COMPARACIÓN DE CUATRO KITS COMERCIALES DE EXTRACCIÓN DE ARN BACTERIANO A PARTIR DE MUESTRAS DE LECHE

Secchi, S. [2], Serrano, A. [1], García-Nogales, P. [2], Gutiérrez, S. [3] y Arís, A. [1]
[1] Unidad de Rumiantes, IRTA-Torre Marimón, Caldes de Montbuí, España. [2] AROMICS, Parque Científico, Barcelona, España [3] CRIC; Travessera de Gracia, Barcelona, España.
anna.aris@irta.es

INTRODUCCIÓN

Una identificación rápida de microorganismos en leche puede permitir un control de calidad de los productos, posibilitar un diagnóstico temprano de enfermedades, así como evitar la extensión incontrolada de contaminaciones indeseadas. La detección de bacterias en leche, por lo tanto, ha de ser una técnica idealmente sensible, específica y con capacidad de analizar gran cantidad de muestras en el menor tiempo posible, requerimientos todos asociados a técnicas de diagnóstico molecular.

El desarrollo de métodos de identificación bacteriana basados en la extracción de ácidos nucleicos e identificación de secuencias diana de ADN o ARN, incrementa la especificidad y sensibilidad del diagnóstico en un tiempo reducido (Mothershed y Whitney, 2006). La elección del tipo de ácido nucleico diana influencia la complejidad del tratamiento de la muestra. Las moléculas de ARN son menos estables que el ADN debido a que son más sensibles a hidrólisis. Sin embargo, el ARN representa el estado metabólico celular (i.e. identificación de contaminantes activos en la leche) y el número de moléculas puede variar, una característica importante cuando hay una baja concentración bacteriana y no se desea realizar un pre-tratamiento de enriquecimiento de la muestra.

Actualmente los procedimientos comerciales de extracción y aislamiento de moléculas de ARN se basan en dos métodos: una extracción por adsorción en fase sólida de sílica o una extracción mediante agentes caotrópicos (guanidina-tiocianato) y separación en fase acuosa mediante saturación con fenol-cloroformo.

En este estudio se comparan cuatro métodos comerciales de extracción de ARN a partir de muestras bacterianas obtenidas de un en medio de cultivo con o sin leche. Dos de los métodos están basados en la extracción tipo silica: RNeasy Protect Bacteria kit (Qiagen) y el NucliSENS miniMAG (Biomerieux) y los métodos TRIzol (Invitrogen) y RiboPURE Bacteria kit (Ambion) basados en una extracción guanidina fenol-cloroformo. Se compara la eficiencia de cada kit en términos de rendimiento y pureza del ARN obtenido a partir de dos especies bacterianas, una Gram negativa, *Escherichia coli*, y una Gram positiva, *Staphylococcus aureus*. Asimismo, se describe la velocidad y otras características a tener en cuenta a la hora de escoger el método más adecuado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron las cepas comerciales de *Escherichia coli* CGSC 5073 y *Staphylococcus aureus* CECT240 y los medios de cultivo Luria Bertrani (LB) y Nutrient Broth(NB) para su crecimiento, respectivamente. Se realizaron pre-inóculos de 5ml y cultivos de 30ml, a 37ºC y 200rpm. El crecimiento se siguió mediante densidad óptica a 550nm (DO_{550}) hasta alcanzar una DO_{550}=0,5. Este valor se utilizó como referencia para la extracción de ARN. El número de células correspondiente a una DO_{550}=0,5 se verificó mediante recuento de células viables. Se realizaron diluciones seriadas en NaCl 0,9% de 10^{-5}, 10^{-6} y 10^{-7} por duplicado y se sembraron 100µl de cada una por duplicado en placas de agar de los respectivos medios. El recuento se expresó como unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) descartándose aquellas placas con un número de colonias superior a 300 o inferior a 15.

Para la extracción de ARN, muestras de 1ml de cultivo (DO_{550}=0,5) se centrifugaron por triplicado a 6000xg a temperatura ambiente (TA). Se descartó el sobrenadante y los pellets se guardaron a -20ºC hasta su utilización. Para la extracción con leche UHT, los pellets celulares se resuspendieron primero en 1ml de leche UHT entera a 37ºC y se centrifugaron en las mismas condiciones mencionadas.

La extracción de ARN se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante en todos los kits. En el caso de los kits NucliSENS MinMAG (Biomerieux) y TRIzol Max Bacterial (Invitrogen) se introdujo un paso de disrupción celular mediante bead-beater. Este paso común consistió en la resuspensión del pellet celular en 300μl de agua RNasa-free y 2ml de reactivo NucliSENS lysis buffer o TRIzol. La suspensión se mezcló con bolas de vidrio de 0,1mm, en un rango de 26-36 mg por ml de muestra a tratar. Se realizaron dos ciclos de disrupción de 2 min 30seg, con un minuto en hielo entre ciclos. Las muestras se centrifugaron a 16000xg durante 1 minuto a TA. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se prosiguió según instrucciones del fabricante.
El ARN fue cuantificado mediante densidad óptica a 260nm (DO_{260}). La pureza e integridad se analizó mediante ExperionTM Automated Electrophoresis System (Bio-Rad) utilizando Experion HighSens chips.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comparar los diferentes kits de extracción de ARN se fijó la cantidad de células a partir de la cual realizar cada extracción. Para ello, se escogió como referencia el punto de crecimiento exponencial de *E. coli* de DO_{550}= 0.5 y se verificó el mismo comportamiento para *S. aureus*. Se determinó la cantidad de células viables en este punto para ambas cepas obteniéndose una correspondencia final de $1{,}4x10^8$ and $2{,}8x10^8$ cfu/ml para *E. coli* y S. *aureus* respectivamente. Para evitar variabilidad en los cultivos, se realizó un único crecimiento de cada cepa a partir del cual se recogieron muestras de 1ml a DO_{550}= 0.5 por triplicado para realizar la extracción de ARN con cada kit. La Figura 1 resume la cantidad total de ARN obtenido con cada kit para cada cepa en presencia o no de leche UHT. Se observó que el kit de Qiagen reportó los mejores valores de rendimiento de obtención de ARN con *E. coli* y estuvo entre los mejores para *S. aureus*. El rendimiento de recuperación fue mayor para *E. coli* que para *S. aureus* partiendo, sin embargo, de la misma cantidad de células. Este hecho podría estar asociado a que generalmente estos kits comerciales están desarrollados y optimizados utilizando una cepa bacteriana en particular, muy probablemente *E. coli*. Igualmente, a pesar de haber introducido un paso común de disrupción celular mecánica, la diferente composición de pared entre ambas cepas, junto con la diferente morfología celular, podría explicar una peor disrupción del coco Gram positivo *S. aureus* (Geciova et al., 2002). Por otro lado, con el kit de Ambion se obtuvo la menor cantidad de ARN en ambas especies bacterianas. Hay que destacar que el análisis de la varianza por ANOVA indicó que no se encontraron diferencias significativas entre las extracciones realizadas a partir de medio de cultivo o en presencia de leche con ningún kit ni en ninguna de las dos cepas.
Posteriormente, se determinó la integridad de las moléculas de ARN obtenidas mediante el sistema de electroforesis automatizada Experion de Bio-Rad. Básicamente, una mayor calidad de ARN está relacionada con una ausencia de contaminantes u otros picos que no sean los correspondientes al 16SrARN o el 23SARN. El análisis de las muestras indicó una mayor integridad del ARN en las muestras obtenidas con el kit de Qiagen. Con otros kits, se observó presencia de contaminantes excepto con el kit de Ambion con el que no se observaron picos debido a la poca cantidad de ARN extraído.
Por último, los requerimientos de material y equipo necesarios para la utilización del kit de Qiagen están entre los más limitados (en comparación con los otros kits), lo cual también es un importante punto a destacar. Este kit permite la extracción de unas 6 muestras a la hora, no utiliza compuestos nocivos y no presenta puntos críticos en su desarrollo, es fácil de transportar y potencialmente automatizable. Debido a sus características y a los resultados obtenidos, tanto a nivel de calidad como de cantidad de ARN para ambas cepas bacterianas, concluimos que Qiagen es el mejor kit comercial de los cuatro mencionados en este estudio para la extracción en presencia de leche de moléculas íntegras de ARN bacteriológico bajo las condiciones aquí descritas.

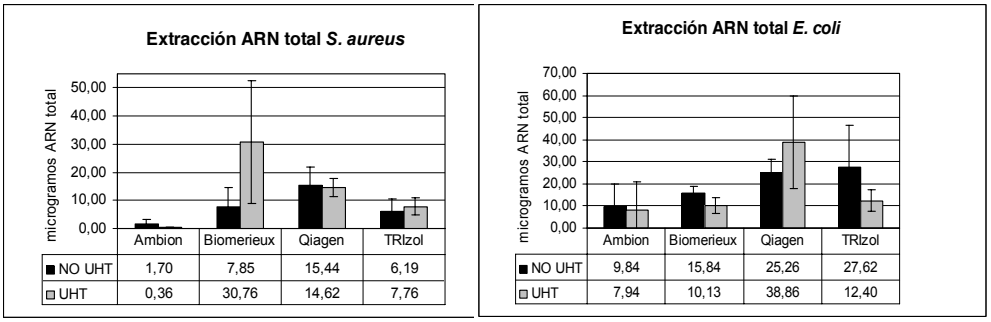


Figura 1. *Cantidad total de ARN (μg) obtenidos con cada kit para cada microorganismo, en presencia (UHT) o ausencia (NO UHT) de leche.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Mothershed, E.A. & Whitney, A.M. 2006. Clin. Chim. Acta 363(1-2):206-20. • Geciova, J., Bury, D. & Jelen P. 2002. Inter. Dairy J. 12: 541-553

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la EU-FP6: a través del proyecto Pathomilk. "Pathomilk is the acronym for an EU-funded Framework VI project to create a rapid and cost effective tool for multi-pathogen detection in milk. The Pathomilk consortium consists of 22 partners comprising research establishments, SME's, farming associations and practical milk producers."

COMPARISON OF FOUR COMMERCIALLY AVAILABLE RNA EXTRACTION METHODS FOR EFFECTIVE RNA ISOLATION FROM MILK

ABSTRACT: Detection of target microorganisms in milk or dairy products is of significant importance in terms of revealing contaminations, possible early disease diagnostics, quality control of milk, as well as prevention of further spread of undesirable microorganisms trough the herd, farm or dairy industry.
Nucleic-acid based bacterial identification methods are extremely useful due to their specificity and sensitivity and usually they are related to molecular high-throughput techniques. However, they require an optimal purified sample preparation specially when applied to milk or food products.
In this study we describe the comparison among four commercially available RNA extraction kits for the purification of bacterial RNA isolated from milk samples. Two kits are based in silica-based extraction, the RNeasy protect bacteria kit (Qiagen) and the NucliSENS miniMAG (Biomeieux), and the other two in the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Trizol (invitrogen) and RiboPUre-bacteria kit (Ambion). We compared their efficiency and purity in RNA extraction and recovery from two bacterial species, a Gram negative *Escherichia coli* and a Gram positive *Staphylococcus aureus*, in culture broth or in UHT milk. We also describe their speed and other features to take into account. We conclude that Qiagen is the most suited kit under the experimental conditions of this study.
Keywords: *RNA, extraction, milk, bacterial*