

OPTIMIZATION TECHNIQUE FOR GENOMIC DNA ISOLATION FROM BOVINE SPERM

OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE ESPERMATOZOIDES DE TORO

Martha **Vázquez-Aguirre**¹, Javier de Jesús **Valencia-Méndez**¹, Manuel **Barrientos-Morales**², Noé Orlando **Juárez-López**¹, Alejandro **Córdova-Izquierdo**³, Juan Manuel **Pinos-Rodríguez**², María de Lourdes **Juárez-Mosqueda**^{1*}

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad #3000, Colonia, C.U., Coyoacán, CP 04510, CDMX, México. (ma_vag@yahoo.com.mx), (jjvm@servidor.unam.mx), (noeorlando@comunidad.unam.mx), (luerfco@unam.mx). ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Miguel Ángel de Quevedo S/N, Colonia Unidad Veracruzana, 91710, Veracruz, México. (mbarrientos@uv.mx), (jpinos@uv.mx). ³Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Coyoacán, CDMX, México. (acordova@correo.xoc.uam.mx)

ABSTRACT

The bull sperm cells exhibit specific structures that protect their DNA, and therefore, the standard techniques used for somatic DNA isolation are not efficient. Thus, our objective was to design an inexpensive, quick and efficient bull sperm DNA isolation, under the hypothesis that the appropriate combination of chemical agents and a set of alternatives would allow us to design an improved method to extract DNA from bull sperm to be used in PCR assays. A series of replicates obtained from five ejaculates were used to evaluate six methods to extract bull sperm DNA: 1) the conventional method using proteinase K and phenol-chloroform; 2) papain, DTT, DMSO, CTAB, and SDS method (to solubilize the perinuclear theca and to replace phenol-chloroform); 3) the nonionic detergent Brij 36-T method, to remove the plasma membrane; 4) DTT and heparin method, for nuclear chromatin de-condensation; 5) SDS method and; 6) CTAB method, to remove the plasma membrane. DNA samples were analyzed spectrophotometrically to determine the DNA concentration and purity, then used at 200, 100, 50, 25, and 12.5 ng for PCR assays. To evaluate repeatability of the method, replicates of the most efficient procedure were performed. Results showed that the best method for bull sperm DNA extraction was the use of CTAB as a membrane removal agent; papain, DTT and DMSO as lysis buffer and DTT, heparin, and SDS as decondensing solution, achieving concentration ranging from

RESUMEN

Los espermatozoides de toro exhiben estructuras específicas que protegen su ADN y, por lo tanto, las técnicas estándar utilizadas para el aislamiento del ADN somático no son eficientes. Así pues, nuestro objetivo fue diseñar un aislamiento del ADN de espermatozoides de toro que fuera económico, rápido y eficiente, con la hipótesis de que la combinación adecuada de agentes químicos y un conjunto de alternativas nos permitirían diseñar un método mejorado para extraer el ADN de los espermatozoides de toro para su utilización en los ensayos de PCR. Una serie de réplicas obtenidas de cinco eyaculados se utilizó para evaluar seis métodos de extracción de ADN de espermatozoides de toro: 1) el método convencional que utiliza la proteína K y el fenol-cloroformo; 2) el método de papaína, DTT, DMSO, CTAB y SDS (para solubilizar la teca perinuclear y reemplazar el fenol-cloroformo); 3) el método del detergente no iónico Brij 36-T para eliminar la membrana plasmática; 4) el método del DTT y la heparina para la descondensación de la cromatina nuclear; 5) el método SDS y; 6) el método CTAB para eliminar la membrana plasmática. Las muestras de ADN se analizaron espectrofotométricamente para determinar la concentración y la pureza del ADN, y luego se utilizaron en cinco cantidades (200, 100, 50, 25 y 12.5 ng) para los análisis de PCR. Para evaluar la repetibilidad del método, se realizaron réplicas del procedimiento más eficiente. Los resultados mostraron que el mejor método para la extracción de ADN de espermatozoides de toro fue el sexto, basado en el uso del CTAB como agente de remoción de membranas; papaína, DTT y DMSO como tampón de lisis y DTT, heparina y SDS como solución de descondensación, y se logró una concentración

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: March, 2020. Approved: July, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 1059-1077. 2020.

63 to 154 ng μL^{-1} and optimal quality ($A_{260}/A_{280} = 1.75$ and 1.73) in fresh and frozen semen extracting, respectively. In conclusion, considering the structural characteristics of the sperm cell, we designed a method simple and efficient for extracting bull sperm DNA without limitations in PCR. Also, the whole procedure can be done in a short period of time without the need to employ phenol-chloroform and proteinase K treatment.

Key words: PCR, DNA isolation, *Bos taurus*, spermatozoa.

INTRODUCTION

The DNA analysis using the different varieties of PCR can contribute to the understanding of biochemical processes (Xavier *et al.*, 2018), sex-linked genetic diseases (Sarova *et al.*, 2018), and problems of fertility (Lingzhao *et al.*, 2019) in sperm. It is also used as a validation technique for sexing sperms (Chandler *et al.*, 2007). To carry out these studies, it is essential to obtain nucleic acids in good condition and free of contaminants; that is, the quality, quantity and purity DNA should be suitable (Demeke and Jenkins, 2010). Quality refers to the possibility of storing DNA indefinitely, maintaining its structure and properties and, therefore, it is the factor responsible for reproducibility in subsequent experiments or for the success of the others applications, which can be sequencing, Southern Blot, and preparation of genomic libraries. To guarantee the quality of the DNA, the preparations must be free of DNA nucleases. Quantity is a relative concept that depends on the number and state of the own cells to study; high quantities of pure DNA are required for the creation of DNA-banks. Additionally, a DNA free of proteins and the chemicals used in the initial purification processes guarantees a high degree of purity (Cotton and Fisher, 2015; Mariyam and Preetha, 2020).

Great progress was made in the simplification of DNA isolation, but there is no a universal automated method to use with any type of sample; DNA isolation methods used for mammalian somatic cells are ineffective for mammalian sperm (Griffin, 2013; Mariyam and Preetha, 2020). There are reports about procedures for the DNA sperm isolation and those most popular use a combination of detergents or chaotropic salts or both to facilitate cell lysis, and proteinase K (ProK) to digest nuclear proteins. Also, about reducing agents to break disulfide bonds

que oscilaba entre 63 y 154 ng μL^{-1} y una calidad óptima ($A_{260}/A_{280} = 1.75$ y 1.73) en la extracción de semen fresco y congelado, respectivamente. En conclusión, considerando las características estructurales del espermatozoide, diseñamos un método simple y eficiente para extraer el ADN de los espermatozoides de toro sin limitaciones en la PCR. Además, todo el procedimiento puede realizarse en un período corto de tiempo, sin necesidad de emplear el tratamiento con fenol-cloroformo y proteinasa K.

Palabras clave: PCR, aislamiento de ADN, *Bos taurus*, espermatozoides.

INTRODUCCIÓN

El análisis del ADN utilizando las diferentes variedades de PCR puede contribuir a la comprensión de los procesos bioquímicos (Xavier *et al.*, 2018), las enfermedades genéticas vinculadas al sexo (Sarova *et al.*, 2018) y los problemas de fertilidad (Lingzhao *et al.*, 2019) en el esperma. También se utiliza como técnica de validación para sexar los espermatozoides (Chandler *et al.*, 2007). Para realizar estos estudios es fundamental obtener ácidos nucleicos en buen estado y libres de contaminantes; es decir, la calidad, cantidad y pureza del ADN debe ser adecuada (Demeke y Jenkins, 2010). La calidad se refiere a la posibilidad de almacenar el ADN indefinidamente, manteniendo su estructura y propiedades y, por lo tanto, es el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores o del éxito de las demás aplicaciones, que pueden ser la secuenciación, el Southern Blot y la preparación de bibliotecas genómicas; para garantizar la calidad del ADN, las preparaciones deben estar libres de nucleasas de ADN. La cantidad es un concepto relativo que depende del número y del estado de las propias células a estudiar; se requieren grandes cantidades de ADN puro para la creación de los bancos de ADN. Además, un ADN libre de proteínas y de los productos químicos utilizados en los procesos iniciales de purificación garantiza un alto grado de pureza (Cotton y Fisher, 2015; Mariyam y Preetha, 2020).

Grandes progresos se han efectuado en la simplificación del aislamiento de ADN, pero no existe un método automatizado universal que pueda utilizarse con cualquier tipo de muestra; los métodos de aislamiento del ADN usados para las células somáticas de mamíferos son ineficaces para el esperma de mamíferos (Griffin, 2013; Mariyam y Preetha, 2020). Hay

between protamines; most protocols recover DNA from sperm lysate through the organic solvent phenol-chloroform or silica-based spin columns (Wu *et al.*, 2015). However, they have drawbacks and are impractical mainly due to the incubation periods that extend the extraction process from one to two days (Griffin, 2013).

Researchers use kits to extract sperm DNA and employ modified protocols; for instance, thawed goat semen. A wide use of the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) produces low DNA concentration, and its purity changes from below and above ideal values; similarly, the isolation with Chelex-100 yields high DNA concentration values, but its purity is below the ideal (Silva *et al.*, 2014). The use of Flinders Technology Associates (FTA[®]) classic cards was suitable for human sperm DNA isolation. However, although DNA was of sufficient quality for amplification, there was a possible protein contamination and the yield was not always sufficient for PCR use (Serra *et al.*, 2018). A method for human or mice sperm DNA isolation, with a commercially-available guanidium thiocyanate lysis buffer and incorporating three different commercial silica-based spin columns, yielded > 90% high-quality DNA (Wu *et al.*, 2015). Some commercial kits offer quick, easy, and efficient methods for DNA isolation, but they can be expensive and designed for DNA isolation from somatic cells; therefore, they are ineffective for mammalian sperm (Griffin, 2013; Mariyam and Preetha, 2020).

An aspect of great relevance to consider for DNA isolation is that sperm cells differ from the somatic cells in components and architecture. Unlike somatic cells, two characteristics make sperm DNA isolation difficult: the first one is the presence of the perinuclear theca, which in bull sperm is relatively more resistance to solubilization (Sutovsky *et al.*, 1997), and the second one is that the DNA proteins are compacted by strong bonds, forming highly condensed chromatin, which is found in high concentrations in bulls (Johnson *et al.*, 2015; Ukogu *et al.*, 2020). For this reason, most methods do not adequately extract DNA from bull sperm cells (Pacheco *et al.*, 2011).

The objective of this study was to propose a simpler and rapid protocol to isolate high-quality bull sperm DNA both economical and reliable at a large scale, under the hypothesis that the appropriate

informes sobre procedimientos para el aislamiento del ADN de los espermatozoides y los más populares utilizan una combinación de detergentes o sales caótropas o ambos para facilitar la lisis celular, la proteínasa K (ProK) para digerir las proteínas nucleares. También, sobre agentes reductores para romper los enlaces de disulfuro entre las protaminas; la mayoría de los protocolos recuperan el ADN del lisado del espermatozoides a través del disolvente orgánico fenol-cloroformo o columnas de espín a base de sílice (Wu *et al.*, 2015). Sin embargo, tienen inconvenientes y son poco prácticos, principalmente debido a los períodos de incubación que prolongan el proceso de extracción de uno a dos días (Griffin, 2013).

Los investigadores utilizan kits para extraer el ADN de los espermatozoides y emplean protocolos modificados; por ejemplo, en semen descongelado de cabra. Un uso amplio del Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) produce una baja concentración de ADN, y su pureza cambia por debajo y por encima de los valores ideales; de manera similar, el aislamiento con Chelex-100 produce valores altos de concentración de ADN, pero su pureza está por debajo del ideal (Silva *et al.*, 2014). El uso de las tarjetas clásicas de Flinders Technology Associates (FTA[®]) fue adecuado para el aislamiento del ADN del espermatozoides humano. Sin embargo, aunque el ADN era de calidad suficiente para la amplificación, había una posible contaminación proteínica y el rendimiento no siempre era suficiente para uso de la PCR (Serra *et al.*, 2018). Un método para el aislamiento de ADN del espermatozoides humano o de ratón, disponible en el mercado con un tampón de lisis de tiocianato de guanidinio y que incorporaba tres diferentes columnas de centrifugación a base de sílice, producía ADN de alta calidad > 90% (Wu *et al.*, 2015). Algunos equipos comerciales ofrecen métodos rápidos, fáciles y eficaces para el aislamiento del ADN, pero pueden ser caros y diseñados para el aislamiento del ADN de las células somáticas; por lo tanto, son ineficaces para el espermatozoides de mamíferos (Griffin, 2013; Mariyam and Preetha, 2020).

Un aspecto de gran relevancia a considerar para el aislamiento del ADN es que las células espermáticas difieren de las células somáticas en sus componentes y arquitectura. A diferencia de las células somáticas, hay dos características que dificultan el aislamiento del ADN de los espermatozoides: la primera es la presencia de la teca perinuclear, que en el espermatozoides

combination of chemical agents and a set of alternatives would allow us to design an improved method to extract DNA from bull sperm to be used in PCR assays.

MATERIALS AND METHODS

Chemical agents

Chemical agents were acquired from Sigma-Aldrich distributors, catalogues: Papain (P3375-25G), PureGenome® Proteinase K (72635), DL-Dithiothreitol (D-0632), DMSO (D5879-100ML), NaCl (S3014), Trizma® base (T1503-500G), Heparin sodium salt (H5515), CTAB (52365), Acetone (179973), Ethanol (459836), Ethidium bromide (E8751), Sodium acetate (S2889); Chem Industry, catalogue: Brij 36-T (9006-65-9); Clontech, catalogue: Kit Taq polimerasa Titanium (75831), 10X Titanium Taq PCR Buffer (S1793), Advantage® Utrapure PCR Deoxynucleotides Mix (639125); USB Corporation catalogue: phenol equilibrated (75829), phenol-chloroform (75831); Bio-Rad, catalogue: SDS (161-0302), 50X TAE (151-0773) and; Invitrogen, catalogue: 1 Kb Plus DNA Ladder (10787-026).

Samples

The semen samples were collected from two mature health bulls (Brown Swiss dairy breed) housed at the Practical Teaching, Production, Research and Animal Health Center, Mexico (119° N, 99° W), which belongs to the Veterinary Medicine and Zootechnics Faculty of the National University Autonomous of Mexico (FMVZ-UNAM). The bulls, aged of 48 months, 650 kg live body weight, were kept in a 22 m² free stall barn under natural light conditions and temperatures ranging between 15 and 25 °C. The daily feed for each bull was: 18% protein concentrate, 2.5 kg; oats, 1 kg; barley, 0.5 kg; hay or silage, 8 kg; and mineral mix, 100 g; they had *ad libitum* access to water. Semen was collected, on alternating days, using an artificial vagina.

Ejaculates were identified with numbers 1 through 5, when collected. For transportation to the laboratory ejaculates were diluted 3:1 (v/v) with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4); a monitored polyurethane thermal box was used to transport the collected semen at 25 °C. The samples were washed by centrifugation at 2800 x *g* for 5 min and re-suspended in PBS to a concentration of 30 x 10⁶ cells mL⁻¹, which were aliquoted into microcentrifuge tubes, and used immediately in the DNA extraction tests or were snap frozen and stored at -20 °C until use.

de toro es relativamente más resistente a la solubilización (Sutovsky *et al.*, 1997), y la segunda es el hecho de que las proteínas del ADN se compactan mediante fuertes enlaces y forman cromatina altamente condensada, que se encuentra en altas concentraciones en los toros (Johnson *et al.*, 2015; Ukogu *et al.*, 2020). Por esta razón, la mayoría de los métodos no extraen adecuadamente el ADN de los espermatozoides de los toros (Pacheco *et al.*, 2011).

El objetivo de este estudio fue proponer un protocolo más sencillo y rápido para aislar el ADN de espermatozoides de toro de alta calidad de manera económica y probado a gran escala, con la hipótesis de que la combinación adecuada de agentes químicos y un conjunto de alternativas nos permitiría diseñar un método mejorado para extraer el ADN de los espermatozoides de toro y ser utilizado en los ensayos de PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Agentes químicos

Los agentes químicos se adquirieron de los distribuidores de Sigma-Aldrich, catálogos: Papaína (P3375-25G), PureGenome® Proteinase K (72635), DL-Ditiotreitrol (D-0632), DMSO (D5879-100ML), NaCl (S3014), Trizma® base (T1503-500G), heparina sal sódica (H5515), CTAB (52365), acetona (179973), etanol (459836), bromuro de etidio (E8751), acetato de sodio (S2889); Chem Industry, catálogo: Brij 36-T (9006-65-9); Clontech, catálogo: Kit Taq polimerasa Titanium (75831), 10X Titanium Taq PCR Buffer (S1793), Advantage® Utrapure PCR Deoxynucleotides Mix (639125); USB Corporation, catálogo: fenol equilibrado (75829), fenol-cloroformo (75831); Bio-Rad, catálogo: SDS (161-0302), 50X TAE (151-0773) y; Invitrogen, catálogo: 1 Kb Plus DNA Ladder (10787-026).

Muestras

Las muestras de semen se recolectaron de dos toros maduros saludables (raza lechera Pardo Suizo) alojados en el Centro de Enseñanza Práctica, Producción, Investigación y Salud Animal, México (119° N, 99° O), que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). Los toros, de 48 meses de edad y 650 kg de peso corporal vivo, se mantuvieron en un establo de 22 m² de superficie, con luz natural y temperaturas que oscilaban entre 15 y 25 °C. La alimentación diaria de cada toro fue: 18% de concentrado de proteína, 2.5 kg; avena, 1 kg; cebada, 0.5 kg;

Sample pre-treatment

The sperm cells concentration used in each test was 2.5×10^6 cells mL^{-1} . The first pre-treatment step was common to all the six methods, that is, 500 μL semen aliquots at a concentration of 2.5×10^6 cells mL^{-1} were washed three times at $2\ 800 \times g$ for 3 min each one with PBS. The spermatocytic cell pellet was then treated with the different buffers according to each method.

DNA isolation methods

The study consisted of optimizing a technique of DNA isolation with five modifications to a generalized technique for somatic cells, which was adapted for application with bull sperm cells. All the methods are listed in Table 1.

Method 1

Total DNA was extracted with phenol-chloroform. Each pellet was resuspended in 500 μL^{-1} of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and centrifuged again. To each pellet, 500 μL^{-1} lysis solution (TE buffer supplemented with 1% proteinase K) (Di Prieto *et al.*, 2011) was added and the mixture was incubated at 55 °C for 24 h, then centrifuged at $8\ 800 \times g$ for 5 min and washed twice with 500 μL^{-1} of 50 mM Tris HCl, pH 8.9. The pellet was resuspended with 500 μL^{-1} phenol equilibrated with Tris-HCl, pH 7.8, then passed through vortex and centrifugation at $10\ 400 \times g$ for 10 min, the bottom phase was discarded by aspiration and this step was repeated twice.

heno o ensilado, 8 kg; y mezcla de minerales, 100 g; tenían acceso *ad libitum* al agua. El semen fue recolectado, en días alternos, usando una vagina artificial.

Los eyaculados se identificaron con números del 1 al 5. Para su transporte al laboratorio los eyaculados se diluyeron 3:1 (v/v) con amortiguador de fosfato salino (PBS, pH 7.4); se utilizó una caja térmica de poliuretano monitoreada para transportar el semen recolectado a 25 °C. Las muestras se lavaron por centrifugación a $2800 \times g$ durante 5 min y se suspendieron de nuevo en PBS a una concentración de 30×10^6 células mL^{-1} , las cuales se alicuotaron en tubos de microcentrífuga y se utilizaron de inmediato en las pruebas de extracción de ADN o congeladas rápidamente y almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

Tratamiento previo de muestra

La concentración de espermatozoides utilizada en cada prueba fue 2.5×10^6 células mL^{-1} . El primer paso de tratamiento previo era común en los seis métodos, es decir, alícuotas de 500 μL de semen a una concentración de 2.5×10^6 células mL^{-1} se lavaron tres veces en PBS a $2\ 800 \times g$ durante 3 min cada una. Luego, el pellet de células espermáticas se trató con los diferentes amortiguadores de acuerdo a cada método.

Métodos de aislamiento de ADN

El estudio consistió en la optimización de una técnica de aislamiento de ADN con cinco modificaciones a una técnica generalizada para células somáticas, que se adaptó para su aplicación con espermatozoides de toro. Todos los métodos se enumeran en el Cuadro 1.

Table 1. Characterization of the method variants used to isolate bull sperm DNA.

Cuadro 1. Caracterización de las variantes del método usado para aislar ADN de los espermatozoides de toro.

Method	Membrane removal Treatment	Lysis Solution	De-condensating solution	DNA purification and precipitation
1	Original	Proteinase K	-	Phenol-chloroform Sodium acetate ethanol
2	-	Papain, DTT [§] , DMSO [¶] , CTAB, SDS	-	Cold acetone ethanol
3	Brij 36-T	Papain, DTT, DMSO, CTAB, SDS	-	Cold acetone ethanol
4	Brij 36-T	Papain, DTT, DMSO, CTAB	SDS, DTT, heparin	Cold acetone ethanol
5	SDS [†]	Papain, DTT, DMSO	SDS, DTT, heparin	Cold acetone ethanol
6	CTAB [‡]	Papain, DTT, DMSO	SDS, DTT, heparin	Cold acetone ethanol

[†]Sodium dodecyl sulfate; [‡]Cetyltrimethyl ammonium bromide; [§]Dithiothreitol; [¶]Dimethyl sulfoxide. ♦ [†]Dodecyl sulfato de sodio; [‡]Bromuro de cetiltrimetil amonio; [§]Ditiotreitolo; [¶]Dimetil sulfóxido.

The supernatant was transferred to another tube, 500 μL^{-1} phenol-chloroform was added, passed through vortex for 30 min and centrifugation at 10 400 x g for 10 min; the bottom phase was discarded by aspiration and this step was repeated twice. The supernatant was transferred to a new tube, and then 500 μL^{-1} 50 mM Tris-HCl pH 8.9 was added. The mixture was vortexed and centrifuged again, and the supernatant was transferred to another tube.

Two volumes of cold 70% ethanol were added, the tube was shaken gently, then 50 μL^{-1} 3 M sodium acetate pH 5 was added, and incubated at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. Each sample was centrifuged at 8 000 x g for 10 min at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the supernatant was removed and pellet was added with two volumes (1 mL^{-1}) of cold 70% ethanol, the tube was shaking gently, and the alcohol was eliminated by aspiration. Each DNA pellet was dried, resuspended with 50 μL^{-1} distilled water, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Method 2

As the spermatid structures differ from the somatic cells, in order to increase DNA recovery and purity modifications were introduced to the lysis buffer, and CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) and SDS (Sodium dodecyl sulfate) were used instead of phenol and chloroform (Tan and Yiap, 2009). Those detergents also were selected because they could disrupt the sperm perinuclear theca. The key modifications in the lysis buffer consisted of sample pretreatment with papain to eliminate protein components (Eychner *et al.*, 2015), DDT (Dithiothreitol) for the release of DNA from somatic cells present in semen (Fu *et al.*, 2007), achieving with that a differential extraction, and the DMSO (Dimethyl sulfoxide), was introduced to protect de genomic DNA (Valadez and Günter, 2005).

Washed semen aliquots were resuspended in 50 μL^{-1} of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.9, plus 30% papain, 1% DTT, and 0.025% DMSO) and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, then were centrifuged at 8 800 x g for 5 min and washed twice with 500 μL^{-1} of 50 mM Tris HCl, pH 8.9. The pellet was resuspended with 50 μL^{-1} 5% CTAB, incubated at room temperature for 5 min, centrifuged at 8 800 x g for 5 min, and washed twice with sterile distilled water. The supernatant was removed and the pellet resuspended with 50 μL^{-1} 50 mM Tris HCl, pH 8.9 and 50 μL^{-1} 10% SDS followed for an incubation at room temperature for 30 min.

Afterwards, sample was centrifuged at 8 800 x g for 5 min, the supernatant discarded and the pellet was washed with distilled water twice. Pellet was resuspended with 50 mM Tris-HCl pH 8.9, 300 μL^{-1} cold acetone was added and tube shaken gently. Each sample was centrifuged at 4 000 x g for 5 min, the pellet was added with 300 μL^{-1} of cold absolute ethanol, tube was

Método 1

El ADN total se extrajo con fenol-cloroformo. Cada pellet se resuspendió en 500 μL^{-1} de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM) y se centrifugó de nuevo. A cada pellet se añadió 500 μL^{-1} de solución de lisis (amortiguador TE suplementado con 1% de proteinasa K) (Di Prieto *et al.*, 2011) y la mezcla se incubó a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, luego se centrifugó 5 min a 8 800 x g y se lavó dos veces con 500 μL^{-1} Tris-HCl 50 mM, pH 8.9. El pellet se resuspendió con 500 μL^{-1} de fenol equilibrado con Tris-HCl, pH 7.8, luego se pasó por el vórtex y se centrifugó a 10 400 x g durante 10 min, la fase inferior se desechó por aspiración y este paso se repitió dos veces más.

El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se añadió 500 μL^{-1} de fenol-cloroformo y luego se pasó por el vórtex durante 30 min y se centrifugó 10 min a 10 400 x g , la fase inferior se descartó por aspiración y este paso se repitió dos veces. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, y se añadió 500 μL^{-1} 50 mM Tris-HCl pH 8.9. La mezcla se vortexeó y centrifugó de nuevo, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo.

Al final, se añadieron dos volúmenes de etanol frío al 70%, el tubo se agitó suavemente, luego se añadió 50 μL^{-1} de acetato de sodio 3 M pH 5, y se incubó 20 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada muestra se centrifugó a 8 000 x g durante 10 min a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se retiró el sobrenadante y el pellet se añadió con dos volúmenes (1 mL^{-1}) de etanol al 70% frío, se agitó suavemente el tubo y se eliminó el alcohol por aspiración. Cada pellet de ADN se secó, se resuspendió con 50 μL^{-1} de agua destilada, y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Método 2

Ya que las estructuras espermáticas difieren de las células somáticas, a fin de aumentar la recuperación y la pureza del ADN, se introdujeron modificaciones en el amortiguador de lisis y el uso de CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) y SDS (dodecil sulfato de sodio), en lugar de fenol y cloroformo (Tan and Yiap, 2009). Esos detergentes también se seleccionaron porque podían alterar la teca perinuclear del esperma. Las principales modificaciones del amortiguador de lisis consistieron en el tratamiento previo de la muestra con papaína para eliminar los componentes proteicos (Eychner *et al.*, 2015), el DDT (Ditiotreitolo) para la liberación del ADN de las células somáticas presentes en el semen (Fu *et al.*, 2007), con ello se logró una extracción diferencial, y se introdujo el DMSO (Dimetil sulfóxido), para proteger el ADN genómico (Valadez y Günter, 2005).

Las alícuotas de semen lavadas se resuspendieron en 50 μL^{-1} de amortiguador de lisis (de Tris-HCl 50 mM con pH 8.9 añadido con 30% de papaína, 1% de DTT y 0.025% de DMSO) y

shaken gently and sample was centrifuged at 8 800 x g for 5 min. Samples were dried, and resuspended as in method 1.

Method 3

The only modification to the protocol 2 was the addition the Brij 36-T to solubilize the plasma membrane and to expose the PT (Felipe-Pérez *et al.*, 2012). Thus, before lysis solution, semen samples were incubated with 50 μL^{-1} of 10% Brij 36-T for 10 min at room temperature, then centrifuged at 2 800 x g for 5 min and the pellet was processed as in method 2.

Method 4

To allow chromatin de-compaction, a de-condensing solution employing SDS, DTT and heparin (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011) was introduced to method 3; hence SDS was removed from the lysis solution. The solution was used after lysis solution where the pellet obtained from the cellular lysis was resuspended with 50 μL^{-1} 10% SDS, 50 μL^{-1} 180 mM DTT, 1U mL^{-1} heparin and incubated 30 min at room temperature. Thereafter, sample was centrifuged 5 min at 8 800 x g, the supernatant discarded, and the pellet was washed with 50 mM Tris-HCl pH 8.9 twice; afterwards, this method continues as in method 3.

Method 5

In order to reduce the cost and time of the process, the modifications to the protocol 4 were the replacement of Brij 36-T by SDS (Ward, 2018), and the removal of the CTAB of the lysis solution. Washed semen aliquots were resuspended in 50 μL^{-1} 20% SDS and incubated at room temperature for 10 min; then samples were centrifuged at 2 800 x g for 5 min and the pellet was processed as in Method 4.

Method 6

CTAB serves as an important surfactant in the DNA isolation buffer system to remove membrane lipids and promote cell lysis, and because it maintains the integrity of precipitated DNA during isolation (Prabha *et al.*, 2013). Accordingly, before the treatment with the lysis solution, method 5 was modified in order to use 10% CTAB instead of SDS, to expose the perinuclear theca. All the other steps were performed according to the steps of method 5.

Concentration and purity of DNA

After genomic DNA isolation, the purity and concentration of genomic DNA isolated by the six isolation protocols were

se incubaron a 37 °C durante 30 min, luego se centrifugaron 5 min a 8 800 x g y se lavaron dos veces con 500 μL^{-1} de Tris-HCl 50 mM, pH 8.9. El pellet se resuspendió con 50 μL^{-1} de CTAB al 5%, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, luego se centrifugó 5 min a 8 800 x g y se lavó dos veces con agua destilada estéril. El sobrenadante se removió y el pellet resuspendido con 50 μL^{-1} Tris HCl 50 mM, pH 8.9 y 50 μL^{-1} de SDS al 10% seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 30 min.

Después, la muestra se centrifugó 5 min a 8 800 x g, el sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con agua destilada dos veces. El pellet se resuspendió con Tris-HCl 50 mM, pH 8.9 y se añadió 300 μL^{-1} de acetona fría, el tubo se agitó suavemente. Cada muestra se centrifugó a 4 000 x g durante 5 min, se añadieron 300 μL^{-1} de etanol absoluto frío al pellet, el tubo se agitó suavemente y la muestra se centrifugó 5 min a 8 800 x g. Las muestras se secaron y se resuspendieron como en el método 1.

Método 3

La única modificación al protocolo 2 fue la adición del Brij 36-T para solubilizar la membrana de plasma y exponer la PT (Felipe-Pérez *et al.*, 2012). Así, antes de la solución de lisis, las muestras de semen se incubaron con 50 μL^{-1} de Brij 36-T al 10% durante 10 min a temperatura ambiente, luego se centrifugaron 5 min a 2 800 x g y el pellet se procesó como en el método 2.

Método 4

Para permitir la descompactación de la cromatina, se introdujo en el método 3 una solución de descondensación empleando SDS, DTT y heparina (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011), por lo que se eliminó el SDS de la solución de lisis. La solución se utilizó después de la solución de lisis, donde el pellet obtenido de la lisis celular se resuspendió con 50 μL^{-1} de SDS al 10%, 50 μL^{-1} de DTT 180 mM, 1U mL^{-1} de heparina y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Después, la muestra se centrifugó 5 min a 8 800 x g, el sobrenadante se desechó, y el pellet se lavó dos veces con 50 mM Tris-HCl pH 8.9, y luego este método continúa como en el método 3.

Método 5

Para reducir el costo y el tiempo del proceso, las modificaciones del protocolo 4 fueron la sustitución de Brij 36-T por SDS (Ward, 2018) y la eliminación del CTAB de la solución de lisis. Las alícuotas de semen lavadas se resuspendieron en 50 μL^{-1} de SDS al 20% y se incubaron 10 min a temperatura ambiente; luego las muestras se centrifugaron 5 min a 2 800 x g y el pellet se procesó como en el método 4.

measured using a NanoDrop® ND-1000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™). Protein contamination was measured by the A_{260}/A_{280} nm absorbance ratio, whereas A_{260}/A_{230} nm was used to determine contamination by reagents. Both spectrophotometric measurements constituted criteria for DNA quality assessment with higher values associated with better DNA purity. DNA absorbance was measured at 260 nm to determine de quantity of DNA.

A minimum concentration of 5 ng μL^{-1} DNA in each sample is recommended, since lower than this makes it difficult to standardize PCR or other techniques. Besides, an absorbance ratio at 260 nm and 280 nm of 1.8 is accepted as pure DNA, where proportions lower than this value indicate the presence of proteins, whereas the accepted values of the 260/230 ratio are in the range of 2.0 to 2.2; if the ratio is less, they indicate the presence of contaminants such as carbohydrates or phenol (Demeke and Jenkins, 2010; Viltrop *et al.*, 2010). Therefore, for the evaluations of the six isolation methods, only the DNA samples with the parameters of a minimum concentration of 50 ng μL^{-1} DNA, purity 260/280 minimum of 1.7, and 260/230 minimum of 1.5 were used.

Based on the fact that protocols 2-6 were modified for the isolation of genomic DNA from bull sperm, it was decided to increase the number of replicates for each of these methods to 55, while for method 6, being the one that obtained the best parameters mentioned above, the number of replicates was 100.

DNA visualization on agarose gel

The presence and quality of the DNA samples selected from the six isolation methods were analyzed on 0.8% agarose gel containing 5% ethidium bromide. The gel wells were loaded with 3 μL^{-1} of the DNA solutions plus 3 μL^{-1} of buffer and submitted to electrophoresis on the agarose gel. The gels were then visualized under an UV trans-illuminator (Bio-Rad, UV trans-illuminator 2000), and the images were captured with a Nikon Coolpix B500 camera.

DNA amplification

The DNA isolated from bull sperm by method 5 was used to standardize PCR optimal amplification conditions for β -actin gene (*ACTB* gen). Genomic DNA was amplified by end-point PCR using specific primers for the β -actin gene, designed previously, with the software Oligo® v. 6.8 (Molecular Biology Insight, Inc., Colorado Springs, CO), and whose product is approximately 157 pb. The sequences were the following: forward 5'- CCC ATT GAG CAC GGC ATC GTC 3' and reverse 5'- TCT GGG TCA TCT TCT CAC GGT TGG C 3'.

Método 6

El CTAB sirve como un importante surfactante en el sistema tampón de aislamiento del ADN para eliminar los lípidos de membrana y promover la lisis celular, y porque mantiene la integridad del ADN precipitado durante el aislamiento (Prabha *et al.*, 2013). Por consiguiente, antes del tratamiento con la solución de lisis, el método 5 se modificó para utilizar CTAB al 10% en lugar de SDS para exponer la teca perinuclear. Todos los demás pasos se realizaron según los pasos del método 5.

Concentración y pureza del ADN

Tras el aislamiento del ADN genómico, la pureza y la concentración del ADN genómico aislado por los seis protocolos de aislamiento se midió con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000c (Thermo Fisher Scientific™). La contaminación de las proteínas se midió mediante la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} nm, mientras que la A_{260}/A_{230} nm se utilizó para determinar la contaminación por reactivos. Ambas mediciones espectrofotométricas constituyeron criterios para la evaluación de la calidad del ADN con valores más altos asociados a una mejor pureza del ADN. La absorbancia del ADN se midió a 260 nm para determinar la cantidad de ADN.

Una concentración mínima de 5 ng de ADN μL^{-1} en cada muestra se recomienda, ya que una concentración inferior dificulta la estandarización de la PCR u otras técnicas. Además, se acepta como ADN puro una relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm de 1.8, en la que proporciones inferiores a este valor indican la presencia de proteínas; mientras que los valores aceptados de la relación 260/230 están en el rango de 2.0 a 2.2, y si la relación es menor, indican la presencia de contaminantes como los carbohidratos o el fenol (Demeke y Jenkins, 2010; Viltrop *et al.*, 2010). Por lo tanto, para las siguientes evaluaciones de los seis métodos de aislamiento, sólo se utilizaron las muestras de ADN con los parámetros de una concentración mínima de 50 ng μL^{-1} de ADN, pureza de 260/280 mínimo de 1.7, y 260/230 mínimo de 1.5.

Con base en el hecho de que se modificaron los protocolos 2-6 para el aislamiento del ADN genómico de los espermatozoides de toro, se decidió aumentar el número de réplicas para cada uno de estos métodos a 55, mientras que para el método 6, con el cual se obtuvo los mejores parámetros ya mencionados, el número de réplicas fue 100.

Visualización de ADN en gel de agarosa

La presencia y la calidad de las muestras de ADN seleccionadas de los seis métodos de aislamiento se analizaron en un gel

The primer control included with the Taq DNA polymerase Titanium kit was used as the positive control for all the reactions (forward 5'-CTTGTCTTAATCTTCCTCCTCACG GCA-3' and reverse 5'-TGGCACGGCCATAAGAGGTAGATGTCA-3').

In order to determine the optimal alignment temperature for the β -actin genes, a temperature gradient was performed in which five alignment temperatures of the primers were tested (55, 58, 61, 65, and 68 °C); the optimal proportion of the primers were carried out using different proportions of each primer (forward and reverse). The PCR reaction mix contained 1 U Titanium Taq DNA polymerase, 1x PCR buffer, 0.1 nM dNTP, primers (forward and reverse) at different proportions, five DNA concentrations (200, 100, 50, 25 or 12.3 ng), and sterile ultrapure water to a final volume of 25 μ L⁻¹. Amplification was performed using a thermocycler (Applied Biosystem, 2730 Thermal Cycler) and a PCR program consisting of denaturation at 94 °C for 5 min; 30 cycles of amplification involving denaturation at 94 °C for 30 s; annealing at 55, 58, 61, 65 or 68 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s; and a final extension for 5 min at 72 °C. The success of the PCR with different DNA concentrations from the isolation protocol selected was determined by electrophoresis on 0.8% agarose gel; amplified sperm DNA was visualized under an UV transilluminator after electrophoresis, and the images were captured with a Nikon Coolpix B500 camera.

Once the amplification conditions for the *ACTB* gene were standardized, PCR reactions were performed using each of the samples obtained by the best DNA isolation method. The PCR reaction mixes contained 1x PCR buffer, 0.33 mM dNTP, 0.33 μ M each primer (forward and reverse), 0.33x Titanium Taq DNA polymerase, 3 ng DNA, and sterile ultrapure water to a final volume of 25 μ L⁻¹. Amplification was performed using a PCR program consisting of denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of amplification involving denaturation at 94 °C for 30 s; annealing at 68 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s; and final extension for 5 min at 72 °C. The success of the PCR was determined by electrophoresis on 1.2% agarose gel; amplified sperm DNA was visualized under an UV transilluminator after electrophoresis, and the images were captured with a Nikon Coolpix B500 camera.

Evaluation of DNA isolation efficiency

The method that obtained the highest concentration and the best quality DNA samples was evaluated for efficiency by determining the minimum quantity of sperm required to obtain adequate quantities of DNA (minimum 50 ng μ L⁻¹). One of the frozen sperm control samples was selected at random. The isolation assays were conducted using different concentrations of sperm cells per DNA isolation (0.5, 1, 2.5 and 5 x10⁶ total spermatozoa). The DNA isolated was stored at -20 °C for later quantification and quality evaluation.

de agarosa al 0.8% que contenía 5% de bromuro de etidio. Los pozos del gel se cargaron con 3 μ L⁻¹ de las soluciones de ADN más 3 μ L⁻¹ de amortiguador y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Después, los geles se visualizaron bajo un transiluminador UV (Bio-Rad, UV trans-iluminador 2000), y las imágenes se capturaron con una cámara Nikon Coolpix B500.

Amplificación del ADN

El ADN aislado de espermatozoides de toro por el método 5 se utilizó para estandarizar las condiciones óptimas de amplificación de la PCR para el gen β -actin (gen *ACTB*). El ADN genómico se amplificó por PCR punto final utilizando cebadores específicos para el gen β -actin, diseñado previamente, con el software Oligo® v. 6.8 (Molecular Biology Insight, Inc., Colorado Springs, CO), y cuyo producto es aproximadamente 157 pb. Las secuencias eran las siguientes: Forward 5'- CCC ATT GAG CAC GGC ATC GTC 3' y Reverse 5'- TCT GGG TCA TCT CAC GGT TGG C 3'.

Como testigo positivo de todas las reacciones se usó el primer testigo incluido en el kit de la Titanium Taq ADN polimerasa (Forward 5'-CTTGTCTTAATCTTCCTCCTCACGCA-3' y Reverse 5'-TGGCACGGCCATAAGGTAGATGTCA-3').

Para determinar la temperatura óptima de alineación de los genes β -actin, se realizó un gradiente de temperatura en el que se probaron cinco temperaturas de alineación de los cebadores (55, 58, 61, 65 y 68 °C); la proporción óptima de los cebadores se realizó usando diferentes proporciones de cada cebador (Forward y Reverse). La mezcla de reacción de la PCR contenía 1 U de Titanium Taq ADN polimerasa, 1x amortiguador de PCR, 0.1 nM de dNTP, cebadores (Forward y Reverse) en diferentes proporciones, cinco concentraciones de ADN (200, 100, 50, 25 o 12,3 ng) y agua ultrapura estéril hasta un volumen final de 25 μ L⁻¹. La amplificación se realizó utilizando un termociclador (Applied Biosystem, 2730 Thermal Cycler) y un programa de PCR que consistió en la desnaturalización a 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94 °C durante 30 s; alineamiento a 55, 58, 61, 65 o 68 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 30 s; y una extensión final durante 5 min a 72 °C. El éxito de la PCR con diferentes concentraciones de ADN del protocolo de aislamiento seleccionado se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%; el ADN del esperma amplificado se visualizó bajo un transiluminador UV después de la electroforesis, y las imágenes se capturaron con una cámara Nikon Coolpix B500.

Una vez que se estandarizaron las condiciones de amplificación del gen *ACTB*, se realizaron reacciones de PCR usando cada una de las muestras obtenidas por el mejor método de aislamiento de ADN. Las mezclas de reacción de PCR contenían 1x de amortiguador de PCR, 0.33 mM de dNTP, 0.33 μ M de cada cebador (Forward y Reverse), 0.33x de Titanium Taq ADN

Experimental design

As explained above, six isolation methods were applied to a series of replicates obtained from five ejaculates samples, collected from two different bulls, and used at random in the protocols. Each replicate within a given isolation protocol was considered an experimental unit and at least 25 replicates were prepared for each one of the six tested methods. Thereafter, based on the results of the statistical analysis of DNA concentration and purity, only the best of the protocols was selected in order to assess integrity, presence of PCR inhibitors, and large-scale applicability for long-term storage; replicates were a hundred to assess integrity of the method.

Statistical analysis

A graphical representation of the variables showed that they did not satisfy the normality assumptions and data neither satisfied the conditions to apply an ANOVA. Therefore, a Kruskal-Wallis test was applied to determine if there were differences between the six methods of isolation (Table 1). The response variables were DNA concentration (ng mL^{-1}) and DNA purity (260/280 and 260/230). To correct the p-value, the Dunn test was applied. The results are reported as means \pm SD. The effect of the animal for the analysis was disregarded.

The hypothesis to be tested was: H_0 : All samples come from the same population; H_1 : At least one sample comes from a population with a different distribution. An error probability of $\alpha=0.05$ was used as the level of significance to reject H_0 .

The following model was used to evaluate the six different DNA isolation methods:

$$K = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1)$$

where: R_j^2 : is the total of the j th sample ranching; n_j : is the sample size; k : is the number of samples; N : is the sample size given by: $\sum_{j=1}^k n_j$

The statistic value of the test distributed approximately as a χ^2 with $k-1$ degrees of freedom.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA isolation methods, concentration and purity of DNA

The purpose of DNA isolation techniques is to obtain high concentrations of the nucleic acid with the minimum of degradation and with a degree of

polimerasa, 3 ng de ADN y agua ultrapura estéril hasta un volumen final de $25 \mu\text{L}^{-1}$. La amplificación se realizó mediante un programa de PCR que consistió en la desnaturalización a 94°C durante 5 min; 35 ciclos de amplificación que implicaron la desnaturalización a 94°C durante 30 s; el alineamiento a 68°C durante 30 s, y la extensión a 72°C durante 30 s; y la extensión final durante 5 min a 72°C . El éxito de la PCR se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%; el ADN de los espermatozoides amplificados se visualizó bajo un transiluminador UV después de la electroforesis, y las imágenes se capturaron con una cámara Nikon Coolpix B500.

Evaluación de la eficiencia del aislamiento de ADN

El método que obtuvo las muestras de ADN con la mayor concentración y la mejor calidad se evaluó en eficiencia determinando la cantidad mínima de espermatozoides necesaria para obtener cantidades adecuadas de ADN (mínimo $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Una de las muestras testigo de esperma congelado se seleccionó al azar. Las pruebas de aislamiento se realizaron utilizando diferentes concentraciones de espermatozoides por aislamiento de ADN ($0.5, 1, 2.5$ y 5×10^6 de espermatozoides totales). El ADN aislado se almacenó a -20°C para su posterior cuantificación y evaluación de calidad.

Diseño experimental

Como ya se explicó, se aplicaron seis métodos de aislamiento a una serie de réplicas obtenidas de cinco muestras de eyaculados, recolectadas de dos toros diferentes y utilizadas al azar en los protocolos. Cada réplica dentro de un determinado protocolo de aislamiento se consideró una unidad experimental y se prepararon al menos 25 réplicas para cada uno de los seis métodos ensayados. Después, sobre la base de los resultados del análisis estadístico de la concentración y la pureza del ADN, sólo se seleccionó el mejor de los protocolos para evaluar la integridad, la presencia de inhibidores de la PCR y la aplicabilidad a gran escala para el almacenamiento a largo plazo; se hicieron cien réplicas para evaluar la integridad del método.

Análisis estadístico

Una representación gráfica de las variables mostró que no satisfacían los supuestos de normalidad; los datos tampoco satisfacían las condiciones para aplicar una ANOVA. Por lo tanto, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias entre los seis métodos de aislamiento (Cuadro 1). Las variables de respuesta fueron la concentración de ADN (ng L^{-1}) y la pureza del ADN (260/280 y 260/230). Para corregir el valor

purity that allow to perform molecular biology tests (Silva *et al.*, 2019). When the purity values are in a range of 1.7 to 2.0, the DNA obtained is free of cellular contaminants. Values below 1.7 indicate contamination with proteins, membrane or phenol fractions and values above 2 means that there is dispersed RNA (Demeke and Jenkins, 2010). Many of the methods used for sperm were adapted from standardized protocols for somatic cells or commercial kits; however, special extraction methods are required for sperm (Xavier *et al.*, 2018).

Quantity and purity of the DNA obtained by each of the six isolation methods showed particular trends (Table 2). The spectrometric assay demonstrated that the highest concentrations of DNA were obtained with methods 5, 6, 4, and 3 (in descending order), in which a detergent was used (CTAB in method 6, SDS in method 5 and Brij in method 3 and 4 before the lysis solution).

This variety of detergents are used to remove the membrane of spermatozoa in mammalian sperm; both plasmatic and nuclear membrane and the acrosome, leaving the perinuclear theca (PT) surface exposed (Ferrer *et al.*, 2012). The PT is a detergent resistant capsule that surrounds the mature sperm nucleus as a helmet, which among other functions, offers stability to the nucleus and may be involved in stabilizing the chromatin of sperm (Oko and Sutovsky, 2009; Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011); as a consequence, the treatment with a detergent allowed that the lysis solution (papain proteinase) to act directly on the PT proteins (Katamaya *et al.*, 2005).

p, se aplicó la prueba de Dunn. Los resultados se reportan como media \pm SD. No se tuvo en cuenta el efecto del animal para el análisis.

La hipótesis a probar fue: H_0 : Todas las muestras proceden de la misma población; H_1 : Al menos una muestra procede de una población con una distribución diferente. Una probabilidad de error de $\alpha=0.05$ se utilizó como nivel de significación para rechazar H_0 .

El siguiente modelo se utilizó para evaluar los seis diferentes métodos de aislamiento de ADN:

$$K = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R^2}{n_j} - 3(n+1)$$

donde: R^2 : es el total del ranqueo de la j -ésima muestra; n_j : es el tamaño de la muestra; k : es el número de muestras; N : es el tamaño de la muestra dado por: $\sum_{j=1}^k n_j$

El estadístico de prueba se distribuyó aproximadamente como una χ^2 con $k-1$ grados de libertad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Métodos de aislamiento del ADN, concentración y pureza del ADN

La finalidad de las técnicas de aislamiento del ADN es obtener altas concentraciones de ácido nucleico con un mínimo de degradación y con un grado de pureza que permita realizar pruebas de biología molecular (Silva *et al.*, 2019). Cuando los valores de pureza se encuentran en un rango de 1.7 a 2.0, el ADN obtenido está libre de contaminantes celulares.

Table 2. Comparison of the six genomic methods to isolate bull sperm DNA using concentration, purity (260/280 nm y 260/230 nm) and efficiency (time) by spectrophotometry.

Cuadro 2. Comparación de los seis métodos genómicos para aislar el ADN de espermatozoides de toro mediante concentración, pureza (260/280 nm y 260/230 nm) y eficiencia (tiempo) por espectrofotometría.

Method	Isolations (n)	DNA concentration (ng μ L ⁻¹)	DNA purity (260/280)	DNA purity (260/230)	Time
1	25	62.1 \pm 34.9 a	1.32 \pm 0.2 a	1.71 \pm 0.2 a	2 d
2	55	104.6 \pm 46.6 ab	1.39 \pm 0.3 a	1.32 \pm 0.1 b	95 min
3	55	118.9 \pm 42.6 b	1.45 \pm 0.2 a	1.35 \pm 0.1 b	70 min
4	55	135.6 \pm 72.4 b	1.59 \pm 0.3 b	1.28 \pm 0.4 b	70 min
5	55	305.3 \pm 190.2 c	1.33 \pm 0.3 a	0.68 \pm 0.3 c	80 min
6	100	152.3 \pm 67.6 b	1.75 \pm 0.07 c	1.65 \pm 0.1 ab	80 min

a-c: Means with different letters in a row indicate statistical difference ($p \leq 0.05$). ♦ Las medias con letras diferentes en una hilera indican la diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

Likewise, the use of DTT and heparin allowed recovery of a larger quantity of better-quality DNA. DTT, a S-S links reducing agent, acts on the bisulfate bridges and heparin, a reagent that competes with the DNA at binding to protamines, the reagent adheres to these proteins, which are sequestered and eliminated by washing without contaminating the DNA samples (Felipe-Pérez *et al.*, 2012); and the use of a second detergent (SDS) could allow denaturation of the captured protamines and any other lipid or protein contaminant present in the medium, thus, the DNA (Mariyam and Preetha, 2020). The effectiveness of CTAB was evaluated in other studies; thus, Lander *et al.* (2002) indicated that the detergent bonds strongly to the DNA, displaces the proteins, and prevents its degradation.

In our study, the quantity of DNA isolated from sperm samples was higher for the protocol 5, but the yields for the methods 3, 4, and 6 were greater than for the original (method 1). Nevertheless, method 6 was the only method that provided purity values adequate, near the standard value ($260/280: 1.75 \pm 0.07$) for PCR assays, which indicates that the obtained material is free of contaminants that could interfere with the reactions (Alarcón-Zúñiga *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019). In this regard, DNA is considered to be pure when the A_{260} / A_{230} ratio is around 1.5-2.2. A ratio less than 1.5 could indicate the presence of contaminants in the sample such as salts, carbohydrates or others. However, it must be considered that this measurement may be misleading by a low concentration of DNA in the sample, since the concentration of salts present in the resuspension buffer would be overestimated (Viltrop *et al.*, 2010).

Now it is known that DNA quantification using fluorometers is more accurate; therefore, measurements with fluorescent dyes such as Pico Green, which binds to dsDNA and increases the fluorescent signal, and extrapolation via a standard curve is recommended (Schablitsky *et al.*, 2019). Based on our results, method 6 was tested with sperm samples from fresh ejaculates to verify its effectiveness for the treatment of the spermatid cells. Purity (A_{260} / A_{280} and A_{260} / A_{230}) remained constant, but yield was lower than for extraction from thawed semen (Table 3). This statistically significant difference is attributed to the fact that the frozen spermatozoa undergo damages and alterations in their structure, as shown by Gutiérrez-Pérez *et al.* (2011) and Felipe-Pérez *et al.* (2012).

Los valores inferiores a 1.7 indican contaminación con proteínas, fracciones de membrana o fenol y los valores superiores a 2 significan que hay ARN disperso (Demeke y Jenkins, 2010). Muchos de los métodos utilizados para el esperma se adaptaron a partir de protocolos estandarizados para células somáticas o kits comerciales; sin embargo, se requieren métodos de extracción especiales para el esperma (Xavier *et al.*, 2018).

La cantidad y la pureza del ADN obtenido por cada uno de los seis métodos de aislamiento mostraron tendencias particulares (Cuadro 2). La prueba espectrométrica demostró que las mayores concentraciones de ADN se obtuvieron con los métodos 5, 6, 4 y 3 (en orden descendente), en los que se utilizó un detergente (CTAB en el método 6, SDS en el método 5 y Brij en los métodos 3 y 4 antes de la solución de lisis).

Esta variedad de detergentes se utiliza para eliminar la membrana de los espermatozoides en los espermatozoides de mamíferos; tanto la membrana plasmática como la nuclear y el acrosoma, dejando expuesta la superficie de la teca perinuclear (PT) (Ferrer *et al.*, 2012). La PT es una cápsula resistente a los detergentes que rodea el núcleo del espermatozoide maduro a modo de casco, que entre otras funciones ofrece estabilidad al núcleo y puede estar involucrada en la estabilización de la cromatina del espermatozoide (Oko y Sutovsky, 2009; Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011); en consecuencia, el tratamiento con un detergente permitió que la solución de lisis (proteínasa papaína) actuara directamente sobre las proteínas de la PT (Katamaya *et al.*, 2005).

Asimismo, el uso de DTT y heparina permitió la recuperación de una mayor cantidad de ADN de mejor calidad. El DTT, un agente reductor de enlaces S-S, actúa sobre los puentes de bisulfuro y la heparina, un reactivo que compite con el ADN al unirse a las protaminas, el reactivo se adhiere a estas proteínas, que son secuestradas y eliminadas por lavado sin contaminar las muestras de ADN (Felipe-Pérez *et al.*, 2012); y el uso de un segundo detergente (SDS) podría permitir la desnaturalización de las protaminas capturadas y de cualquier otro contaminante lipídico o proteínico presente en el medio, así el ADN se purifica (Mariyam y Preetha, 2020). La eficacia del CTAB se evaluó en diversos estudios; thus, Lander *et al.*, (2002) indicaron que el detergente se adhiere fuertemente al ADN, desplaza las proteínas e impide su degradación.

Table 3. Concentration and quality of DNA isolated from freshly ejaculated bull sperm compared with that extracted from frozen sperm.
Cuadro 3. Concentración y calidad del ADN aislado de espermatozoides de toro recién eyaculados comparado con el ADN extraído de espermatozoides congelados.

Sample	Isolations	Concentration DNA (ng μ L ⁻¹)	DNA purity (260/280)	DNA purity (260/230)
Thawed Semen	100	152.4 \pm 67.6 a	1.75 \pm 0.07 a	1.65 \pm 0.13 a
Fresh Semen	55	62.3 \pm 35.7 b	1.73 \pm 0.05 a	1.62 \pm 0.17 a

a,b: Means with different letters in a row are statistically different ($p \leq 0.05$). ♦ Las medias con letras diferentes en una hilera indican una diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

Silva *et al.* (2019), in order to increase the DNA yield, changed the final step of the Qiagen QiaAmp manufacturer protocol by increasing the time of elution from 5 min in room temperature to 24 h in freezer (1.38 *vs.* 3.46 ng μ L⁻¹), which possibly made this type of cells more sensitive to the treatment with detergents and solutions for the extraction of the genetic material. However, in our study the yield obtained from fresh sperm was of good quality and it is considered that the technique can be used to extract DNA from this type of samples without making modifications. If higher DNA concentrations were required, the recommendation would be to work with a larger amount of sperm or dilute the extracted genetic material in a smaller amount of buffer.

DNA visualization on agarose gel

DNA was observed in 0.8% agarose gel in all the samples extracted with the protocol 6 (Figure 1). The quality of bands obtained indicates that the DNA is not fragmented, which shows that the method 6 allows to obtain complete DNA, and therefore it is suitable for use in molecular biology tests, such as PCR (Silva *et al.*, 2019).

DNA amplification

Results showed that the best amplification was at 68 °C, and when the primer mixture was composed of a 1:1 ratio of each (forward and reverse). Thus, with these standardized amplification conditions the DNA samples isolated with method 6 were evaluated to determine the presence of inhibiting substances by means of PCR reactions using the *b-actin* gene. The 154-bp fragment of the β -*actin* gene was amplified

En este estudio, la cantidad de ADN aislado de muestras de esperma fue mayor para el protocolo 5, pero los rendimientos de los métodos 3, 4 y 6 fueron mayores que los del original (método 1). No obstante, el método 6 fue el único que proporcionó valores de pureza adecuados, cercanos al valor estándar (260/280: 1,75 \pm 0,07) para las pruebas de PCR, y esto indica que el material obtenido está libre de contaminantes que podrían interferir en las reacciones (Alarcón-Zúñiga *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019). Al respecto, se considera que el ADN es puro cuando la relación A260 / 230 es alrededor de 1.5-2.2. Una relación inferior a 1.5 podría ser indicativa de la presencia de contaminantes en la muestra, como sales, carbohidratos u otros. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta medición puede ser engañosa por una baja concentración de ADN en la muestra, ya que la concentración de sales presentes en el amortiguador de resuspensión estaría sobreestimada (Viltrop *et al.*, 2010).

Ahora se sabe que la cuantificación del ADN mediante fluorómetros es más precisa, por lo que se recomiendan las mediciones con colorantes fluorescentes como el Pico Green, que se une al ADN y aumenta la señal fluorescente, y se recomienda la extrapolación mediante una curva estándar (Schablitsky *et al.*, 2019). Con base en los resultados, el método 6 se probó con muestras de esperma de eyaculados frescos para verificar su eficacia para el tratamiento de las células espermáticas. La pureza (A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}) permaneció constante, pero el rendimiento fue menor que el de la extracción de semen descongelado (Cuadro 3). Esta diferencia estadísticamente significativa se atribuye a que los espermatozoides congelados sufren daños y alteraciones en su estructura, como lo demuestran Gutiérrez-Pérez *et al.* (2011) y Felipe-Pérez *et al.* (2012).

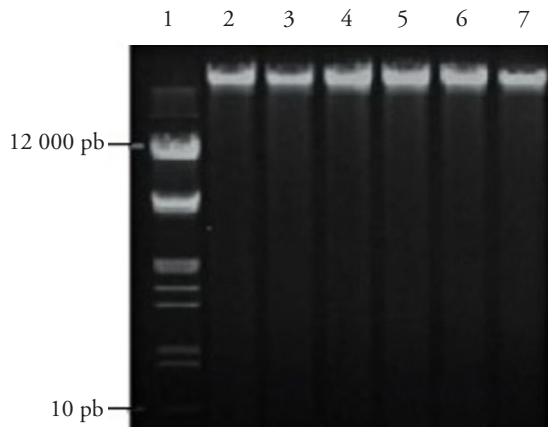


Figure 1. Representative results of 0.8% agarose gel electrophoresis of genomic DNA samples from frozen samples of bull sperm extracted by method 6 ($3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Lane 1 corresponds to the molecular weight marker. Lanes 2 to 7 correspond to randomly selected DNA samples.

Figura 1. Resultados representativos de la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las muestras de ADN genómico de muestras congeladas de espermatozoides de toro extraídas por el método 6 ($3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2 a 7 corresponden a las muestras de ADN seleccionadas al azar.

from the DNA samples isolated with this method (Figure 2), and indicated that this method obtains DNA free of PCR-inhibiting substances. There are reports which show that DNA contamination and its degradation influence the results of PCR assays mainly causing large fluctuations in the analytical measurements and the repeatability of the results.

Con el fin de aumentar el rendimiento de ADN, Silva *et al.* (2019) cambiaron el último paso del protocolo de fabricación de Qiagen QiaAmp al pasar el tiempo de elución de 5 min a temperatura ambiente a 24 h en el congelador ($1.38 \text{ vs } 3.46 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); lo que posiblemente hizo que este tipo de células fueran más sensibles al tratamiento con detergentes y soluciones para la extracción del material genético. Sin embargo, en nuestro estudio el rendimiento obtenido de los espermatozoides frescos fue de buena calidad y se considera que la técnica se puede utilizar para extraer ADN de este tipo de muestras sin necesidad de hacer modificaciones. Si se requiriesen mayores concentraciones de ADN, la recomendación sería trabajar con una mayor cantidad de espermatozoides o diluir el material genético extraído en una menor cantidad de amortiguador.

Visualización de ADN en gel de agarosa

ADN se observó en el gel de agarosa al 0.8% en todas las muestras extraídas con el protocolo 6 (Figura 1). La calidad de las bandas formadas indica que el ADN no está fragmentado, lo cual demuestra que el método 6 permite obtener un ADN completo, y por lo tanto es adecuado para su uso en pruebas de biología molecular, como la PCR (Silva *et al.*, 2019).

Amplificación de ADN

Los resultados mostraron que la mejor amplificación era a los $68 \text{ }^\circ\text{C}$, y cuando la mezcla del cebador



Figure 2. PCR products obtained by 1.2% agarose gel electrophoresis, amplified using of *b-actin* primers, and DNA isolated from frozen semen sample with method 6. Lane 1 corresponds to the molecular weight marker. Lanes 2-13 correspond to the products of amplification of the *β -actin* gene using 13 different DNA samples. Lane 14 corresponds to the amplification of the control gene contained in the amplification kit.

Figura 2. Productos de PCR obtenidos por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, amplificados con cebadores de *b-actin*, y ADN aislado de una muestra de semen congelado con el método 6. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2-13 corresponden a los productos de la amplificación del gen *β -actin* utilizando 13 muestras diferentes de ADN. El carril 14 corresponde a la amplificación del gen testigo contenido en el kit de amplificación.

Therefore, the standardization of the optimal amplification conditions is prevented (Xavier *et al.*, 2018). Demeke and Jenkins (2010) showed that when CTAB is used, low A_{260}/A_{230} ratios are obtained, assuming contamination with cell components, such as polysaccharides that can inhibit PCR reactions. However, in our study, A_{260}/A_{230} quality (1.65 ± 0.01) met the minimum values that allow consideration of the isolated DNA samples as suitable for use in PCR assays (Cotton and Fisher, 2015).

Evaluation of DNA isolation efficiency

The average of each four concentrations of sperm (0.5 , 1 , 2.5 and 5×10^6) were used to evaluate isolation efficiency of method 6, and DNA concentration and quality were verified (Table 4). It is worth mentioning that the features of high yield and high purity of DNA extraction procedures do not necessarily go hand-in-hand. For example, Chelex® extraction is a one tube procedure with a high DNA yield (since no volume is lost or removed), but it might have low purity since any contaminants, not bound by the Chelex resin, are not removed from the DNA in solution.

In contrast, methods such as phenol chloroform extraction or use of silica beads result in higher purity samples, since many contaminants are completely removed. However, lower yields likely result since 100% of the available starting DNA cannot be recovered (Cotton and Fisher, 2015). Based on their recommendation, we used at least 1×10^6 sperm cells for DNA isolation. Because of the variables with statistical differences, we could remark that at least two groups among those compared were statistically different.

estaba compuesta por una proporción de 1:1 de cada uno (Forward y Reverse). Así pues, con estas condiciones de amplificación normalizadas se evaluaron las muestras de ADN aisladas con el método 6 para determinar la presencia de sustancias inhibitoras mediante reacciones de PCR utilizando el gen β -actin. El fragmento de 154 pb del gen β -actin se amplificó a partir de las muestras de ADN aisladas con este método (Figura 2), lo cual indica que este método obtiene ADN libre de sustancias inhibitoras de la PCR. Algunos informes indican que la contaminación del ADN y su degradación influyen en los resultados de las pruebas de PCR, causando principalmente grandes fluctuaciones en las mediciones analíticas y en la repetibilidad de los resultados. Por lo tanto, se impide la normalización de las condiciones óptimas de amplificación (Xavier *et al.*, 2018). Demeke y Jenkins (2010) indicaron que cuando se utiliza el CTAB se obtienen bajas proporciones de A_{260}/A_{230} , y se asume que hay contaminación con componentes celulares, como los polisacáridos que pueden inhibir las reacciones de PCR. Sin embargo, en nuestro estudio, la calidad A_{260}/A_{230} (1.65 ± 0.01) cumplía los valores mínimos que permiten considerar las muestras de ADN aisladas como aptas para su uso en pruebas de PCR (Cotton y Fisher, 2015).

Evaluación de la eficiencia del aislamiento del ADN

El promedio de cada cuatro concentraciones de espermatozoides (0.5 , 1 , 2.5 y 5×10^6) se utilizó para evaluar la eficiencia del aislamiento del método 6, y se verificaron la concentración y la calidad del ADN (Tabla 4). Cabe mencionar que las características de

Table 4. Comparison of the concentration and quality of DNA isolated from bovine spermatozoa at different cell concentrations.

Cuadro 4. Comparación de la concentración y calidad del ADN aislado de espermatozoides de bovinos en diferentes concentraciones celulares.

Total sperms x 10^6	ng μ L ⁻¹	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
0.5	37.0a	1.73 a	1.59 a
1.0	76.5b	1.60 a	1.71 a
2.5	134.6c	1.70 a	1.66 a
5.0	233.8d	1.72 a	1.63 a

a-d: Means with different letters indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

♦ Medias con letra diferente indican la diferencia estadística ($p \leq 0.05$).

Long-term DNA storage

At the end, based on the overall evaluation discussed above, and considering that an efficient DNA conservation depends on storage temperatures, composition of storage buffer, ionic strength, purity of DNA, length of DNA, presence of metal ions, among other factors (Mariyam and Preetha, 2020), we decided to evaluate the stability of the DNA isolated on samples of DNA stored by 1) 0 days, 2) 1 month, 3) 3 months, and 4) 6 months. With those samples we run electrophoresis in 0.8% agarose gel. Results showed that the integrity of the DNA was conserved for at least 6 months (Figure 3). In this study, the isolated sperm DNA was stored at -20°C in PBS.

Also, we decided to verify if the stored DNA not was contaminated with PCR inhibiting substances; therefore, a PCR reaction was performed with the β -actin gene. Electrophoresis of the amplified products showed that during storage the samples remained stable for at least 6 months, suitable for use in PCR reactions after 6 months of storage at -20°C (Figure 4).

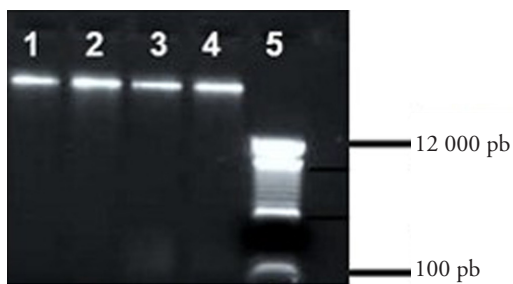


Figure 3. Electrophoresis in 0.8% agarose gel of genomic DNA isolated (3 ng) from bull sperm frozen and stored. Lane 1 corresponds to the not stored sample of DNA; Lane 2 corresponds to a sample stored for 1 month; Lane 3 corresponds to a sample stored for 3 months; Lane 4 corresponds to a sample stored 6 months; and Lane 5 corresponds to the molecular weight markers.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de ADN genómico aislado (3 ng) de esperma de toro congelado y almacenado. El carril 1 corresponde a la muestra de ADN no almacenada; el carril 2 corresponde a una muestra almacenada durante 1 mes; el carril 3 corresponde a una muestra almacenada durante 3 meses; el carril 4 corresponde a una muestra almacenada durante 6 meses; y el carril 5 corresponde a los marcadores de peso molecular.

alto rendimiento y alta pureza de los procedimientos de extracción de ADN no van necesariamente de la mano. Por ejemplo, la extracción de Chelex[®] es un procedimiento de un tubo que tiene un alto rendimiento de ADN (ya que no se pierde ni se elimina ningún volumen) pero que posiblemente tenga una baja pureza ya que los contaminantes, no ligados por la resina Chelex, no se eliminan del ADN en solución.

En contraste, métodos como la extracción de cloroformo fenol o el uso de perlas de sílice dan como resultado muestras de mayor pureza, ya que muchos contaminantes se eliminan por completo. Sin embargo, es probable que el rendimiento sea menor, ya que no se puede recuperar el 100% del ADN inicial disponible (Cotton y Fisher, 2015). Basándonos en su recomendación, utilizamos al menos 1×10^6 espermatozoides para el aislamiento del ADN. Debido a las variables con diferencia estadística pudimos observar que al menos dos grupos entre los comparados eran estadísticamente diferentes.

Almacenamiento del ADN a largo plazo

Al final, sobre la base de la evaluación general antes mencionada, y al considerar que una conservación eficiente del ADN depende de las temperaturas de almacenamiento, la composición del amortiguador de almacenamiento, la fuerza iónica, la pureza del ADN, la longitud del ADN, la presencia de iones metálicos, entre otros factores (Mariyam y Preetha, 2020), decidimos evaluar la estabilidad del ADN aislado en muestras de ADN almacenadas por 1) 0 días, 2) 1 mes, 3) 3 meses, y 4) 6 meses. Con esas muestras realizamos la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Los resultados mostraron que la integridad del ADN se conservó durante al menos 6 meses (Figura 3). En este estudio, el ADN del esperma aislado se almacenó a -20°C en PBS.

Además, decidimos verificar si el ADN almacenado no estaba contaminado con sustancias inhibitoras de la PCR; por lo tanto, se realizó una reacción de PCR con el gen β -actin. La electroforesis de los productos amplificados mostró que durante el almacenamiento las muestras se mantuvieron estables durante al menos 6 meses, aptas para ser utilizadas en reacciones de PCR después de 6 meses de almacenamiento a -20°C (Figura 4).

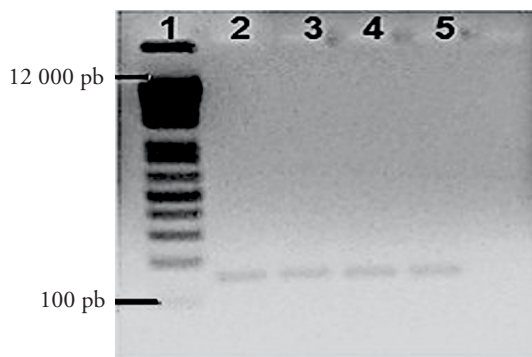


Figure 4. Electrophoresis in 1.2% agarose gel of the amplification products of 4 genomic DNA samples extracted from stored frozen bull sperm. Lane: 1, molecular weight markers; Lane 2, amplification products of the not stored DNA sample; Lane 3, amplification products of a sample stored for 1 month; Lane 4, amplification products of a sample stored for 3 months; Lane 5, amplification products of a sample stored for 6 months.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos de amplificación de 4 muestras genómicas de ADN extraídas de esperma de toro congelado y almacenado. Carril: 1, marcadores de peso molecular; Carril 2, productos de amplificación de la muestra de ADN no almacenada; Carril 3, productos de amplificación de una muestra almacenada durante 1 mes; Carril 4, productos de amplificación de una muestra almacenada durante 3 meses; Carril 5, productos de amplificación de una muestra almacenada durante 6 meses.

Processing time and cost

Processing time for each sample is found in Table 2, and the results showed that protocol six yielded DNA of good quality and quantity in 80 min. The cost of this protocol including only material was \$0.3 USD (\$6.35 MXN) per sample. Therefore, the standardized protocol, in addition to allowing the isolation of bull sperm DNA of optimal quality and concentrations, is also a low-cost method. Usman *et al.* (2014) showed that with the Modified Nucleospin Blood Genomic commercial kit was \$2.76 USD (\$58.43 MXN). per sample, the use of commercial kits increases the cost per extraction almost 10 times. In addition, they are designed for the isolation of somatic cell DNA.

Psifidi *et al.* (2015) used blood samples and eleven methods for genomic DNA isolation and found that in addition to the most common problem when blood or tissue extraction kits are used, the isolation of DNA concentration is less than that required

Tiempo de procesamiento y costo

El tiempo de procesamiento de cada muestra está en el cuadro 2, y los resultados mostraron que el protocolo seis producía ADN de buena calidad y cantidad en 80 min. El costo de este protocolo incluyendo sólo el material fue \$0.3 USD (\$6.35 MXN) por muestra. Por lo tanto, el protocolo estandarizado, además de permitir el aislamiento de ADN de espermatozoides de toro de óptima calidad y concentración, es también un método de bajo costo. Usman *et al.*, (2014) demostraron que con el kit comercial Modified Nucleospin Blood Genomic el costo fue \$2.76 USD (\$58.43 MXN) por muestra; el uso de kits comerciales aumenta el costo por extracción casi 10 veces. Además, están diseñados para el aislamiento del ADN de las células somáticas.

Al utilizar muestras de sangre y once métodos para el aislamiento del ADN genómico, Psifidi *et al.* (2015) mencionaron que además del problema más común cuando se utilizan equipos de extracción de sangre o tejidos, se produce el aislamiento de una concentración de ADN menor que la requerida; y los equipos de extracción son bastante costosos. Además, encontraron una deficiencia en cuanto a la pureza del extracto. Al evitar las columnas de centrifugado prefabricadas, Huynh *et al.* (2019) describieron un protocolo que reduce el costo al utilizar la capacidad de unión de la sílice al ADN en presencia de sales caotrópicas. Sin embargo, no mencionaron el costo por muestra. Además, el costo estimado del procesamiento de una muestra por el método de fenol-cloroformo es alrededor de \$5.00 USD (\$105.84 MXN) por muestra. Las muestras de ADN extraídas son de mayor pureza que otros métodos convencionales, pero de menor pureza que las obtenidas por el método de columnas (Mariyam y Preetha, 2020).

CONCLUSIONES

En este estudio se diseñó, optimizó y probó un método específico, rápido y económico de extracción de ADN de espermatozoides de toro aplicable a muestras más pequeñas a partir de varias combinaciones de detergentes y sustancias descondensantes. Las muestras obtenidas fueron adecuadas para el análisis por PCR.

El protocolo diseñado consideró las características estructurales de los espermatozoides. Así pues, se

and extraction kits are quite expensive; besides, they found a shortcoming regarding the purity of the extract. Huynh *et al.* (2019), avoiding pre-made spin columns, described a protocol that reduces the cost by utilizing the DNA binding capacity of silica in the presence of chaotropic salts; however, they did not record the cost per sample. Besides, the estimated cost for processing a sample by the phenol-chloroform method is around \$5.00 USD (\$105.84 MXN) per sample. Extracted DNA samples are higher in purity than other conventional methods, but lower than those obtained using columns methods (Mariyam and Preetha, 2020).

CONCLUSIONS

In this study, a specific, fast, inexpensive method for extracting DNA from bull sperm applicable for smaller samples was designed, optimized and tested from several combinations of detergents and de-condensing substances. Samples obtained were suitable for PCR analysis.

The designed protocol maintained the structural characteristics of spermatozoa. Thus, our aim was fulfilled in finding a protocol that is inexpensive, quick and efficient to isolate bull sperm DNA. Stored samples up to half a year rendered the same values, pure enough to be used in PCR assays.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos y Proyectos Académicos (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) through the grant PAPIIT IN219717.

LITERATURE CITED

Alarcón-Zúñiga, B., J. L., Zepeda-Batista, A. Ruíz-Flores, L. J. Gómez-Meza, J. G. García-Muñiz, R. Núñez-Domínguez, R. Ramírez-Valverde, and I. Villegas-Velázquez. 2016. Modificación del método de tiocianato de guanidina para extraer ADN de semen para análisis genómico en mamíferos. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 7: 405-413.

Chandler, J. E., T. M. Taylor, A. L. Canal, R. K. Cooper, E. B. Moser, M. E. McCormick, S. T. Willard, H. E. Rycroft, and G. R. Gilbert. 2007. Calving sex ratio as related to the predicted Y-chromosome-bearing spermatozoa ratio in bull ejaculates. *Theriogenesis* 67: 563-71.

Cotton, R. W., and M. B. Fisher. 2015. Review: Properties of sperm and seminal fluid, informed by research on

cumplió nuestro objetivo de encontrar un protocolo económico, rápido y eficaz para aislar el ADN de los espermatozoides del toro. Las muestras almacenadas hasta medio año mostraron los mismos valores, lo suficientemente puros para utilizarse en las pruebas de PCR.

—Fin de la versión en Español—

---*---

reproduction and contraception. *Forensic Sci. Int. Genet.* 18:66-77.

Demeke, T., and G. R. Jenkins. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 1977-1990.

Eychner, A. M., R. J. Lebo, and K. M. Elkins. 2015. Comparison of proteases in DNA extraction via qPCR. *Anal. Biochem.* 478: 128-130.

Felipe-Pérez, Y. E., J. Valencia M., M. L. Juárez-Mosqueda, N. Pescador, A. L. Roa-Espitia, and E. O. Hernández-González. 2012. Cytoskeletal proteins F-actin and β -dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm. *Cryobiology* 64: 103-109.

Ferrer, M., W. Xu, and R. Oko. 2012. The composition, protein genesis and significance of the inner acrosomal membrane of eutherian sperm. *Cell Tissue Res.* 349: 733-74.

Fu, Q., M. Zhang, W. S. Qin, Y. Q. Lu, H. Y. Zheng, B. Meng, S. S. Lu, and K. H. Lu. 2007. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. *Theriogenology* 68: 1211-1218.

Griffin J. 2013. Methods of sperm DNA extraction for genetic and epigenetic studies. *Methods Mol. Biol.* 927: 379-384.

Gutiérrez-Pérez, O., M. L. Juárez-Mosqueda, D. Mota, and M. E. Trujillo. 2011. The disruption in actin-perinuclear theca interactions is related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology* 62: 32-39.

Huynh, O. A., J. Jankowicz-Cieslak, B. Saraye, B. Hofinger, and B. J. Till. 2017. Low-cost methods for DNA extraction and quantification. *In: Jankowicz-Cieslak J. (ed). Biotechnologies for Plant Mutation Breeding.* Chapter 14. International Atomic Energy Agency, Vienna. pp: 227-239.

Johnson, G. D., P. Mackie, M. Jodar, S. Moskovtsev, A. Stephen, and S. A. Krawetz. 2015. Chromatin and extracellular vesicle associated sperm RNAs. *Nucleic Acids Res.* 43: 6847-6859.

Lander, R., J. A. Michael, F. J. Winters, B. C. Meacle, and A. L. Buckland. 2002. Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB. *Biotechnol. Bioeng.* 79: 776-784.

Mariyam, D., M., and J. S. Preetha. 2020. The evolution of DNA extraction methods. *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 8:39-45.

Oko, R., and P. Sutovsky. 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 83: 2-7.

- Pacheco, S. E., E. A. Houseman, B. C. Christensen, C. J. Marsit, K. T. Kelsey, M. Sigman, and K. Boekelheide. 2011. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PloS One* 6: e20280.
- Psifidi, A., C. I. Dovas, G. Bramis, T. Lazou, C. L. Russel, G. Arsenos, and G. Banos. 2015. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PloS One*. 10: e115960.
- Prabha, T. R., K. Revathi, M. S. Vinod, S. P. Shanthumar, and P. Bernard. 2013. A simple method for total genomic DNA extraction from water mould. *Curr. Sci.* 14: 345-347.
- Sarova, N., S. Ahlawat, A. Grewal, R. Sharma, and R. Arora. 2018. Differential promoter methylation of DAZL gene in bulls with varying seminal parameters. *Reprod. Dom. Anim.* 53: 914-920.
- Serra O., R. Frazzi, A. Perotti, L. Barusi, and A. Buschini. 2018. Use of classic cards for epigenetic analysis of sperm DNA. *Biotechniques* 64: 45-51.
- Silva E., C. B., M. A. Pelinca, A. C. Acosta, M. F. Silva D., M. A. Gomes F, and M. P. Guerra M. 2014. Comparative study of DNA extraction methodologies from goat sperm and its effects on polymerase chain reaction analysis. *Genet. Mol. Res.* 13: 6070-6078.
- Silva, P. C., M. C. Malabarba, R. Vari, and L. R. Malabarba. 2019. Comparison and optimization for DNA extraction of archived fish specimens. *MethodsX* 6: 1433-1442.
- Schablitsky, M., K. E. Witt, J. R. Madrigal, M. R. Ellegaard, R. S. Malhi, and H. Schroeder. 2019. Ancient DNA analysis of a nineteenth century tobacco pipe from a Maryland slave quarter. *J. Archaeol. Sci.* 105:11-18.
- Sutovsky, P., R. Oko, L. Hewitson, and G. Schatten. 1997. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev. Bio.* 188: 75-84.
- Ukogu, O. A., A. D. Smith, L. M. Devenica, H. Bediako, R. B. McMillan, Y. Ma, A. Balaji, R. D. Schwab, S. Anwar, M. Dasgupta, and A. R. Carter. 2020. Protamine loops DNA in multiple steps. *Nucleic Acids Res.* 48: 6108-6119.
- Usman, T., Y. Yu, C. Liu, Z. Fan, and Y. Wang. 2014. Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. *Genet Mol Res* 13: 3319-3328.
- Viltrop, T., K. Krjutskov, P. Palta, and A. Metspalu. 2010. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 398: 260-262.
- Ward, W. S. 2018. Organization of sperm DNA by the nuclear matrix. *Am J Clin Exp Urol* 6: 87-92.
- Wu, H., M. K. de Ganes, G. Lucheti, and R. Pilsner. 2015. Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA. *Biotechniques.* 58: 293-300.
- Xavier, M. J., B. Nixon, S. D. Roman, and R. J. Aitken. 2018. Improved methods of DNA extraction from human spermatozoa that mitigate experimentally-induced oxidative DNA damage. *PLoS One* 13: e0195003.

