

# Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp.

María Esther Sansinforiano, Araceli Rabasco, Margarita Martínez-Trancón, Juan Carlos Parejo, Miguel Hermoso de Mendoza y José Ángel Padilla

Departamento de Genética y Departamento de Patología Infecciosa, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España

## Resumen

En este trabajo se han determinado las condiciones óptimas de la reacción RAPD a fin de obtener marcadores genéticos moleculares que permitan identificar rápida y correctamente *Cryptococcus* spp. y *Candida* spp. Se ha modificado la composición de la mezcla de reacción (cantidad de ADN molde y ADN polimerasa, concentración de  $Cl_2Mg$ , dNTPs y cebador), y las condiciones de amplificación (tiempo de desnaturalización, temperatura y tiempo de hibridación, tiempo de extensión y número de ciclos), obteniéndose unos patrones de amplificación claros y reproducibles.

## Palabras clave

Optimización, RAPD-PCR, *Candida*, *Cryptococcus*

## Optimization of the conditions for RAPD-PCR of *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp.

## Summary

In this study, we determined the optimal RAPD amplification conditions to obtain genetic molecular markers for the rapid and accurate identification of *Cryptococcus* spp. and *Candida* spp. The following parameters are modified: template DNA, DNA polymerase,  $Cl_2Mg$  and primer concentration; denaturation, annealing and extension time, temperature of annealing and thermal cycles. After the optimization, reliable and reproducible RAPD patterns are obtained.

## Key words

Optimization, RAPD-PCR, *Candida*, *Cryptococcus*

La criptococosis es una enfermedad infecciosa que afecta a animales domésticos, silvestres y al hombre, provocando cuadros neumónicos y/o meningoencefalíticos, a menudo mortales. Este trabajo forma parte de un estudio encaminado a la obtención de marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para la identificación de *Cryptococcus neoformans* y otras levaduras patógenas encapsuladas con fines de diagnóstico clínico y estudios epidemiológicos.

La amplificación al azar del ADN polimórfico [1,2] se ha utilizado para desarrollar marcadores genéticos en distintas especies [3-5] y para discriminar entre variedades y aislamientos de levaduras patógenas [6,7].

Mediante esta técnica se han podido diferenciar los distintos serotipos de *C. neoformans* var. *neoformans* y de *C. neoformans* var. *gattii* [8,9], así como entre *Candida* spp. [10,11]. La técnica RAPD se ha utilizado con éxito en estudios epidemiológicos de criptococosis que han revelado su distribución geográfica y las relaciones entre aislamientos clínicos y ambientales [12,13].

El número de fragmentos RAPD, la intensidad de amplificación y la reproducibilidad de los resultados dependen tanto de las condiciones de amplificación como de los componentes de la mezcla de reacción. De estas limitaciones se deduce la necesidad de someter esta técnica a un proceso de puesta a punto, en el que se definan las condiciones bajo las cuales los patrones obtenidos sean fiables y reproducibles.

La optimización de la técnica se ha realizado aplicando la metodología RAPD a mezclas (*pools*) de ADN, constituidas por representantes de cada categoría taxonómica, de manera que se pueden poner de manifiesto las diferencias que existen entre las mezclas, al mismo tiempo que se enmascara la variabilidad común a las mismas [14].

En este trabajo se han determinado las condiciones óptimas de las reacciones RAPD en *Cryptococcus* spp. y *Candida* spp. para obtener marcadores genéticos moleculares que permitan identificar rápida y correctamente a estos agentes patógenos.

## Dirección para correspondencia:

Dra. Araceli Rabasco Mangas  
Departamento de Genética,  
Facultad de Veterinaria,  
Avda. Universidad s/n  
10071 Cáceres, España  
Tel.: +34 927 25 71 49  
Fax: +34 927 25 71 10  
E-mail: arabasco@unex.es

Aceptado para publicación el 4 de Mayo de 2001

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado siete especies del género *Candida* y diez especies del género *Cryptococcus*, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) y del Prince Leopold Institute of Tropical Medicine (Antwerp, Bélgica) (Tabla 1). La extracción del ADN se realizó siguiendo la metodología descrita por Sansinforiano *et al.* [15] hasta obtener una concentración de 20 ng/μl. Posteriormente se elaboraron dos mezclas (*pools*) de ADN, añadiendo igual cantidad de cada uno de los ADNs de las especies representativas de cada género.

**Tabla 1.** Cepas tipo utilizadas (CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España; ATCC y RV: Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Bélgica).

Especie	Referencia de origen
<i>Candida albicans</i>	CECT 1002
<i>Candida glabrata</i>	CECT 1448
<i>Candida guilliermondii</i>	CECT 1020
<i>Candida lusitanae</i>	CECT 1420
<i>Candida parapsilosis</i>	CECT 1449
<i>Candida rugosa</i>	CECT 1937
<i>Candida tropicalis</i>	CECT 1400
<i>Cryptococcus albidus</i>	CECT 1069
<i>Cryptococcus humicola</i>	CECT 1251
<i>Cryptococcus laurentii</i>	CECT 1095
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CECT 1075
<i>C. neoformans</i>	CECT 1078
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i> serotipo C MAT $\alpha$	ATCC 34880
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i> serotipo B MAT $\alpha$	ATCC 32609
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> serotipo D MAT $\alpha$	ATCC 34873
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> serotipo D MAT $\alpha$	ATCC 34874
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> serotipo A MAT $\alpha$	RV 56164

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador UNO-Thermoblock (Biometra, España) en volúmenes de 100 μl. Cada reacción se realizó por duplicado y se repitió en experimentos independientes.

Las modificaciones, tanto de la mezcla de reacción (Tabla 2) como de las condiciones de amplificación (Tabla 3) se realizaron secuencialmente, variando en cada experimento uno solo de los componentes, y utilizando el valor óptimo obtenido en posteriores experimentos. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tras tinción con bromuro de etidio se visualizaron bajo luz UV.

**Tabla 2.** Modificaciones en la composición de la mezcla de reacción.

Componente (Uds)	Modificaciones					
Cl <sub>2</sub> Mg (mM)	1,5	2 <sup>a</sup>	2,5	3	3,5 <sup>b</sup>	4
ADN molde (ng)	50	100	150*	200	250	300
ADN Polimerasa (U)	0,5	1	1,5	2*	2,5	3
Cebador (μM)	1	1,5*	2	2,5	3	
dNTPs μM (c/u)	50	100	150*	200	250	300
Tris-ClH (10mM pH:8.8)						
CIK (50mM)						
Tritón X-100 (0,1%)						

Los valores indicados con asterisco (\*) corresponden a los valores óptimos obtenidos. a y b corresponden a los valores de Cl<sub>2</sub>Mg óptimos en *Cryptococcus* spp. y *Candida* spp., respectivamente.

Aunque en este trabajo sólo se incluyen los resultados de las diversas modificaciones utilizando un cebador (5' CAGCCTCGGC 3'), se obtuvieron resultados similares con otros 29 cebadores diseñados para el estudio.

**Tabla 3.** Modificaciones en las condiciones de amplificación de la reacción RAPD.

Fases					
D.ª Inicial (94 °C)	D.ª (94 °C)	Hibridación		Extensión (72 °C)	
Tiempo	Tiempo	T (°C)	Tiempo	Tiempo	Ciclos
10'	1'30"	30	1'	1'30"	45
7'30"	1'15"	35	1'	1'15"	40*
5'	1*	40*	1'	1*	35
2'30"	45"	45	1'	45"	30
0*	30"	50	1'	30"	25
	15"	55	1'	15"	20
	5"	40	1'30"		
		40	1'15"		
		40	45**		
		40	30"		

a: D=Desnaturalización a 94 °C

Los valores indicados con asterisco (\*) corresponden a los valores óptimos obtenidos.

## RESULTADOS

**Composición de la mezcla de reacción.** Las amplificaciones realizadas con diferentes cantidades de ADN polimerasa pusieron de manifiesto que valores inferiores a 1,5 U originan una disminución en cantidad y calidad de los productos amplificados. El rango completo de productos amplificados se obtiene con 2 U de enzima. Valores superiores a esta cantidad originan una disminución en la calidad de los fragmentos amplificados.

Las variaciones en la concentración de Cl<sub>2</sub>Mg modificaron los patrones de amplificación (Figura 1). Para *Cryptococcus* spp., concentraciones inferiores a 2 mM originan un patrón de amplificación incompleto, mientras que concentraciones 3 mM o superiores hacen que disminuya igualmente el número de fragmentos amplificados. La concentración óptima se fijó en 2 mM. En *Candida* spp. fue necesario aumentar la concentración de Cl<sub>2</sub>Mg hasta valores de 3,5 mM para encontrar el rendimiento óptimo de la reacción. A menor concentración en el medio disminuyen notablemente los productos de la reacción.

Las variaciones en la concentración de cebador, así como en la concentración de dNTPs demostraron cambios sólo en la intensidad de los productos obtenidos, aunque no se apreciaron modificaciones en el patrón de bandas (Figura 2), en contra de lo descrito por Ellsworth *et al.*, [16]. Con respecto al índice cebador/ADN molde, el patrón de amplificación óptimo se obtuvo utilizando 150 pmoles (1,5 μM) de cebador para 150 ng de ADN.

**Condiciones de amplificación.** Las condiciones iniciales de amplificación incluían una desnaturalización previa de 10 min a 94 °C. La eliminación de esta fase no originó cambios ni en el patrón de productos obtenidos ni en la intensidad de los mismos.

Se probaron seis temperaturas de hibridación diferentes (Figura 3) para optimizar las condiciones de unión del cebador. Los productos de amplificación obtenidos con temperaturas de hasta 40 °C no varían ni en cantidad ni en calidad.

Una vez establecida la temperatura óptima de hibridación se determinó el tiempo mínimo necesario para que esta fusión se llevara a cabo. En *Cryptococcus* spp. todos los tiempos evaluados ofrecieron el mismo patrón de amplificación; sin embargo, cuando la hibridación tuvo lugar durante más de 60 s aparecieron algunos fragmentos inespecíficos de pequeño tamaño (Figura 4A). En *Candida* spp., se necesitó un tiempo de hibridación mínimo de 60 s para obtener el patrón completo (Figura 4B). No obstante, estos parámetros deben ser cuidadosamente ajustados si varía el cebador.

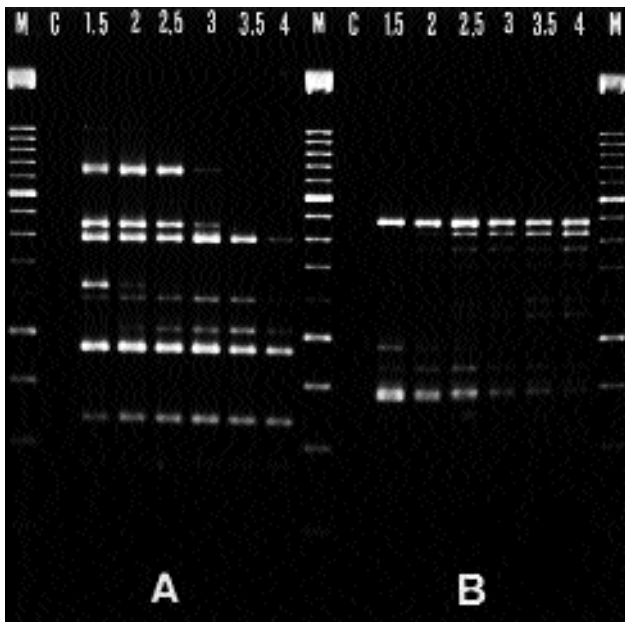


Figura 1. Efecto de la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  en la reacción RAPD de *Cryptococcus* spp. (A) y *Candida* spp. (B). Los números indican la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (mM), C indica el control negativo y M el marcador de Peso Molecular (MXIV Boehringer).

Con respecto al tiempo de desnaturalización se observó una pérdida considerable en el rendimiento de amplificaciones realizadas con desnaturalizaciones inferiores a 60 s. Igualmente, el patrón de bandas varió cuando la desnaturalización tuvo lugar durante más de 75 s.

Finalmente se modificó el tiempo de extensión de los fragmentos amplificados. Se observó un aumento cualitativo el rendimiento de la reacción hasta valores de 1 min.

## DISCUSIÓN

Uno de los factores que han limitado la utilización de la técnica RAPD en estudios de genética molecular es la reproducibilidad de los productos de la reacción. Éstos dependen de las condiciones en que se realiza la técnica, constituyendo una variación que enmascara los resultados, pero que puede evitarse optimizando las condiciones de amplificación y cada uno de los componentes que intervienen en la reacción [17].

Para estandarizar las condiciones RAPD en levaduras patógenas (*Cryptococcus* spp. y *Candida* spp.) se han modificado varios parámetros de la mezcla de reacción y de las condiciones de amplificación hasta conseguir patrones de bandas definidos y reproducibles.

La ADN polimerasa utilizada en este trabajo tiene una vida media superior a 90 min a 96 °C, lo que garantiza su actividad en reacciones de amplificación con alto número de ciclos termales. Las amplificaciones realizadas con diferentes cantidades de ADN polimerasa indican un valor óptimo de 2 U. Concurdan estos resultados con los obtenidos por Innis y Gelfand [18], quienes aconsejan la utilización de 1-2,5 U de ADN polimerasa para reacciones de 100  $\mu\text{l}$ .

Con respecto a la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , los valores óptimos varían para *Cryptococcus* spp. y *Candida* spp., siendo mayor la concentración necesaria para *Candida* spp. Ellsworth *et al.* [16] indican que a partir de un determinado umbral, el resultado es independiente de la concentración de iones  $\text{Mg}^{2+}$ . Sin embargo, en nuestro

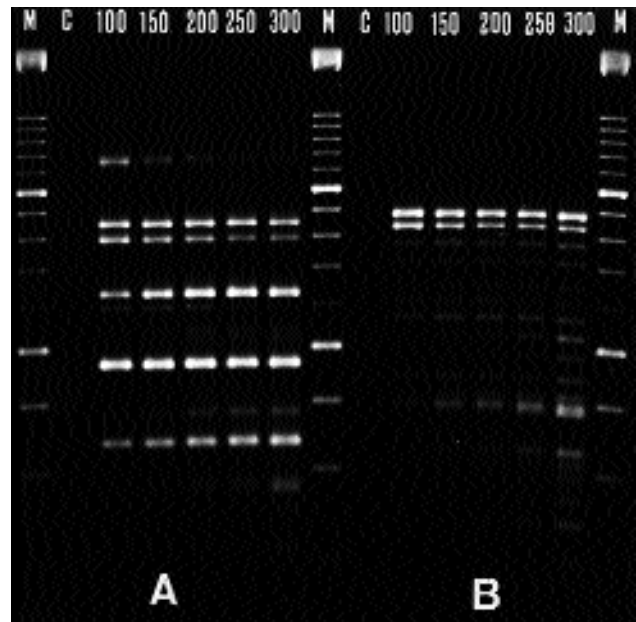


Figura 2. Efecto de la concentración de cebador en la reacción RAPD de *Cryptococcus* spp. (A) y *Candida* spp. (B). Los números indican la cantidad de cebador (pmoles), C indica el control negativo y M el marcador de Peso Molecular (MXIV Boehringer).

estudio se pone de manifiesto que concentraciones superiores a 3,5 mM hacen disminuir la calidad de los productos obtenidos. Estos valores coinciden con los descritos por Welsh y McClelland [1], que utilizaron altas concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  para estabilizar la unión cebador-ADN molde, y con los resultados de Parejo *et al.* [19] en estudios realizados sobre ADN de vacuno.

La concentración óptima de cebador (1,5  $\mu\text{M}$ ) es ligeramente superior a la concentración determinada para PCR por Innis y Gelfand [18] situada entre 0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$ , pero debemos tener en cuenta que mientras en la PCR la hibridación sólo ocurre en un lugar, en la reacción RAPD tiene lugar en varios puntos de la cadena de ADN molde simultáneamente, con lo cual se necesita más cantidad de cebador disponible en la mezcla de reacción.

La fase de hibridación es uno de los puntos más delicados en la reacción RAPD. La temperatura recomendada según la fórmula descrita por Itakura *et al.* [20] es de 36 °C para el cebador utilizado. En un intento de conseguir la mayor especificidad posible en nuestros productos sin variar el patrón de bandas, se probaron distintas temperaturas de hibridación. Al incrementar la temperatura de hibridación se reducen las uniones inespecíficas cebador-ADN molde y la incorporación errónea de nucleótidos, logrando de esta manera un producto específico. El patrón de bandas se modificó en todos los casos analizados a partir de 45 °C. Por ello consideramos 40 °C como temperatura óptima de hibridación para el cebador utilizado, en consonancia con lo descrito por Parejo *et al.* [19].

La última fase de cada ciclo de amplificación es la extensión de las cadenas por la ADN polimerasa que llevamos a cabo a 72 °C, pero debido al pequeño tamaño de los productos obtenidos intentamos disminuir el tiempo necesario para esta fase. Se observó un aumento progresivo en el rendimiento de la reacción al aumentar el tiempo de extensión hasta valores de 1 min, pero al aumentar este tiempo no mejoró significativamente el patrón de productos amplificados. Yu y Pauls [21] describieron un tiempo de extensión de 30 s para fragmentos de 1,5 Kb, pero utilizaron cantidades de polimerasa muy superiores a las utili-

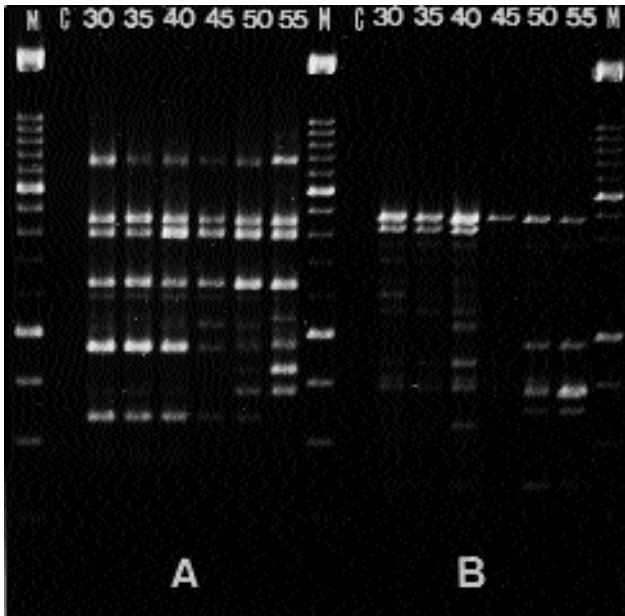


Figura 3. Efecto de la temperatura de hibridación en la reacción RAPD de *Cryptococcus* spp. (A) y *Candida* spp. (B). Los números indican la temperatura de hibridación (°C), C indica el control negativo y M el marcador de Peso Molecular (MXIV Boehringer).

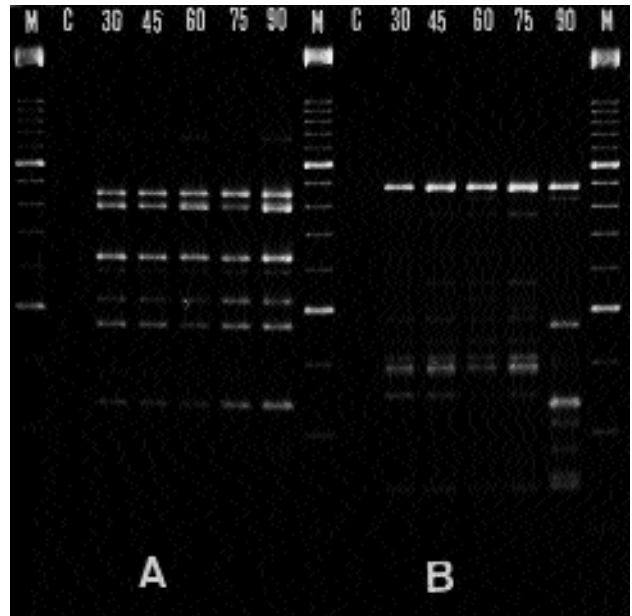


Figura 4. Efecto del tiempo de hibridación en la reacción RAPD de *Cryptococcus* spp. (A) y *Candida* spp. (B). Los números indican el tiempo de hibridación (s), C indica el control negativo y M el marcador de Peso Molecular (MXIV Boehringer).

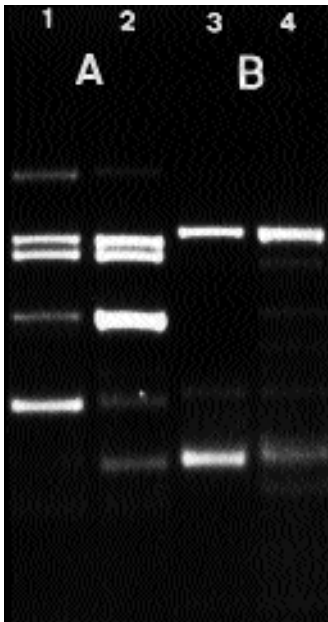


Figura 5. Comparación de los patrones de amplificación obtenidos antes (calles 1 y 3) y después (calles 2 y 4) de la optimización la reacción RAPD de *Cryptococcus* spp. (A) y *Candida* spp. (B).

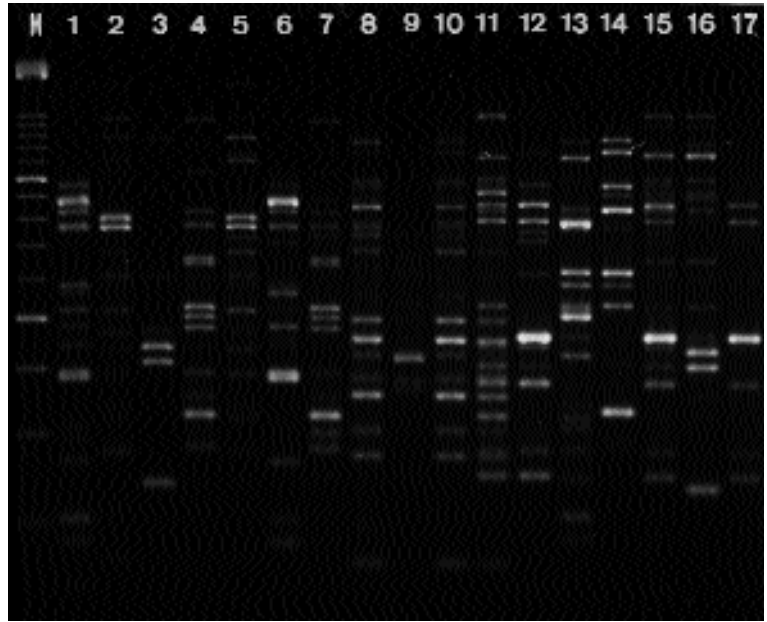


Figura 6. Patrones electroforéticos de las amplificaciones de los ADNs de las 17 levaduras analizadas (M: Marcador de Pesos Moleculares; calle 1: *C. albicans*; calle 2: *C. glabrata*; calle 3: *C. guilliermondii*; calle 4: *C. lusitanae*; calle 5: *C. parapsilosis*; calle 6: *C. rugosa*; calle 7: *C. tropicalis*; calle 8: *C. albidus*; calle 9: *C. humicola*; calle 10: *C. laurentii*; calle 11: *C. neoformans*; calle 12: *C. neoformans*; calle 13: *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C MAT $\alpha$ ; calle 14: *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B MAT $\alpha$ ; calle 15: *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo D MAT $\alpha$ ; calle 16: *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo D MAT $\alpha$ ; calle 17: *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo A MAT $\alpha$ ).

zadas por nosotros. Parejo *et al.* [19] consideraron para ADN de vacuno 90 s como tiempo óptimo de extensión, pero al no observar en nuestros experimentos problemas de repetibilidad en los fragmentos de mayor tamaño, elegimos 60 s como tiempo óptimo de extensión.

El último parámetro que optimizamos fue el número de ciclos a realizar. Fueron necesarios al menos 40 ciclos para que los productos fueran detectables, sin conseguir variación en la intensidad de las bandas obtenidas

al aumentar el número de ciclos por encima de ese valor, ya que a medida que aumentan los ciclos se genera una gran competencia entre los reactivos, aumentando la cantidad y complejidad de productos inespecíficos.

Los resultados conseguidos tras la optimización tanto de los componentes como de las condiciones de amplificación nos han permitido observar cambios tanto en los perfiles de amplificación como en la intensidad de las bandas obtenidas (Figura 5) y nos aseguraron la repeti-

bilidad de los resultados, lo que nos indica la conveniencia de optimizar y estandarizar la técnica RAPD antes de su utilización a gran escala, ya que se aprecia una clara mejoría en el rendimiento de la reacción y en la repetibilidad de los resultados en posteriores experimentos. Las condiciones óptimas obtenidas en este trabajo se están utilizando en la identificación de fragmentos específicos de

*Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. y de las especies incluidas en estos géneros. Como resumen se incluye la figura 6 en la que están representados los productos RAPD de todas las cepas utilizadas, tras haber optimizado la reacción.

## Bibliografía

1. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7213-7218.
2. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.
3. Levin I, Crittenden LB, Dodgson JB. Genetic map of the chicken Z chromosome using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genomics* 1993; 16: 224-230.
4. Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudotestcross: Mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 1994; 137: 1121-1137.
5. Gwakisa PS, Kemp SJ, Teale AJ. Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim Genet* 1994; 25: 89-94.
6. Crampin AC, Matthews RC, Hall D, Evans EGV. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 463-465.
7. Holmberg K, Feroze F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. *J Clin Lab Anal* 1996; 10: 59-69.
8. Viviani MA, Wern H, Roverselli A, et al. Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 355-360.
9. Aoki FH, Imai T, Tanaka R, et al. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of Random Amplified Polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 315-320.
10. Niesters HGM, Goessens WHF, Meis JFMG, Quint WGV. Rapid polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 904-910.
11. Alonso-Vargas R, Garaizar J, Pontón J, Quindós G. Utility of random amplified polymorphic DNA in the discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 10-13.
12. Lo Passo C, Pernice I, Gallo M, et al. Genetic relatedness and diversity of *Cryptococcus neoformans* strains in the Maltese islands. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 751-755.
13. Pernice I, Lo Passo C, Criseo G, Pernice A, Todaro-Luck F. Molecular subtyping of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype A from southern Italy. *Mycoses* 1998; 41: 117-124.
14. Kemp SJ, Teale AJ. Randomly primed PCR amplification of pooled DNA reveals polymorphism in a ruminant repetitive DNA sequence which differentiates *Bos indicus* and *Bos taurus*. *Animal Genetics* 1994; 25: 83-88.
15. Sansinforiano ME, Padilla JA, Hermoso de Mendoza J, et al. Rapid and easy method to extract and preserve DNA from *Cryptococcus neoformans* and other pathogenic yeasts. *Mycoses* 1998; 41: 195-198.
16. Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 1993; 14: 241-247.
17. Rothuizen J, Van Wolferen M. Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission. *Anim Genet* 1994; 25: 13-18.
18. Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. New York, Academic Press, 1990: 3-12.
19. Parejo JC, Sansinforiano ME, Rabasco A, Martínez-Trancón M, Fernández-García JL, Padilla JA. Optimización de la técnica RAPD en la raza vacuna Blanca Cacerreña. *Archivos de Zootecnia* 1997; 46: 279-284.
20. Itakura K, Rossi JJ, Wallace RB. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 323.
21. Yu KF, Pauls KP. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 2606.