

ADN de alta calidad a partir de sangre total almacenada por largo tiempo para amplificación por PCR

High quality DNA started off long time stored total blood for amplification by PCR

DNA de alta qualidade do sangue armazenado por um longo tempo para amplificação por métodos do PCR

COLCIENCIAS TIPO 1. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

RECIBIDO: ABRIL 1; ACEPTADO: MAYO 15, 2012

Natali Valentina Payarés, M.Sc

nvpayares@usc.edu.co

Lida Inés Mancilla, Ph.D(c)

limancilla@usc.edu.co

Universidad Santiago de Cali, Colombia

Resumen

Los métodos reportados hasta la fecha sobre extracción y purificación de ADN de sangre emplean muestras frescas o almacenadas en congelamiento a -20°C y descartan la posibilidad de utilizarlas cuando han permanecido por más de un año a temperaturas menores. El artículo reporta el aislamiento de ADN genómico utilizando una modificación del método de purificación salina, reportado por Miller¹ a partir de sangre total almacenada sin mezclas especiales, durante más de un año a 4°C . El ADN obtenido fue de buena calidad, con alto peso molecular y mínimo contenido de sustancias inhibidoras, características que lo hacen adecuado para amplificación por PCR. El 84% de las muestras fueron positivas para la amplificación por PCR del gen Apo E. El ADN extraído por este método fue también apto para posterior digestión con la enzima de restricción Hba I, lo que garantiza la utilidad de este método simple y rápido en los análisis moleculares.

Palabras Clave

PCR; extracción de ADN; sangre total; método salino.

Abstract

The reported methods to date, they use fresh or stored blood samples in freezing to -20°C , discarding the possibility of using sanguineous samples that they remain by more of a year a temperatures minors of -20°C . We reported the genomic DNA isolation using one it modification of the method of saline purification (salting out), reported by Miller¹ to start off of stored total blood without special mixtures, for more than a year to 4°C . The obtained DNA it was of good quality, stop molecular weight and with contained minim of inhibiting substances that do it suitable for enzymatic amplification by PCR. 84% of the samples were positive for the amplification by PCR of a fragment of the human gene of β globina and of the gene Apo E. The DNA extracted by this method is appropriate for subsequent digestion with the enzyme to restriction Hba I, which guarantees utility of this simple and fast method the molecular analyses.

Keywords

PCR; DNA Extraction; total blood; salting out

Resumo

Os métodos relatados até o momento da data, a extração e purificação do ADN de amostras de sangue usado frescas ou armazenadas em congelamento a -20°C e descartar a possibilidade de usá-los quando eles permaneceram por mais de um ano reduzir temperaturas. O artigo relata o isolamento do ADN genômico usando uma modificação do método de purificação fisiológica, relatado por Miller de sangue total armazenado sem misturas especiais, para mais de um ano a $+4^{\circ}\text{C}$. O DNA recuperado foi de boa qualidade, com teor de alto peso molecular e mínimo de substâncias inibitórias, características que o tornam adequado para amplificação por PCR. 84% das amostras foram positivas para amplificação por PCR do gene da Apo e. DNA extraído por esse método também foi adequada para posterior digestão com Hba em enzima de restrição, o que garante a utilidade desse método simples e rápido em análises moleculares.

Palavras chave

PCR; extração de DNA; sangue total; Método salino.

I. INTRODUCCIÓN

La amplificación de ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha convertido en una técnica de uso imprescindible en todos los análisis moleculares², permitiendo el análisis a nivel genético de las mutaciones a partir de cantidades muy pequeñas de ADN.

Una muestra de ADN, de calidad y cantidad adecuadas, es crucial para garantizar la correcta amplificación de secuencias de genes mediante esta técnica. Por lo tanto, la eficiencia de los procedimientos de extracción se ha convertido en un punto crítico para el éxito de la aplicación del PCR³.

Hasta la fecha, los diferentes métodos de extracción de ADN de células sanguíneas reportados varían ampliamente. Estos métodos se basan, en su mayoría, en el uso de solventes orgánicos tóxicos, como fenol/cloroformo para la separación de ácido nucleico de las proteínas y demás componentes celulares⁴.

Desde hace dos décadas se han reportado otros métodos que eliminan proteínas y contaminantes celulares, empleando una alta concentración de sales tales como NaCl o Acetato de sodio, con resultados similares, sin la toxicidad de los solventes orgánicos.

Uno de estos métodos fue reportado por Miller en 1988¹ y es conocido con el nombre de *purificación salina* (del inglés, *salting out*). El ADN se aísla mediante precipitación en presencia de alcohol isopropanol o etanol y se disuelve en agua o en una solución tamponada que puede contener *conservantes* del ADN, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)⁵. El ADN es normalmente aislado de la capa leucocitaria o las muestras de linfocitos, los cuales se obtienen por purificación previa por centrifugación o filtración en gradientes de densidad.

Alternativamente se han desarrollado otros métodos que utilizan sangre total fresca, pero con el inconveniente de los solventes tóxicos, que inhiben la ADN polimerasa⁶. En varios estudios, se reporta la utilización de sangre total en las mezclas de PCR sin aislamiento previo de ADN.

Este método requiere procedimientos adicionales en la técnica de PCR tales como incubación del ADN durante 3 minutos, con tres ciclos alternantes de calentamiento y enfriamiento de 94 °C y 55 °C^{7,8} para eliminar las sustancias inhibitorias de la Taq polimerasa y exige la utilización de Tth ADN polimerasa, una enzima mucho más termorresistente (derivada de *Thermus Thermophilus*

HB8), debido a que esta última puede ser inhibida por el material clínico^{9,10}.

Algunos investigadores, han desarrollado mezclas especiales, patentadas, que permiten disminuir la inhibición de PCR por sustancias biológicas¹¹. Recientemente se reportó el PCR empleando sangre total sin extracción previa de ADN, utilizando un *buffer* con composición patentada, que conserva la actividad de la enzima ADN polimerasa bajo condiciones diversas¹². Los métodos reportados para extracción de ADN normalmente utilizan muestras de sangre fresca o almacenada a 4°C, por periodos de tiempo máximo una semana o a temperatura de -20°C por varios meses. Generalmente se expresa el tiempo y la elevada temperatura de almacenamiento como la principal causa de degradación del ADN.

Para llevar a cabo el estudio de genotipificación de los alelos del gen que codifica para la apolipoproteína E, (ApoE) en niños de edad escolar se requiere de un método de extracción de ADN adecuado.

Este método debe ser sencillo, a partir de poco volumen de sangre, y que permita obtener un ADN genómico con concentración adecuada, alto peso molecular y de buena calidad, con el menor número de contaminantes, buscando así reducir los efectos de inhibición o disminución de la sensibilidad y la eficiencia de la amplificación de las secuencias del ADN mediante la PCR¹³.

En el presente trabajo se reporta un método modificado del publicado por Miller y colaboradores en 1988¹, a partir de sangre almacenada durante más de un año a 4°C que permite la obtención de ADN de alta calidad y en cantidad adecuada para la amplificación mediante PCR, que ha sido empleado en estudios de tipificación del gen Apo E.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Población y Muestras

Las muestras de sangre para la extracción del ADN fueron tomadas de 100 niños de la zona urbana de Palmira que participaron en un estudio de valoración nutricional, realizada por el grupo de nutrición del programa de Enfermería de la Universidad Santiago de Cali. Este proyecto fue financiado por la Secretaría de Salud Departamental del Valle. En el estudio se incluyeron niños de ambos sexos, con edades comprendidas entre 5 y 14

años, seleccionados al azar de una población total de 800 niños. La participación de los niños en el estudio se logró con el consentimiento informado de los padres.

B. Obtención de muestras de sangre

Se extrajeron 10 ml de sangre periférica; la muestra se colectó en tubo estéril al vacío conteniendo EDTA 0,5 M como anticoagulante. Las muestras fueron almacenadas en frío (4°C) durante más de un año, hasta su procesamiento.

C. Extracción de ADN

El ADN fue aislado mediante la técnica descrita por Miller y colaboradores¹ con algunas modificaciones, que se describen brevemente a continuación:

Un volumen de 3 ml de sangre total periférica se adicionó a igual volumen de *buffer* de resuspensión celular (Tris HCl 10 mM pH 8,2 y Na₂EDTA 2 mM y NaCl 400mM de concentración final) en un tubo de centrifuga de 15 ml con tapa. La lisis de las células se realizó por adición del detergente SDS al 1% de concentración final y proteinasa **K** con concentración final 100ug/ml. La reacción de digestión se llevó a cabo a 56°C durante toda la noche, por lo menos doce horas.

Posteriormente el ADN se desproteinizó por adición de 1,5 ml de una solución saturada de cloruro de sodio 5M. La mezcla se agitó vigorosamente en *vortex* durante 15 segundos y se centrifugó a 5000 r.p.m. por 25 minutos.

El sobrenadante fue colectado en tubo nuevo para la extracción del ADN por precipitación, en dos volúmenes de etanol absoluto frío, mezclando suavemente por inversión del tubo diez veces. La precipitación se prolongó por doce horas a -20°C para aumentar su rendimiento. El precipitado se recolectó por centrifugación a 3000 r. p. m. por 30 minutos y se realizó un lavado con 1ml de etanol al 70%.

El ADN precipitado se secó totalmente al aire a temperatura ambiente y se diluyó en 100 ul de una solución de Tris-HCl 10mM pH 7,5 y EDTA 1mM pH 8,0 de concentración final. Para su dilución el ADN se incubó a 37°C por una hora con agitación ocasional y se almacenó a -20°C hasta su utilización en los ensayos posteriores.

La calidad y cantidad del ADN obtenido fue determinada mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y se observó por fluorescencia del bromuro de etidio en luz UV, registrados a través de fotografías tomadas con

cámara digital.

D. Amplificación de gen de β -globina

Previo a su utilización para los estudios genéticos, la calidad del procedimiento de purificación y la integridad de los ADN obtenidos a partir de las muestras se determinó mediante la amplificación de un fragmento de 260 pares de bases (pb) del gen de β -globina humana, utilizando un par de cebadores.

La secuencia de los cebadores empleados es respectivamente:

- GH20; 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; y
- PCO4 5'-GGTGAACGTGGATGAAGTTG-3'¹⁴.

La reacción de PCR se realizó empleando un primer ciclo de desnaturalización a 94°C por cinco minutos, seguido de cuarenta ciclos con los siguientes pasos:

- desnaturalización a 94°C, por 0.5 min;
- alineamiento a 65°C, por 0.5 min;
- extensión a 70°C, por 1.5 min; y
- extensión a 72°C, por 10 min.

Los resultados de los PCR fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, con tinción con bromuro de etidio. El tamaño de los amplificados fue comparado con el marcador de peso molecular Promega (100 bp DNA Step ladder). Los geles visualizados en luz UV fueron registrados a través de fotografías tomadas con cámara digital.

E. Amplificación del gen *apoE* y análisis del genotipo de *ApoE*

Las muestras de ADN fueron amplificables para el gen de la globina por lo que se consideraron adecuadas para los estudio de genotipación de Apo E.

El estudio del genotipo Apo E se determinó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 244 pb del exón 4 del gen de la Apo E, empleando la metodología de Hixson y Vernier¹⁵. Los cebadores utilizados fueron F4 (5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3') y F6 (5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3'), descritos por Emi y Cols¹⁶.

La digestión del amplificado se realizó con la enzima de restricción HhaI durante toda la noche a 37 C. El producto de la digestión fue determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, y tinción con bromuro de etidio.

III. RESULTADOS

Este reporte presenta el inicio de un estudio de genotipificación del Apo E, para lo cual se requiere como es bien conocido un ADN de gran calidad que garantice la correcta amplificación por la técnica de PCR. Se reporta el método de extracción que fue utilizado para tal fin, el cual es una modificación simplificada de un protocolo previamente publicado¹.

A pesar de un tiempo de almacenamiento de más de un año a 4° C, se logró la extracción de ADN, con alto peso molecular a partir de sangre total. Solo se observó degradación del ADN en el 5% de las muestras procesadas.

El protocolo empleado redujo en niveles adecuados la presencia de inhibidores de la reacción de PCR, lo que se demuestra por la amplificación de fragmentos de los genes de β globina y ApoE humanos por PCR en un alto porcentaje de las muestras (ver Figuras 1 y 2).

La frecuencia de muestras positivas para las reacciones de amplificación para el gen de β -globina y para el gen de ApoE se presentan en la Figura 3.

Figura 1. Amplificación del fragmento del gen β -globina, con ADN extraído empleando el método salino modificado. 1-8: muestras de ADN de linfocitos humanos, B: blanco, MP: marcador de peso molecular

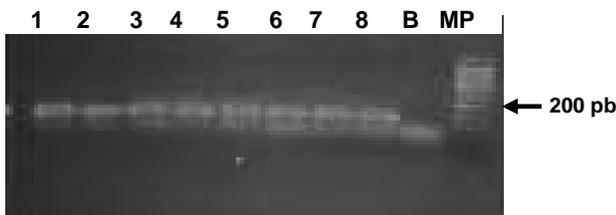


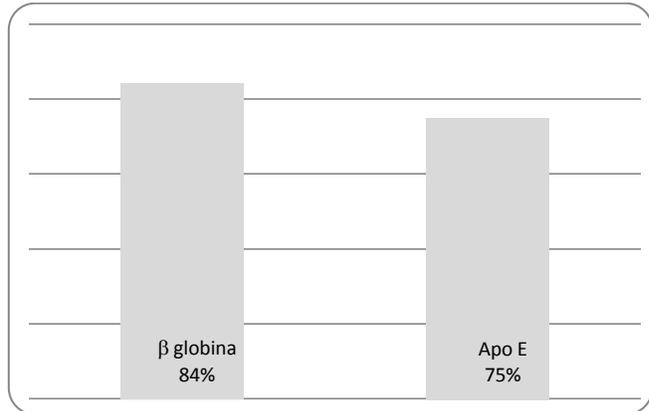
Figura 2. Electroforesis de los amplificadores de ApoE digeridos con la enzima de restricción Hha I



La intensidad de la fluorescencia de los productos de amplificación en el gel de agarosa fue similar para los genes β-globina y ApoE. Las muestras positivas fueron nuevamente amplificadas; se encontró consistencia en los resultados.

El ADN extraído fue también objeto de digestión por enzimas de restricción (Figura 2). Se obtuvo fragmentos de digestión de tamaños entre 40 y 70pb, de acuerdo a los 3 alelos del gen ApoE presentes en las muestras.

Figura 3. Muestras que amplificaron los genes β globina y ApoE empleando el ADN extraído por la técnica de salinización modificada



IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La extracción de ADN se llevó a cabo para estudios de genotipificación del gen ApoE. La técnica de aislamiento de ADN fue desarrollada a partir de un método reportado previamente, basado en desproteización por digestión con proteinasa K a 37°C, con posterior separación de proteínas del ADN empleando alta concentración de cloruro de sodio, seguido de la separación con etanol.

El ADN para los estudios de genotipificación del gen ApoE se extrajo mediante la técnica modificada de Miller y colaboradores¹. En breve, este protocolo se basa en la lisis celular con un detergente no aniónico como SDS, digestión con proteinasa K en un *buffer* de baja fuerza iónica, durante un periodo prolongado a 56°C, centrifugación a bajas velocidades por periodos de 30 minutos y desproteización por altas concentraciones de sal.

La técnica de Miller y colaboradores extrae ADN de sangre, con previo aislamiento de las células blancas nucleadas. Con ese mismo propósito, en el proyecto que origina este artículo, se utilizó sangre total, almacenada por largo tiempo en EDTA 0.5M, un agente quelante de los iones Mg²⁺, necesarios para la actividad de muchas enzimas.

Este compuesto protege al ADN de la desnaturalización por DNAsas presentes en la sangre aún

en periodos extensos de tiempo¹⁷. Sin embargo, se produjo lisis de las células rojas durante el periodo de almacenamiento.

Para el proceso de extracción se lisaron los glóbulos blancos por digestión con proteinasa K y SDS al 10%. La digestión con proteinasa K se realizó a 56°C en lugar de a 37°C, temperatura que aumenta la eficiencia de la reacción, durante más de diez horas. En el método convencional, la desproteínización se realiza con solución saturada de NaCl, en una concentración final de 0.5M. En el proyecto que origina este artículo se empleó una solución de NaCl tres veces más concentrada.

Por otro lado, el proceso de separación de las proteínas precipitadas por la solución salina fue optimizado al elevar la velocidad –de 2500 rpm a 5000 rpm– y tiempo de centrifugación –de 15 a 30 minutos–.

De igual manera, para aumentar el rendimiento de la técnica, la precipitación con etanol absoluto fue realizada por centrifugación a 3000 rpm durante treinta minutos, después de un periodo de incubación de diez horas a 4°C. Con el fin de eliminar residuos de sales adheridas al ADN, que podrían disminuir la efectividad del PCR, la pureza del ADN obtenido fue elevada por adición de un paso de lavado al ADN precipitado con etanol al 70%.

El 95% del ADN obtenido por este método presentó alto peso molecular, libre de contaminantes que interfieran con la amplificación, y con poca o ninguna degradación, a pesar del largo tiempo de almacenamiento a 4°C.

El éxito en la amplificación por PCR de β -globina y ApoE, demuestra que este método proporciona una solución de ADN con mínimos niveles de compuestos inhibidores del PCR, ya que los pasos incorporados de limpieza y mayor velocidad y tiempo de centrifugación, contribuyen a la eliminación de compuestos inhibidores, evitando su unión al ADN o impidiendo la inactivación de la enzima ADN polimerasa¹⁸.

La calidad y pureza del ADN obtenido son óptimas, puesto que un alto porcentaje de muestras procesadas fueron positivas para la amplificación por PCR y la digestión con enzimas de restricción. Adicionalmente, la cantidad que se obtuvo fue satisfactoria, lo que permite realizar múltiples ensayos.

En las técnicas como la PCR normalmente se descartan muestras que por su antigüedad podrían afectar el tipo de análisis. Este método permitiría realizar tomas de

muestras de sangre para aislar ADN en condiciones poco favorables, donde no se tenga a disposición un congelador y que por difícil acceso, el tiempo entre la toma de la muestra y la llegada al laboratorio pueda ser de varios días, semanas y hasta largos meses.

Se puede concluir que los resultados obtenidos mediante este método de extracción son fundamentales para continuar los estudios de polimorfismo genético de ApoE, y será el método de elección para futuros estudios de individuos con Alzheimer.

V. REFERENCIAS

1. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl.Acids Res.* 1988;16(3):1215
2. Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, Baechtel. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Forensic Sci.* 1994; 39(5):1254–1269
3. Löffert D, Stump S, Schaffrarh N. PCR: effect to template quality. *Qiagen News.* 1997;1:13-17
4. Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold S, Spring Harbor Laboratory. 1989
5. Gross-Bellard M, Oudet P, Chambón P: Isolation of high-molecular-weight-DNA from mammalian Cells. *Eur J Biochem.* 1973; 36(1):32-38
6. Loparev VN, Cartas MA, Monken CE, Velpandi A, Srinivasan A. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *J-Virol - Methods.* 1991; 34(1):105-112
7. Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, Mazurier C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(19):5908
8. McCusker J, Dawson M, Noone D, Gannon F, Smith T. Improved method for direct PCR amplification from whole blood. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(24):6747
9. Katcher HL, Schwartz I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: Enzymatic amplification in the presence of phenol. *BioTechniques.* 1994; 16(1):84–92
10. Panaccio M, Lew A. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(5):1151
11. Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Kato S. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Ann Clin Biochem.* 2000; 37:674-680
12. Yang Y, Kim J, Song Y, Kim D. A novel buffer system, AnyDirect, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Clinica Chimica Acta.* 2007; 380(1-2):112-117
13. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Hom GT, Mullis KB, Erlich HA. Primed-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239(4839):487-491
14. Bessetti J. An Introduction to PCR inhibitors. *Profiles in DNA.* 2007; 10(1):9-10
15. Hixson JE, Vernier,DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid Res.* 1990; 31:545-548
16. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics.* 1988; 3(4):373-379
17. Lahiri D K, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochemical Genetics.* 1993; 31(7-8):321-328
18. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(2):485–493

VI. CURRÍCULOS

Natali Valentina Payarés. Licenciada en Biología y Bioquímica, con maestría en Bioquímica, docente de las cátedras Bioquímica y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Salud de la Universidad Santiago de Cali. Investigadora del grupo Genética, Fisiología y Metabolismo del Centro de Estudio e Investigaciones en Salud, CEIS. Áreas de investigación: errores metabólicos hereditarios, riesgo genético de enfermedades metabólicas y enfermedades metabólicas no transmisibles.

Lida Inés Mancilla. Bióloga con énfasis en Genética, Magíster en Bioquímica y PhD en Ciencias Biomédicas. Docente de las cátedras biología celular y molecular y bioquímica de la Facultad de Salud de la Universidad Santiago de Cali. Coordinadora del grupo de investigación Genética, Fisiología y Metabolismo del Centro de Estudio e Investigaciones en Salud, CEIS. Áreas de investigación: errores metabólicos hereditarios, riesgo genético de enfermedades metabólicas y enfermedades metabólicas no transmisibles.