento tanto en cantidad como en la pureza del ADN obtenido (Molina *et al.* 2006). En el queso, hay que sumar que el DNA que se extrae está en alguna medida degradado por la acción de las bacterias y por el ambiente ácido de la cuajada (Cortés & Zamorano 2015). Esta degradación lleva a la necesidad de extraer una cantidad relativamente elevada de muestra para garantizar la obtención de una adecuada concentración de ácidos nucleicos para compensar la presencia de moléculas degradadas (Osorio Cadavid *et al.* 2009). El disponer de una técnica de extracción del ADN con la que se obtenga una suficiente concentración, pureza, a un bajo costo, sin mucho esfuerzo de trabajo en el laboratorio y en poco tiempo resulta interesante para muchos investigadores y técnicos. En la actualidad existen varios métodos para la extracción de ADN a partir de productos lácteos, algunos de ellos son protocolos desarrollados por algunos laboratorios y otros son kits comerciales muy costosos como por ejemplo el kit comercial NucleoSpin® Food (Mafrá *et al.* 2008), extracción por fenol cloroformo (Sambrook & Russell 2006) y columna de sílice (Alvis-Arango 2015). Algunos de ellos presentan algunos inconvenientes, bien por su bajo rendimiento o por la deficiente calidad del ADN obtenido, ya que se busca una adecuada concentración y que no tenga inhibidores que puedan condicionar el éxito de los análisis futuros que se vayan a realizar con este ADN.

El objetivo del presente estudio es la estandarización de un método de extracción de ADN que diera una buena calidad, cantidad y sin inhibidores (sales, proteínas y pigmentos) del ADN (>~20ng/μl), a partir de muestras de 3 tiempos de maduración de quesos de cabra para su posterior utilización en análisis genómicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo la estandarización y extracción de ADN, se seleccionaron 15 muestras de queso de leche de cabra 100% con diferentes tiempos de maduración: 5 quesos frescos (7 días de afinado), 5 quesos semicurados (30 días) y 5 quesos curados (60 días).

El protocolo de extracción es una adaptación de los procedimientos de Gustafson (Gustafson *et al.* 1987), Sambrook (Sambrook, Fritsch & Maniatis 1989) y Matsunaga (Matsunaga *et al.* 1999). Se utiliza un buffer de incubación de Edwards (Tris 10mM, pH = 8; EDTA 20mM, 0,5% SDS, NaCl 2mM), 2-Mercaptoethanol-d<sub>6</sub>, y una modificación del buffer de lisis de Tiocianato de Guanidina (NH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub> · HSCN) y columna de sílice.

Elaboración del buffer de lisis binding *Tiocianato de Guanidina* (NH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub> · HSCN) modificado: *Tiocianato de Guanidina* 6M, Tris HCl (30mM), EDTA 20mM pH = 8, Triton X (5%) y Tween 20 (5%).

1.- Pesar todos los reactivos (**tabla I**), excepto el Triton X y Tween 20.

2.- Añadir 20 mL de agua.

**Tabla I: Reactivos utilizados para la elaboración de lisis binding de Tiocianato de Guanidina, cantidad y concentración final de cada uno de ellos (Reagents used for the preparation of binding lysis of Guanidine thiocyanate, quantity and final concentration of each of them).**

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Guanidine Thiocinate	70 gramos	6M
Tris HCL (sal acida)	236,4 gramos	30 mM
EDTA (sal disódica)	20 ml	20 mM
Triton X	5 gramos	5%
Tween 20	5 gramos	5%

3.- Esperar a que la solución este transparente, y añadir el Triton X, el Tween 20 y mezclar.

4.- Llevar la solución hasta 100 mL con agua.

5.- Agitar y reservar en un lugar fresco hasta su uso.

**PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE QUESO**

Preparación de las muestras para el lisado:

1.- Pesar 3 gramos de queso en un tubo falcón de 50 mL y triturar para favorecer la homogenización. Añadir 15 mL de buffer de incubación de Edwards. Añadir 100 µL de Proteinasa K (20mg/ml) y 200 µL de 2-Mercaptoethanol-d<sub>6</sub>.

2.- Homogenizar el queso con una varilla de cristal hasta obtener una solución lo más líquida posible. Agitar vigorosamente el tubo falcón con el queso ya homogeneizado e incubar en baño de agua o en una estufa de laboratorio toda la noche a 60 °C.

3.- Centrifugar 10 minutos a 14.000 revoluciones.

4.- Tras el centrifugado, se podrán visualizar 3 capas bien diferenciadas. En la primera capa se observará una línea blanca que es la grasa del queso. La segunda capa será una fase acuosa transparente o verdosa, dependiendo de la maduración del queso, y por último un pellet de proteínas. Manipular el tubo con cuidado para no mezclar las tres capas.

Extracción de ADN:

5.- Disponer 1 mL de la fase acuosa del lisado obtenido en el paso 4 en un tubo de 15 mL rompiendo con cuidado con una punta de pipeta la capa de grasa. Añadir 1 mL de buffer de lisis Tiocianato de Guanidina y 1 mL de Etanol al 96%.

6.- Agitar con un vórtex y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Filtrar en una columna de sílice 500 µL del lisado, centrifugar a 11.000 rpm de 20 a 30 segundos. Repetir este paso hasta filtrar los 3 mL del lisado.

7.- Finalizado el filtrado del paso 6, se realizan tres lavados con una solución de prelavado, compuesta por buffer de lisis Tiocianato de Guanidina y Etanol al 96% en una proporción 1:1. Añadir 700 µL de solución de prelavado y centrifugar a 11.000 rpm durante 1 minuto. Retirar el sobrenadante y repetir el prelavado otras dos veces.

8.- Realizar 3 lavados con una solución de lavado (Tris 1M pH = 7, NaCl 100 mM). Añadir 700 µL de solución de lavado y centrifugar a 11.000 rpm durante 1 minuto. Retirar el sobrenadante y repetir el lavado dos veces más.

9.- Secar la columna centrifugando a 11.000 rpm durante 3 minutos.

10.- Colocar la columna en un tubo limpio de 1,5 mL y añadir 100 µL de buffer TE LOW (5 ml de Tris 1M pH=8, 100 µL de EDTA 0.5 M, hasta 500 mL de agua) y centrifugar durante 1 minuto a 8.000 rpm.

11.- Descartar la columna y preservar el tubo de 1,5ml.

12.- Cuantificar el ADN extraído en un equipo Biodrop Touch (Dilabo S.A., Suministros para Laboratorios, España) utilizando 2 µL de ADN extraído, obteniendo la concentración de ADN en ng/µL y las ratios de absorbancia del ADN con los parámetros de 260/230 y 260/280.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con el método de extracción de ADN modificado, en el cual se realizaron 3 filtrados en columna de sílice, la modificación del Tiocianato de Guanidina y el uso de 2-Mercaptoethanol-d<sub>6</sub>, se obtuvieron suficientes concentraciones de ADN, que van de 21,05 a 214,70 ng/µL (tabla II), cantidades superiores a las obtenidas con los métodos originales (datos no

**Tabla II: Resultados obtenidos a partir de 15 muestras extraídas con columna y con el método modificado de Tiocianato de Guanidina y 2-Mercaptoethanol-d<sub>6</sub>. Ratios de absorbancia 260/230 y 260/280, concentración del ADN en ng/µL y volumen obtenido en µL (Results obtained from 15 samples extracted with column and with the modified method of Guanidine Thiocyanate and 2-Mercaptoethanol-d<sub>6</sub>. Absorbance ratios 260/230 and 260/280, DNA concentration in ng/µL and volume obtained in µL).**

Muestra	Ratios		ng/µL	volumen
	260/230	260/280		
Fresco	1,562	1,856	214,70	100µL
Fresco	1,666	1,835	90,08	100µL
Fresco	1,872	1,834	180,30	100µL
Fresco	1,515	1,898	40,17	100µL
Fresco	1,404	1,846	87,27	100µL
Semi-curado	1,833	1,879	74,81	100µL
Semi-curado	1,551	1,825	61,95	100µL
Semi-curado	1,456	1,871	34,38	100µL
Semi-curado	1,819	1,874	62,17	100µL
Semi-curado	1,570	1,910	21,05	100µL
Curado	1,458	1,814	133,7	100µL
Curado	1,763	1,859	101,7	100µL
Curado	1,587	1,780	50,17	100µL
Curado	1,583	1,840	41,62	100µL
Curado	1,558	1,776	36,63	100µL

mostrados). En la mayoría de las muestras seleccionadas se obtuvieron concentraciones de ADN altas, independientemente del tiempo de maduración del queso de partida. Para algunas muestras se obtuvieron valores de ratios 260/230 menores de los recomendados, aunque esto no supuso ningún inconveniente y se obtuvieron buenos resultados al analizar estas muestras con microsatélites y con el GoatSNP50 Illumina chip.

El 2-Mercaptoethanol-d<sub>6</sub> ayudó a la extracción del ADN en muestras de quesos, debido a que es un compuesto con la doble función de romper los puentes sulfuros de las proteínas cuaternarias, lo que acelera la digestión con Proteinasa K y prolongar la vida y la actividad de esta última porque previene la oxidación de la misma (Ishii, Bannai & Sugita 1981). La función del Tiocianato de Guanidina junto con los detergentes Tween 20 y Triton X, alteran las membranas celulares, desnaturalizan las proteínas y desactivan las nucleasas, estabilizando así el ADN y protegiéndolo (Sandoval Silva 2011).

## CONCLUSIONES

Se ha estandarizado un protocolo sencillo y barato para la extracción de ADN genómico a partir de muestras de quesos con cualquier tipo de curación que permite obtener ADN a una concentración y pureza suficiente para ser utilizado para el genotipado de marcadores moleculares microsatélites o SNPs.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó con financiación del proyecto RTA 2014-00047-00-00.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvis-Arango, AA 2015, 'Evaluación de los métodos fenol-cloroformo y columnas de sílice para extracción de ADN a partir de tejido óseo', *Colombia Forense*, vol. 2, no. 1, pp. 69-74.
- Cortés, M & Zamorano, S 2015, 'Conductas asociadas a la elaboración de queso de cabra artesanal en la Comunidad Agrícola Cerro Blanco y sus alrededores Comuna de Ovalle, Chile', *Seminario de Título para optar al Título de Ingeniero de Ejecución en Prevención de Riesgos*. Campus Santiago, Universidad de Los Lagos, Santiago, Chile.
- Gustafson, S, Proper, JA, Bowie, EW & Sommer, SS 1987, 'Parameters affecting the yield of DNA from human blood', *Analytical biochemistry*, vol. 165, no. 2, pp. 294-9.
- Ishii, T, Bannai, S & Sugita, Y 1981, 'Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol in vitro. Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 256, no. 23, pp. 12387-92.
- Mafra, I, Silva, SA, Moreira, EJ, da Silva, CSF, Beatriz, M & Oliveira, P 2008, 'Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products', *Food Control*, vol. 19, no. 12, pp. 1183-90.
- Matsunaga, T, Chikuni, K, Tanabe, R, Muroya, S, Shibata, K, Yamada, J & Shinmura, Y 1999, 'A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay', *Meat science*, vol. 51, no. 2, pp. 143-8.
- Molina, NB, Polverino, D, Minvielle, MC, Apezteguía, M, Aguilar, M & Basualdo, JA 2006, 'Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*', *Parasitología latinoamericana*, vol. 61, no. 3-4, pp. 133-7.
- Osorio Cadavid, E, Ramírez, M, López, WA & Mambuscay, LA 2009, 'Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras', *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 11, no. 1, pp. 125-31.
- Sambrook, J, Fritsch, EF & Maniatis, T 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press.
- Sambrook, J & Russell, DW 2006, 'Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform', *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2006, no. 1, p. pdb.prot4455.
- Sandoval Silva, DA 2011, 'Estudio de la expresión y localización subcelular del transportador de vitamina C (SVCT2) en fenómenos de plasticidad del músculo esquelético'.