

AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO DE *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*

J.J. ESTRUCH, C. ANTUÑA, S. FERRER y D. RAMON
Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València. C/ Dr. Moliner, 50, Burjassot. 46100 València.

Aceptado para publicación: 21 de Diciembre de 1988.

Palabras clave: DNA genómico, Dermatofitos, *Trichophyton mentagrophytes*.
Key words: Genomic DNA, Dermatophytes, *Trichophyton mentagrophytes*.

RESUMEN

En este trabajo se ha desarrollado un método para la obtención de DNA del hongo dermatofito *Trichophyton mentagrophytes*. Mediante su uso se consiguen preparaciones de DNA de alto peso molecular, aproximadamente de 45 kb., libre de contaminaciones en RNA o proteínas. Este DNA se puede digerir con distintas endonucleasas de restricción y, posteriormente, los fragmentos obtenidos se pueden unir mediante el enzima DNA ligasa. Este protocolo constituye un primer paso en la aplicación de las técnicas del DNA recombinante en esta especie fúngica.

INTRODUCCION

Hay dos motivos que hacen prever un rápido desarrollo de los conocimientos moleculares en micología médica durante los próximos años. Por un lado el incremento diario de los casos de micosis en enfermos neoplásicos, inmunodeprimidos o sometidos a transplantes, y por otro, el atractivo científico como modelo de desarrollo del fenómeno de dimorfismo propio de muchos hongos patógenos. En estos estudios, y al igual que ha ocurrido en otros campos del conocimiento, es de esperar que los investigadores hagan uso de las técnicas del DNA recombinante. Nuestro grupo de trabajo pretende estudiar el fenómeno biológico de la infección de tejidos epiteliales por parte de dermatofitos haciendo uso de estas estrategias. Para ello hemos escogido como modelo el hongo filamentoso productor de tiñas *Trichophyton mentagrophytes*.

Para la realización de este tipo de aproximaciones, el paso previo es la puesta a punto de un protocolo que permita obtener preparaciones puras de DNA de alto peso molecular con el cual poder construir genotecas, clonar genes y construir mapas genéticos. En *T. mentagrophytes* se han publicado protocolos de obtención de DNA para llevar

a cabo estudios de homología con fines taxonómicos (1). Esta metodología da lugar a preparaciones de DNA muy fragmentado con un bajo peso molecular. Dado que el DNA así obtenido no se puede utilizar en experimentos de biología molecular, hemos desarrollado un método rápido y sencillo para obtener DNA de alto peso molecular en esta especie fúngica.

MATERIAL Y METODOS

Organismo y condiciones de cultivo

A lo largo de este trabajo se utilizó una cepa salvaje de *T. mentagrophytes* aislada por el Dr. J. Buesa. El hongo se mantuvo en tubos inclinados de medio SDT (glucosa 40 g/l, peptona micológica 10 g/l, pH 6,8). Para conseguir grandes cantidades de micelio para la obtención de DNA se inocularon matraces de medio líquido SDT con microconidios del hongo y se incubó a 28°C y agitación orbital (200 rpm.) durante 48 horas.

Obtención del DNA

El micelio proveniente del crecimiento en medio líquido se recogió por filtración a través de malla de nylon, se lavó con NaCl 0,9% (p/v), se secó entre papeles de filtro y se pesó. Para cada experimento se tomaron 10 g. de micelio que se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido. El micelio congelado fue machacado en un mortero hasta reducirlo a la consistencia del polvo. Entonces se añadieron 60 ml. de solución de extracción (EDTA 0,25 M pH 8,0, SDS 5% p/v, NaCl 0,25 M) y se completó la homogeneización en un Potter (Pobel). Se incubó seguidamente la suspensión a 65°C durante 30 minutos y a continuación se centrifugó 20 minutos a $3.000 \times g$. 10°C. El sobrenadante se fenolizó tres veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (49/49/2:v/v/v) y a la fase acuosa de la última fenolización se le añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), incubándose la muestra a -20°C durante dos horas. El sedimento fue recogido por centrifugación a $10.000 \times g$. y 4°C durante 10 minutos, lavado con etanol al 70% y secado al vacío, resuspendiéndose en 5 ml. de tampón TE (TrisHCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0). Para eliminar el RNA, la suspensión fue incubada 1 h. a 37°C con RNasa (Sigma) libre de DNasas según (2) a una concentración final de 20 µg/ml. Posteriormente se adicionó proteinasa K (Sigma) a concentración final de 100 µg/ml y se continuó la incubación 30 minutos. La suspensión se desproteinizó mediante dos fenolizaciones. Finalmente a la fase acuosa se le añadió NaCl a una concentración final de 0,5 M, y se precipitó con etanol frío en las condiciones anteriormente mencionadas. El sedimento de DNA resultante se resuspendió en 0,6 ml. de tampón TE.

Manipulaciones del DNA

El DNA se cuantificó mediante mediciones espectrofotométricas (2). Las digestiones con endonucleasas de restricción y los tratamientos con DNA ligasa se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (New England Biolabs). El DNA se analizó por electroforesis horizontal de geles de agarosa al 0,6% (p/v) y posterior tinción con bromuro de etidio (2). pSal43, un plásmido que contiene el gen de la ornitina transcarbamilasa (*argB*) de *Aspergillus nidulans* (3), se purificó por el mé-

todo de la lisis alcalina (4) y se marcó radioactivamente con ^{32}P (dCTP) (Amersham) por el método de «nicktranslation» (5). La transferencia del DNA a filtros de nitrocelulosa y las condiciones de hibridación utilizadas fueron descritas con anterioridad (6).

RESULTADOS

Bajo las condiciones de obtención descritas anteriormente, se pueden obtener 0,5 mg. de DNA ($50\ \mu\text{g}$ por gramo inicial de micelio). En geles de agarosa este DNA migra como una única banda de aproximadamente 45 Kb. En las condiciones descritas no se observa contaminación en RNA. La relación de absorbancia a 260 y 280 nm. ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$) varía de 1,8 a 1,85.

Como se muestra en la Figura 1, este DNA se corta fácilmente con varias endonu-

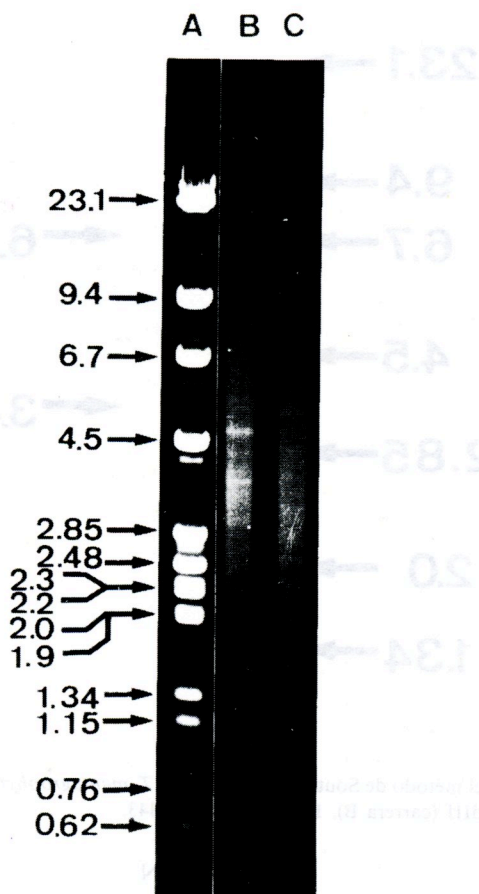


Figura 1. Análisis con endonucleasas de restricción del DNA de *T. mentagrophytes*. Carrera A: DNA del fago lambda y 29 digeridos con *Hind*III. Carrera B: DNA de *T. mentagrophytes* digerido con *Hind*III. Carrera C: DNA de *T. mentagrophytes* digerido con *Eco*RI.

cleasas de restricción, detectándose unas bandas definidas sobre el fondo de fluorescencia de la digestión. Asimismo los fragmentos provenientes de la digestión con endonucleasas de restricción aumentan su tamaño tras ser tratados con DNA ligasa (resultados no mostrados).

El análisis por el método de Southern (2) del DNA digerido empleando pSal43 como sonda muestra la presencia de una banda *EcoRI* de 3,4 Kb. y una banda *HindIII* de 6,7 Kb. (Figura 2). Estas bñdas probablemente contienen el gen de la ornitina transcarbamilasa de *T. mentagrophytes*.

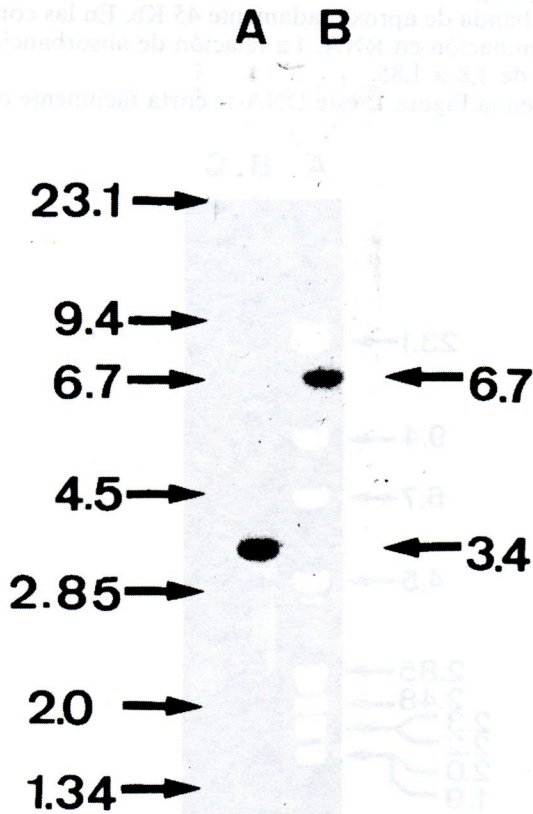


Figura 2. Análisis por el método de Southern del DNA de *T. mentagrophytes* digerido con *EcoRI* (carrera A) o *HindIII* (carrera B). La sonda fue pSal43.

DISCUSION

El DNA aislado con este protocolo, muestra un alto grado de pureza, indicado por las relaciones de DO_{260}/DO_{280} y por la limpieza de las bandas en geles de agarosa. Este hecho indica tanto una ausencia de proteínas como de RNA contaminantes.

La presencia de bandas discretas sobre un fondo continuo de DNA, corresponde probablemente a la presencia en el genoma de *T. mentagrophytes* de genes repetidos, tales como los genes ribosomales o genes de tRNAs. Además éstas constituyen un control interno de la efectividad de la digestión y, por lo tanto, de la pureza del DNA. La intensidad y definición de las mismas permiten pensar que, utilizando estas condiciones de hibridación, el clonaje del gen de la ornitina transcarbamilasa de esta especie pueda resultar relativamente sencillo. En la actualidad estamos llevando a cabo este tipo de experimentos.

En resumen, se ha desarrollado un método rápido (aproximadamente 7 horas) y eficaz para la obtención de DNA de alto peso molecular del dermatofito *T. mentagrophytes*. Con este protocolo se obtiene DNA en gran cantidad, libre de impurezas y que se puede digerir, ligar e hibridar. Así pues, mediante esta metodología es posible comenzar a aplicar las técnicas del DNA recombinante en este hongo, y mediante el uso de las mismas, iniciar nuestros conocimientos moleculares del proceso de infección.

SUMMARY

A method for the isolation of DNA from the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* yields DNA preparations with high molecular weight (approx. 45 kb) free of RNA or protein contaminants. This DNA can be digested with various restriction endonucleases. The resulting fragments can then be linked by DNA ligase. This procedure is the first step towards the application of recombinant DNA techniques to the above fungal species.

AGRADECIMIENTOS

Estamos agradecidos a la Dra. B. Berse (Departamento de Genética de la Universidad de Varsovia, Polonia) por cedernos pSal43, y al Dr. J. Buesa (Dep. Microbiología, Fac. Medicina i Odontologia, Univ. València) el habernos facilitado el aislado clínico de *T. mentagrophytes*.

BIBLIOGRAFIA

1. Davison FD, Mackenzie DWR. DNA homology in the taxonomy of dermatophytes. *J Med Vet Mycol* 1984; 22: 116-123.
2. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook, J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor. New York. 1982.
3. Berse B, Dmochowska A, Skrzypek M, Weglenski P, Bates MA, Weiss RL. Cloning and characterization of the ornithine carbamoyltransferase gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene* 1983; 25: 109-117.
4. Bimboim MC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 1979; 7: 1.513-1.523.
5. Rigby TWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity «in vitro» by nick-translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977; 113: 237-251.
6. Ramón D, Carramolino L, Patiño C, Sánchez F, Peñalva MA. Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the β -lactam ring in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 1987; 57: 171-181.