

Establishment and standardization of phytopathogen DNA sonication conditions and electrophoretic evaluation

Establecimiento y estandarización de condiciones de sonicación de ADN fitopatógeno y evaluación electroforética

Raúl Antonio García-Martínez¹, Diana Guadalupe Hernández-Olalde¹, Fabián Martínez-Esquivel¹, Angela María Chapa-Oliver^{1*}, Laura Mejía Teniente^{1**}

¹Programa de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, Av. Mutualismo Esq. Prolongación Río Lerma S/N, Celaya, Gto. C.P. 38060, México.

*am.chapa@ugto.mx¹

**laura.mejia@ugto.mx¹

Resumen

La sonicación es una técnica que utiliza ondas ultrasónicas para agitar partículas en un medio, esta agitación tiene varios efectos, como el homogeneizar, desgasificar, lisis celular y fragmentación de ácidos nucleicos. Lo genera a través de la creación e implosión instantánea de burbujas las cuales se van dispersando a través de la matriz del medio, donde la cantidad y la energía con la que implosionan dependerá de las condiciones de operación. En la presente investigación se generó una propuesta de estandarización de condiciones de operación para la fragmentación de ADN, utilizando un sonicador de sonda sumergible Fisher brand®, donde para estandarizar dichas condiciones se partió de una muestra de ADN de un virus fitopatógeno. Dicho ADN se encuentra inserto en un plásmido (pBluescript) que contiene solo el componente A del virus huasteco de la vena amarilla (PHYVV-A) donde se extrajo y se concentró para poder obtener una concentración constante de 1µg/mL de la cual se obtuvieron diferentes alícuotas para estandarizar el proceso, dichas variaciones recaen ahora en las variaciones de volumen operacional (100, 200, 300, 400 µL) y a los diferentes porcentajes de amplitud (40, 50 y 60) que emite el sonicador dando así un protocolo estandarizado para obtener fragmentos de hasta 100pb dando así una opción frente a otras metodologías de fragmentación química o digestión enzimática. Los resultados muestran un rango de fragmentos de 1000 a 100 pb en volúmenes intermedios (200 y 300 µL) con una amplitud de 40% dada por el sonicador.

Palabras clave: sonicación; fragmentación; virus; ADN plasmídico.

Introducción

La sonicación también conocida como ultrasonificación, es la aplicación de vibraciones mecánicas en frecuencias altas a intensidades altas (Matula & Maxwell, 2018). Donde sí es aplicada a un medio líquido genera cambios fisicoquímicos en la matriz de dicho medio promoviendo la formación de vapor del medio, el cual se encapsula en la matriz líquida generando una microburbuja instantánea que, al alcanzar un corto tiempo de formación, implosiona, liberando una gran cantidad de energía en forma de calor y presión local elevada (Gutiérrez-Mosquera et al., 2019). A este proceso que implica la formación e implosión de la microburbuja se le conoce como cavitación ultrasónica. Dicho efecto es ampliamente utilizado para generar turbulencias y esfuerzo cortante en la matriz del medio, facilitando cambios constitucionales como la homogenización de soluciones (Vivek & Kim, 2000), desgasificación (Gogate & Bhosale, 2013), lisis celular (González, 2023) y fragmentación de ácidos nucleicos (Thompson et al., 2008; Larginho et al. 2010).

La fragmentación de cadenas de ADN por ultrasonificación es un método bastante rápido para obtener segmentos cortos de longitud en pares de bases, ideales para la conformación de exolicitores de origen viral, los cuales pueden ser secciones codificantes de la cápside o proteínas de anclaje viral (Sánchez, 2023). Los cuales al estar en contacto con una planta darán paso a la generación de inmunización mediante la resistencia adquirida ya que los virus de carácter fitopatógeno causan pérdidas en cuanto a producción y disminución de estética de la porción vegetal de interés comercial de la planta madre debido al síndrome propio de cada relación virus-hospedero que presentan. Entre estos virus, se encuentra el género Begomovirus que se caracteriza por ser de gran patogenicidad en cultivos importantes para la alimentación

(Velarde-Félix et. al., 2018). Además, este género perteneciente a la familia Geminiviridae (Hernández et. al., 2018), tiene como característica la forma de su cápside, que es en forma de dos icosaedros (componente A y B) fusionados (Böttcher et al., 2004) donde cada componente desempeña funciones distintas, es decir, el componente A alberga secuencias necesarias para la replicación del virus y para la generación de la cápside. Por otra parte, el componente B contiene secuencias necesarias para el movimiento viral a través de las células del hospedero. Dentro de la familia Geminiviridae, encontramos al virus huasteco de la vena amarilla (PHYVV), que es conocido por sus síntomas de enchinamiento de las hojas y el característico color amarillo de las nervaduras y venas foliares de las solanáceas (Garzón et al., 2002). Ese virus es dispersado mediante vectores como lo es la mosquita blanca (*Bemisia tabaco*) la cual es una especie cosmopolita y además tiene amplio rango de especies de plantas integradas a su dieta, por lo que funge como vector de enfermedades virales (Ramesh et al., 2023).

De acuerdo con el contexto anterior, el objetivo de la presente investigación fue generar un protocolo para la fragmentación de ADN plasmídico del componente A del PHYVV, utilizando un sonicador de sonda sumergible Fisher Brand® y determinando las condiciones operacionales de amplitud, volumen de muestra y tiempo de sonicación.

Materiales y métodos

Material biológico

Como material biológico se partió de un cultivo inicial de *Escherichia coli* la cual posee el plásmido Bluescript con la copia dimérica del componente A del virus PHYVV-A (pBS+PHYVV-A). Las clonas fueron *E. coli* fueron cultivadas en 20 mL medio LB (Luria Bertani) los cuales fueron inoculados con 20 µL del cultivo inicial y a los cuales se les adicionó 20 µL de ampicilina [100 mg/mL]. Finalmente se incubó por 16 horas a 170 rpm y con una temperatura de 37°C.

Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico del pBS+PHYVV-A se realizó por el método de lisis alcalina, para lo cual, se pasaron alícuotas del cultivo de las clonas de *E. coli* que contienen al pBS+PHYVV-A a tubos cónicos de 1.4 mL, permitiendo obtener una media de 35 tubos por cultivo. Posteriormente se llevaron a centrifugación a 13,000 rpm por 5 minutos para separar por decantación posterior, las células del medio. Posteriormente, se resuspendió mediante vórtex el paquete celular en 100 µL de la solución I que compuesta por tris-glucosa-EDTA. Siguiendo con el proceso, se llevó a cabo la lisis celular con 200 µL de la solución II, compuesta con hidróxido de sodio y dodecil sulfato de sodio, con la finalidad de lisar las membranas lipídicas y exponer el contenido celular, mezclando suavemente por inversión y se sometieron a incubación durante 5 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, se neutralizó la lisis alcalina con 150 µL la solución de acetato de potasio 5M, de igual manera se mezcló por inversión y se incubó por 5 minutos. Finalizando el tiempo de espera, los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos transfiriendo el sobrenadante (el cual contiene el plásmido) a un tubo nuevo, del cual se obtuvo un aproximado de 400 µL. Posteriormente, se precipitó agregando 800 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se dejó reposar a -20°C durante 30 minutos, esto con la finalidad de mejorar la precipitación y obtener un mayor rendimiento. Pasados los 30 minutos, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 100 µL de etanol al 70%, y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar durante 30 minutos. Por último, la pastilla obtenida se re suspendió en 30 µL de agua estéril.

Una vez finalizado esta parte del procedimiento, se sometió a una cuantificación mediante el uso de un nanodrop, para lo cual, se tomó 1 µL de cada muestra para su lectura, y a su vez, para analizar la calidad de los plásmidos, se realizó electroforesis con geles de agarosa al 1%, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio, en el cual se cargó 1 µL de muestra.

Concentración de plásmidos

El ADN plasmídico se concentró mediante precipitación con etanol y acetato de sodio. Para ello, se seleccionaron las muestras que presentaron una mejor concentración y nitidez de banda en el gel de agarosa.

Estas se recolectaron en un solo tubo y se obtuvieron en total 200µL de muestra, a los cuales se les agregó 20 µL de acetato de sodio y 400 µL de etanol al 96%. Se dejó reposar durante 30 minutos a -20°C y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 750 µL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 10 min. Este paso se repitió una vez más para asegurar obtener una mayor pureza en la concentración del plásmido. Finalmente, después de descartar el sobrenadante se dejó evaporar el etanol dejando secar el tubo a temperatura ambiente por 30 minutos. La pastilla se resuspendió con 50 µL de agua con ribonucleasas. Una vez obtenido el concentrado, este se cuantificó y corrió en un gel de agarosa al 1.2%. Este concentrado fue el utilizado para realizar la sonicación.

Digestión

Para la parte de digestión, se utilizó 1 µg/µL del ADN plasmídico y fue digerido con la enzima Hind III durante 20 minutos a 37°C, una vez digeridas se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. La digestión libera dos fragmentos de 2.6 Kb correspondientes al dímero de PHYVV-A contenido en el pBS, y otro fragmento de 2.9 Kb correspondiente al pBS. Esta parte se realizó para comprobar la existencia del plásmido de interés mencionado en este protocolo.

Diseño experimental

Para la sección de la sonicación y comprobar las condiciones estándar de operación del sonicador, se optó por un diseño factorial 2x2 donde se observó la eficiencia de la fragmentación en gel de agarosa al 1.5% a través de electroforesis. Las condiciones que se evaluaron fueron variaciones de volumen de la muestra, porcentaje de amplitud del sonicador y ciclos de sonicación (Tabla 1).

Sonicación

La sonicación de ADN plasmídico del pBS+PHYVV-A se llevó a cabo en un sonicador Fisherbrand™. Para el proceso de sonicación, la sonda del sonicador, se sumergió en los tubos Eppendorf que contenían diferentes volúmenes (Tabla 1) de la muestra, conservando en todos ellos una misma concentración de ADN plasmídico [1 µg/mL]. Para lo anterior, previamente se realizaron diluciones de la extracción plasmídica, para obtener la concentración de trabajo.

Tabla 1. Relación de tratamientos para la sonicación

Tubo	Volumen (µL)	Amplitud (%)	Tiempo (min)	Pulso (encendido/apagado)	Ciclos	Tiempo total
1	100	40	1	20/30	3	2
2	100	50	1	20/30	3	2
3	200	40	1	20/30	3	2
4	200	50	1	20/30	3	2
5	300	40	1	20/30	3	2
6	300	50	1	20/30	3	2
7	400	40	1	20/30	3	2
8	400	50	1	20/30	3	2
9	400	60	1	20/30	3	2

Nota: En la columna de pulso la relación establece en 20 segundos encendido y 30 segundos apagado

Resultados

Extracción de ADN plasmídico

La calidad de la extracción de ADN plasmídico se observa en la Fig. 1, la cual muestra una corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Cabe mencionar que, para los tratamientos de sonicación, es necesario contar con suficiente ADN plasmídico de partida y de calidad aceptable. De las corridas de electroforesis, se seleccionaron 10 muestras (Tabla 2), considerando las de mayor concentración obtenida por nanodrop, así como la relación 260/280 que definen la pureza de la extracción, la cual se encuentra en valores entre 1.8-2.0; así como el gel de agarosa que mostraron una banda nítida a 8100 pb (Fig. 1).

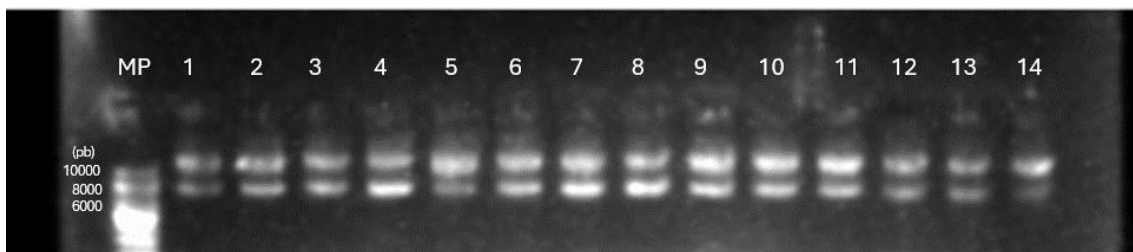


Figura 1. Geles de electroforesis A) Electroforesis con las 10 muestras seleccionadas (1-10) para concentrar. Nota: marcador de peso molecular (MP).

Tabla 2. Selección de muestras de las extracciones

Extracción	Concentración (ng/μL)
1	3725
2	4895
3	11230
4	5790
5	5004
6	5073
7	9343
8	10308
9	10400

Concentración del ADN plasmídico

Las 10 extracciones seleccionadas se recolectaron en un solo tubo y se concentraron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Se obtuvieron 50 microlitros a una concentración total de 9.989 μg/mL. Una vez concentrada, se realizó la electroforesis de (Fig. 2). Adicionalmente, se llevó a cabo la digestión del ADN

plasmídico con la enzima Hind III (Fig. 3). En la Figura se observa la banda correspondiente al componente A del PHYVV a 26031 pb y del plásmido pBluescript en el carril de las digestiones.

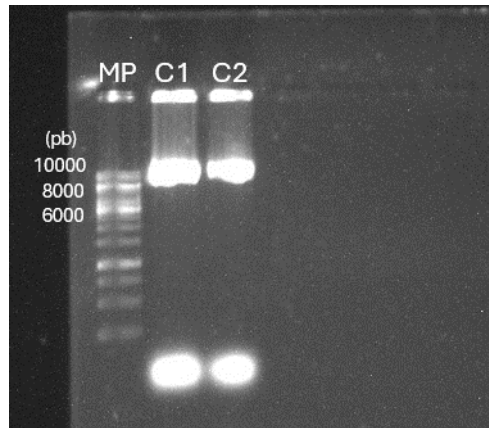


Figura 2. Gel de agarosa al 1%, Marcador de peso (MP), concentraciones (C1 y C2).

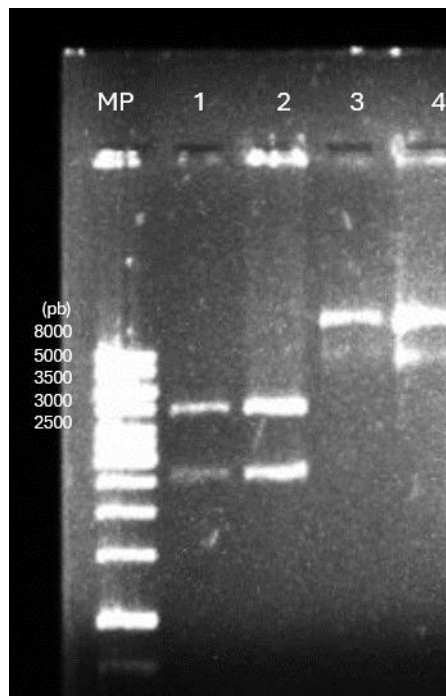


Figura 3. Gel de agarosa al 1.5%, Marcador de peso (MP), Digestión con Hind III (1 y 2) y Diluciones de partida (3 y 4).
 Nota: Las diluciones se llevaron a concentración de 1 µg/mL.

Estandarización de las condiciones de sonicación de ADN plasmídico

En la Fig. 3 se observa que la relación volumen-amplitud, es determinante para el proceso de fragmentación y lograr los fragmentos con un tamaño en pares de bases deseados. En los geles de electroforesis de la misma figura se ven los barridos característicos de una correcta fragmentación por sonicación del ADN

plasmídico. Esto es, en la Fig. 3 panel A, se observa que la relación volumen muestra/amplitud de sonicación (100 μ L/40%) genera barridos de fragmentos de 750 a 100 pb, con la condición 100 μ L/50% se obtienen fragmentos de 500 a 100 pb, en la condición 200 μ L-40% amplitud se obtienen fragmentos que van desde las 1500 pb hasta 100 pb y con la condición 200 μ L-50% amplitud se obtienen fragmentos de 1000 pb a 100 pb. En el panel B de la Fig. 3 se continuó con la evaluación de cambio de volumen y se mantuvieron dos amplitudes de fragmentación, la de 40 % y 50%. Así mismo, se evaluó la condición de 60% amplitud y se mantuvo el volumen de muestra a 400 μ L. En este panel se observa que esta última condición, no modifica la fragmentación. Por lo que el utilizar amplitudes mayores solo comprometería la integridad de la muestra debido al calor generado. Cabe destacar que las condiciones de 200 y 300 μ L con amplitud de 40% se obtienen barridos más uniformes que van desde la longitud de 1000 pb hasta 100 pb que en otras pruebas con mayor amplitud donde parte del barrido no alcanzan a superar los 750 pb de longitud. Con los resultados del gel se generó una tabla de longitudes aproximadas de fragmentos con base en los diferentes volúmenes y amplitudes evaluadas (Tabla 3).

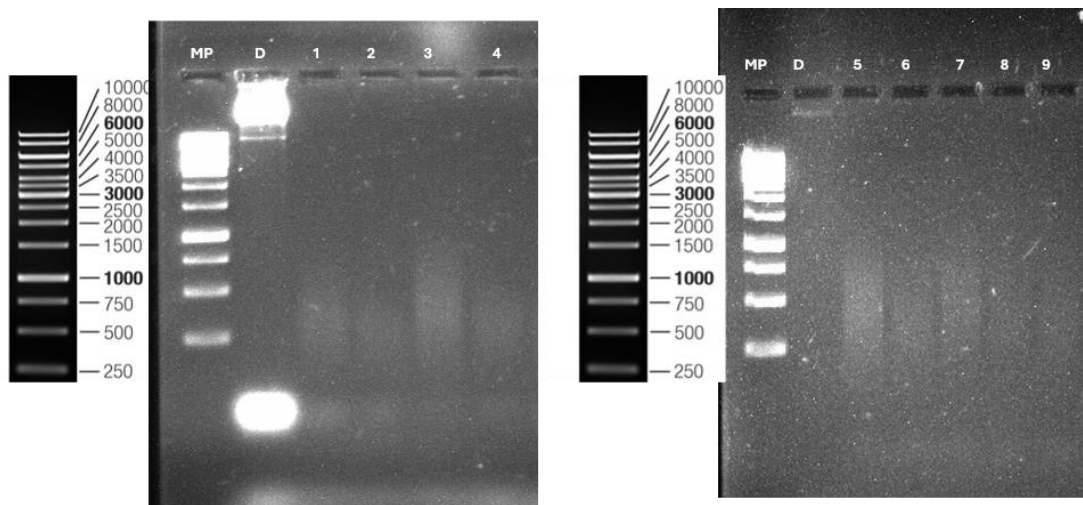


Figura 3. Gel de agarosa al 1%. Gel A: marcador molecular (MP), dilución del concentrado 1 μ g/mL (D), muestra de 100 μ L-40%amplitud (1), 100 μ L-50%amplitud (2), 200 μ L-40% (3), 200 μ L-50%amplitud (4). Gel B: marcador molecular (MP), dilución del concentrado 1 μ g/mL (D), 300 μ L-40%amplitud (5), 300 μ L-50%amplitud (6), 400 μ L-40%amplitud (7), 400 μ L-50%amplitud (8), 400 μ L-60%amplitud (9).

Tabla 3. Longitud aproximada de fragmentación con diferentes volúmenes y amplitudes

Tubo	Volumen (μ L)	Amplitud (%)	Longitud (pb)
1	100	40	< 500
2	100	50	< 300
3	200	40	< 1000
4	200	50	< 400
5	300	40	< 1000
6	300	50	< 750
7	400	40	< 750
8	400	50	< 750
9	400	60	< 750

Conclusión

En este artículo se expusieron las condiciones operacionales básicas para mantener un estándar de obtención de fragmentos en rango de 1000 a 100 pb aproximadamente, los cuales son pertenecientes a valores intermedios de volumen, además de dar a conocer la reducción de tiempo significativo que se tiene utilizando un sonicador de sonda sumergible frente a tratamientos con enzimas de restricción y equipos de sonicación de baño. Debido a que la creación de cavitación generada por la sonda abarca más uniformidad al estar inmersa en la matriz líquida de la solución plasmídica, facilitando la ruptura de los enlaces fosfodiéster. Y evitando el calentamiento utilizando ciclos con tiempos más largos de descanso que encendido. Por lo tanto, se concluye que resulta factible el uso de la técnica de sonicación como una estrategia efectiva para la fragmentación de ADN, junto con las condiciones propuestas de volumen, amplitud y tiempo de sonicación a utilizar en ensayos futuros.

Referencias

- Böttcher, B., Unsel, S., Ceulemans, H., B-Russell, R., Jeske, H. (2004). Geminata structures of African cassava mosaic virus geminata structures of African cassava mosaic virus. *J virol* 78, 6709–6714.
- Carnero avilés, Leslie, Cerna Chávez, Ernesto, Rodríguez Rodríguez, José Francisco, Beltrán Beache, Mariana, Ochoa fuentes, Yisa m., & Velarde Félix, Sixto. (2021). Cuantificación de enzimas relacionadas a la resistencia de insecticidas en *Bemisia tabaci* del estado de Sinaloa. *revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(1), 77-88. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i1.2504>
- Garzón, T.J.A.; Acosta, G.G.; Torres, P.I.; González, C.M.; Rivera, B.R.F.; Maya, H.V.; Guevara G.R.G. (2002) Presencia de los geminivirus, huasteco del chile (phv), texano de chile variante Tamaulipas (tpv-t), y chino del tomate (vcdt), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *revista mexicana de fitopatología*. 20:45-52.
- Gogate, P. R., & Bhosale, G. S. (2013). Comparison of effectiveness of acoustic and hydrodynamic cavitation in combined treatment schemes for degradation of dye wastewaters. *Chemical engineering and processing: Process intensification*, 71, 59-69.
- González Pascual, J. L. (2023). Aplicación de altas presiones hidrostáticas y ultrasonidos para acelerar la lisis de las levaduras.
- Gutiérrez-Mosquera, L. F., Arias-Giraldo, S., & Cardona-Naranjo, D. F. (2019). Cavitación Hidrodinámica: un Enfoque desde la Ingeniería y la Agroindustria. *Scientia et Technica*, 24(2), 283-304.
- Hernández-Espinal, L. A., Enríquez-Verdugo, I., Melgoza-Villagómez, C.M., Retes-Manjarrez, J. E., Velarde-Félix, S., Linares-Flores, P. J., & Garzón-Tiznado, J. (2018). Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del chile (*capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *revista fitotecnia mexicana*, 41(2), 149-157.
- Larguinho, M., Santos, H. M., Doria, G., Scholz, H., Baptista, P. V., & Capelo, J. L. (2010). Development of a fast and efficient ultrasonic-based strategy for DNA fragmentation. *talanta*, 81(3), 881-886.
- Matula, T., Bomsztyk, K., MacConaghy, B., & Maxwell, A. D. (2018). High throughput system for preparing samples for genomic and epigenetic assays. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 144(3_Supplement), 1698-1698.
- Ramesh, K. B., Mahendra, C., Kelageri, S. S., Rajna, S., & Subramanian, S. (2023). Distribution and mitotype diversity of *Bemisia tabaci*. *Indian Journal of Entomology*, 35-39.
- Sánchez Sotelo, I. S. (2023). Proteínas virales como inductores de la respuesta inmune en plantas y su impacto en la comunidad microbiana que habita el rizobioma (master's thesis, centro de investigaciones biológicas del noroeste, sc).
- Thompson, M. D., Aukema, K. G., O'Bryan, D. M., Rader, S. D., & Murray, B. W. (2008). Plasmid sonication improves sequencing efficiency and quality in the Beckman Coulter CEQ system. *Biotechniques*, 45(3), 327-329.
- Velarde-Félix, Sixto, Rodríguez-Cota, Franklin Gerardo, Cortez-Mondaca, Edgardo, Saucedo-Acosta, Raúl Hipólito, Melgoza-Villagómez, Claudia María, & Almeyda-León, Isidro Humberto. (2018). Primera incidencia del virus de la vena amarilla del chile huasteco en soya en México. *Revista mexicana de*

ciencias agrícolas, 9(7), 1389-1398. Epub 30 de septiembre de
2020. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.683>

Vivek, V., & Kim, E. S. (2000, January). Novel acoustic-wave micromixer. In Proceedings IEEE Thirteenth Annual International Conference on Micro Electromechanical Systems (Cat. No. 00CH36308) (pp. 668-673). IEEE.