

Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT- PCR

Ribonucleic acid quantification for the performance of RT- PCR technique

Lic. Carmen Díaz-Alonso, Dra. Heidys Garrote-Santana, Dra. C. Ana María Amor-Vigil, Lic. Yandi Suárez-González, Lic. Raúl González-Mugica Romero

Instituto de Hematología e Inmunología.

RESUMEN

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN). La PCR con transcripción inversa (RT-PCR) es una variante de la PCR convencional donde se utiliza ácido ribonucleico (ARN) como molde para sintetizar ADN complementario (ADNc), con el que posteriormente se realiza la PCR correspondiente. El ARN es un material susceptible a la degradación debido a la acción de las ribonucleasas. En general, se obtiene muy poca cantidad, por lo que cuantificarlo implica perder una parte apreciable del ARN. Los espectrofotómetros convencionales utilizan grandes volúmenes de muestra y aunque es posible realizar una dilución, se compromete la concentración que en ocasiones puede llegar a no ser detectable. Se estudió sangre medular de 10 pacientes con diferentes entidades hematológicas. El volumen del aspirado varió entre 5 y 8 mL. La extracción y purificación de ARN se realizó de forma manual. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro de volumen múltiple utilizando solo 2 μ L de muestra. Se realizó lectura de densidad óptica a 260 y 280 nm, para medir ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente. La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia. Las concentraciones variaron desde 444,4 a 2515,5 ng/ μ L. La razón de pureza varió entre 1,111 y 2,091. No se observó degradación total de ninguna de las muestras. Son múltiples los factores que pueden afectar el rendimiento y la preservación del ARN, por lo que el análisis integral de su cantidad y calidad se hacen imprescindibles para llevar a cabo la transcripción inversa y las posteriores PCRs, de manera exitosa.

Palabras clave: biología molecular, PCR, cuantificación de RNA, RT-PCR.

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) is a molecular biology technique which aim is to obtain a great number of copies of a fragment of deoxyribonucleic acid (DNA). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is one variant of the conventional PCR, in which ribonucleic acid (RNA) is used as a pattern to synthesize the complementary DNA (DNAC), required for the following PCR technique. The RNA is a material susceptible to degradation due to the action of ribonucleases. In general, a very little quantity is obtained, hence, its quantification would lead to a loss of an appreciable part of it. Conventional spectrophotometers use large volume samples and although it is possible to perform a dilution, it sometimes can result in the risk of not detecting the concentration. Medullary blood from ten patients with different hematologic diseases was studied. Aspirate sample volume varied between 5 to 8 mL. The extraction and purification of RNA was carried out manually. The quantification was performed in a Multi-volume Spectrophotometer using 2 μ L sample volumes. Optical density reading was performed at 260 and 280 nm to measure nucleic acids and proteins, respectively. RNA integrity was analyzed by means of agarose horizontal gel electrophoresis on 2 % with ethidium bromide as fluorescent marker. Concentrations varied from 444,4 to 2515,5 ng/ μ L. Purity rate varied between 1,111 and 2,091. No total degradation of the samples was observed. There are numerous factors which can affect the RNA performance and preservation, thus, the integral analysis of its amount and quality are essential to successfully carry out the reverse transcription and the following PCRs.

Keywords: molecular biology, PCR, RNA quantification, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas del inglés *Polymerase Chain Reaction*, fue desarrollada por Kary Mullis en los años 80 del pasado siglo y su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN).¹⁻³

La PCR se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN. Mediante esta reacción se logra multiplicar del número de copias de un fragmento específico del ADN, a lo cual se le llama amplificación. La reacción se lleva a cabo mediante la repetición sucesiva de un ciclo de tres pasos, cada uno a temperatura diferente. En cada paso o cambio de temperatura ocurre un proceso que en su conjunto complementan la PCR. Primeramente, la desnaturalización del ADN o separación de la doble cadena, luego la unión de los oligonucleótidos o cebadores a las cadenas simples de ADN y, por último, la extensión o polimerización donde la ADN polimerasa cataliza la formación de doble cadena de ADN.¹⁻² La complementariedad exclusiva de los oligonucleótidos a los extremos del fragmento que se quiere amplificar, garantiza la especificidad de la reacción.

Múltiples aplicaciones y modificaciones de esta técnica han sido descritas. La PCR con transcripción inversa, conocida por sus siglas en inglés RT-PCR, es una variante de la PCR convencional. La RT-PCR comprende dos procesos, primeramente una transcripción inversa, que a partir de ácido ribonucleico (ARN) sintetiza ADN complementario (ADNc), con el cual se realiza posteriormente la(s) PCR(s) correspondiente(s). De esta forma se pueden amplificar genes que estaban

expresados en el momento del estudio. En la mayoría de las enfermedades hematológicas se describen alteraciones moleculares asociadas y su conocimiento es útil para el diagnóstico, el pronóstico, el diseño de tratamientos y la detección temprana de recaídas.³⁻⁶

El ARN es un material susceptible a la degradación debido a la acción de las ribonucleasas (ARNsas). Por esta razón, requiere de una adecuada toma de muestra, condiciones de frío durante la manipulación, conservación y trabajo de meseta con el objetivo de inhibir la degradación enzimática.^{5,7} En general, se obtiene muy poca cantidad de este material por lo que cuantificarlo implica perder una parte apreciable.

Los espectrofotómetros convencionales utilizan volúmenes grandes de muestra. Generalmente, de 200 μ L a 1 mL y aunque es posible realizar una dilución, se compromete la concentración que en ocasiones puede llegar a no ser detectable.

Actualmente existen espectrofotómetros que cuantifican directamente pequeños volúmenes de muestra, que pueden llegar a ser hasta de 1 μ L. El espectrofotómetro de volumen múltiple procesa los datos con el software Gen5TM y está diseñado para cuantificar de manera rápida y eficiente ácidos nucleicos, proteínas, etc. La longitud de onda barre el espectro de 200 a 999 nm. Entre las opciones de lectura pueden leerse directamente placas de Elisa o usar una plataforma denominada Take3, que ofrece tres opciones: dos posiciones para cubetas convencionales de tamaños diferentes y una plataforma con dos hileras de ocho círculos donde se aplican 2 mL de muestra. Esta opción permitirá realizar la cuantificación de las muestras de ARN que en conjunto con la electroforesis garantizarán la correcta evaluación de cantidad y calidad del ARN con vistas a realizar un proceso de transcripción inversa.

MÉTODOS

Se estudió sangre medular de 10 pacientes con diferentes diagnósticos hematológicos. El volumen del aspirado varió entre 5 y 8 mL y se obtuvo por punción medular, previo consentimiento del paciente. La obtención de células mononucleadas se realizó mediante gradiente de densidad con Ficoll y la extracción y purificación de ARN se realizó de forma manual con reactivos preparados en el laboratorio.^{5,7}

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro de volumen múltiple. Los datos se procesaron con el software Gen5TM. Se aplicaron 2 μ L de muestra en la plataforma Take3 (BioTek Instruments Inc). Se realizó lectura de densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm, para medir ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente.

La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia.

RESULTADOS

La Tabla muestra las lecturas de DO a 260 y 280 nm, la razón de pureza (DO 260/280) y las concentraciones de ARN obtenidas. Las concentraciones variaron desde 444,4 a 2515,5 ng/ μ L. La razón de pureza varió entre 1,111 y 2,091.

Tabla. Lecturas de densidad óptica (DO), razón de pureza (DO 260/280) y la concentración de ARN ([ARN])

No. de muestra	DO 260 nm	DO 280 nm	DO 260/280	[ARN] ng/ μ L
1	2,155	1,070	2,014	1723,658
2	0,555	0,266	2,091	444,358
3	0,578	0,285	2,028	462,400
4	1,156	0,581	1,990	924,638
5	2,505	1,916	1,307	2003,646
6	0,935	0,460	2,030	747,828
7	0,772	0,402	1,921	617,854
8	2,071	1,863	1,111	1656,574
9	3,144	2,060	1,526	2515,479
10	1,469	0,728	2,018	1175,523

No se observó degradación total de ninguna de las muestras en la corrida electroforética de los ARN. La muestra 9 presentó degradación parcial dada por la banda indefinida de la subunidad mayor ribosomal (Figura).

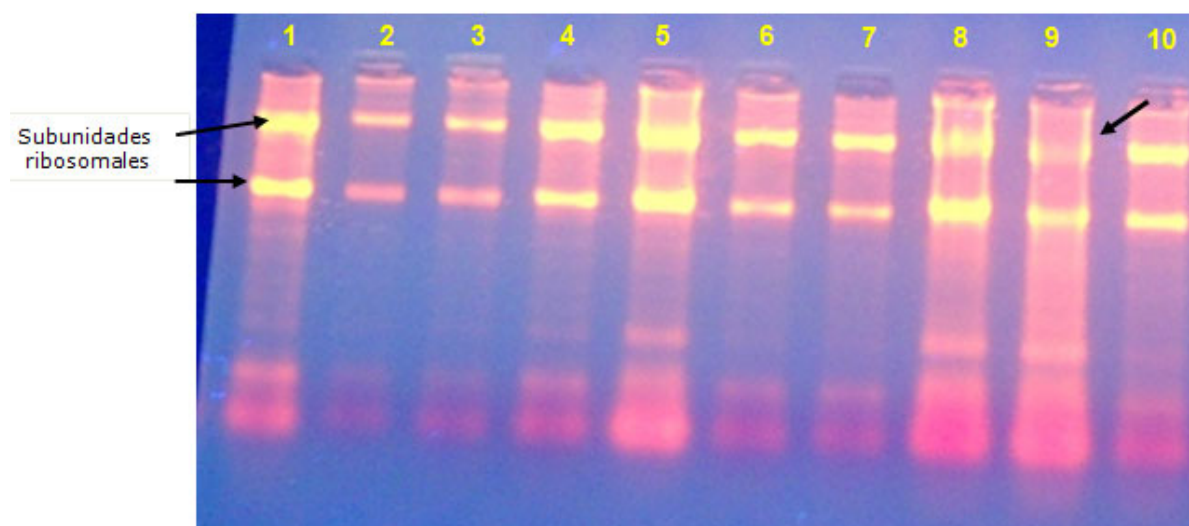


Figura. Electroforesis de ARN en gel de agarosa. Las dos bandas intensas corresponden a las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal y su presencia es signo de un ARN óptimo. La banda indefinida, correspondiente a la subunidad mayor en la muestra 9, denota degradación parcial.

DISCUSIÓN

Varios factores pueden incidir en la concentración del ARN que se obtiene tras el proceso de extracción y purificación. Entre ellos: la cantidad de células, el volumen de muestra que se extrae y la conservación óptima de la muestra.^{5,7}

Por las razones anteriores, no es posible predecir la concentración, ni recomendable prescindir de la cuantificación. Las concentraciones de ARN que se reportan en el presente trabajo, están afectadas por los diversos factores que intervienen desde la extracción de la muestra de sangre medular, hasta el último paso de extracción del ARN y su conservación.

Los pacientes estudiados tenían diferentes diagnósticos hematológicos donde la hematopoyesis puede estar exacerbada o inhibida, pero de cualquier forma afectada. Por esta razón, en ocasiones pueden estar presentes grandes cantidades de células en un pequeño volumen de muestra u ocurrir lo contrario. Es por ello que además de los factores técnicos antes referidos, la cantidad de ARN también se afecta por la enfermedad propia del paciente.^{8,9}

El proceso de extracción manual también afecta el rendimiento por el exceso de manipulación y durante sus diferentes pasos: extracción fenol-cloroformo, centrifugación, decantación, lavado, disolución, precipitación en frío, entre otros, se puede degradar y perder parte del material.^{5,7}

El estimado de pureza que brinda el equipo da información acerca de la presencia de proteínas, lo cual es útil para conocer la eficiencia del proceso de extracción⁹. Aunque existió variabilidad en la pureza alcanzada, esta no guardó relación directa con la concentración de ARN. El objetivo de alcanzar la más baja concentración posible de proteínas es reducir la presencia de ARNsas y de cualquier otra enzima cuya acción pueda interferir en la RT-PCR.

El estudio de integridad por electroforesis es el complemento al análisis integral de cantidad y calidad del ARN, necesario para llevar a cabo la transcripción inversa y las posteriores PCRs de manera exitosa.

No es nuestro objetivo discutir todos los factores que pueden afectar el rendimiento y la preservación del ARN. Comentamos algunos de ellos para ilustrar la manera en que la concentración final del material puede estar afectada y destacar la importancia de realizar su medición.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2003; 226: 3-6.
2. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian.* Human Press. 2006. 47-56 65-74.
3. Paul Moss. History and development of molecular biology. In: *Molecular Hematology.* 3rd ed. Wiley Blackwell. 2010; p. 360-9.

4. Owen CJ, Fitzgibbon J. The genetics of acute myeloid leukemias. In: Provan D, Gribben J, eds. *Molecular Hematology*. 3rd edition. London: Wiley-Blackwell. 2010, p. 42-50.
5. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999 Dec; 13(12):1901-28.
6. Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Acute myelogenous leukemia* In: *William's Hematology*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2010.
7. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular cloning - a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Press. 1982
8. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernández H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22; 366(12):1079-89.
9. Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet*. 2010 Oct; 11(10):685-96.

Recibido: Diciembre 5, 2012

Aceptado: Enero 30, 2013

Lic. *Carmen Díaz Alonso*

Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268. Fax (537) 644 2334. Email: rchematologia@infomed.sld.cu. Website: revhematologia.sld.cu