

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Equipos

Los siguientes termocicladores se emplearon para la amplificación por PCR:

- Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400.
- Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9600.
- Applied Biosystems, GeneAmp PCR Systems 9700.

5.2 Transformación bacteriana

5.2.1 Plásmidos

Para la obtención del control positivo se optó por la transformación bacteriana con un vector plásmido. Las cepas de *Escherichia coli* que se emplearon fueron DH5 α y XL1-blue proporcionadas amablemente por el Dr. Ignacio Martínez Laguna del Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla.

El plásmido empleado para la transformación fue pAULO-p185-T315I-GWB (Beisert T, 2006) que contiene el gen híbrido humano bcr-abl1 con la mutación T315I. El plásmido contiene los genes de resistencia a puromicina y el gen beta-lactamasa como marcadores de transformación. La figura 5.1 muestra el mapa del plásmido para control positivo. Se recibieron 5 μ g de plásmido y se diluyeron en 100 μ L de buffer TE estéril. La muestra se almacenó a -20°C.

El plásmido fue construido por el Dr. Tim Beissert y proporcionado cordialmente por el Dr. Martin Ruthardt de la Universidad J. W. Goethe, Frankfurt, Alemania.

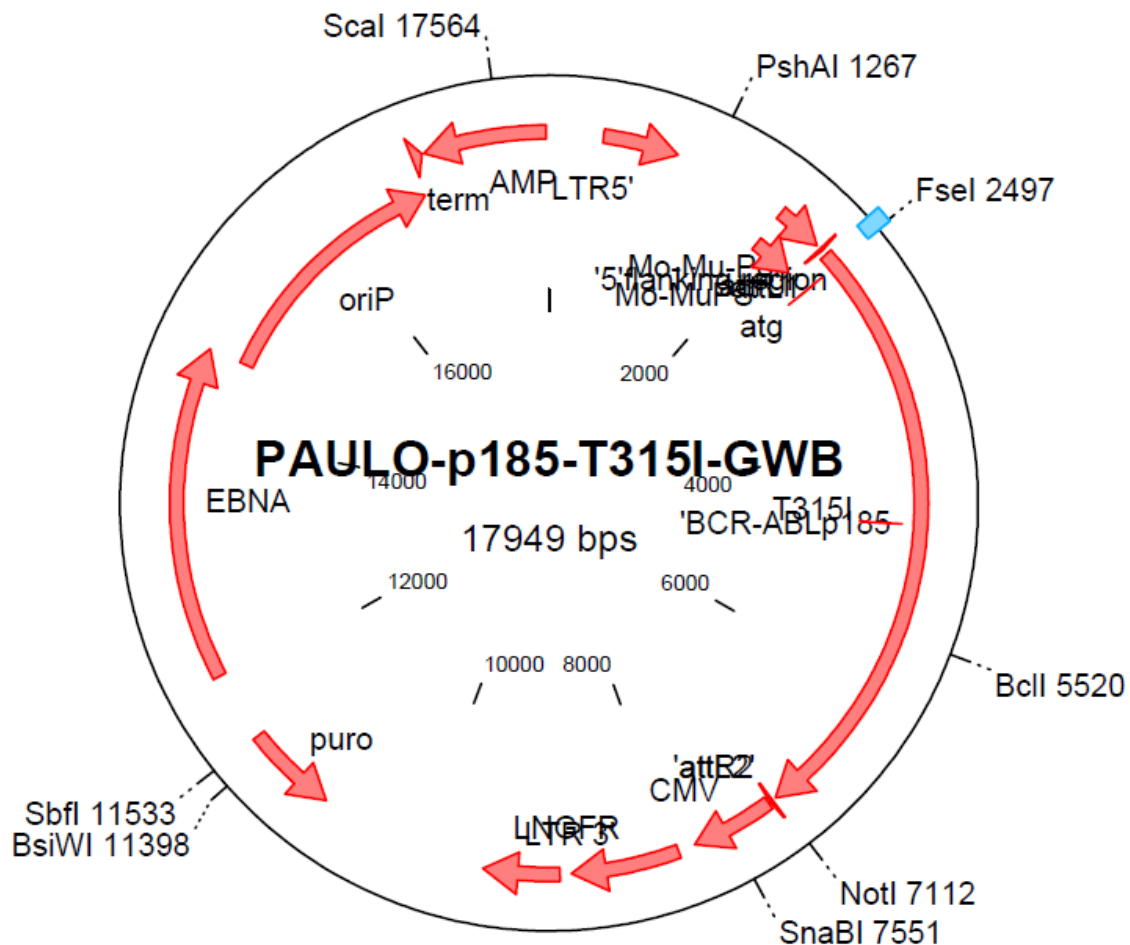


Fig. 5.1. Mapa del plásmido pAULO-p185-T315I-GWB (Beissert T, 2006). En el texto se empleará la forma abreviada pAULO-T315I para referirse al mismo.

En todos los experimentos de transformación se empleó como plásmido control pUC18 cuyo mapa genético se muestra en la figura 5.2.

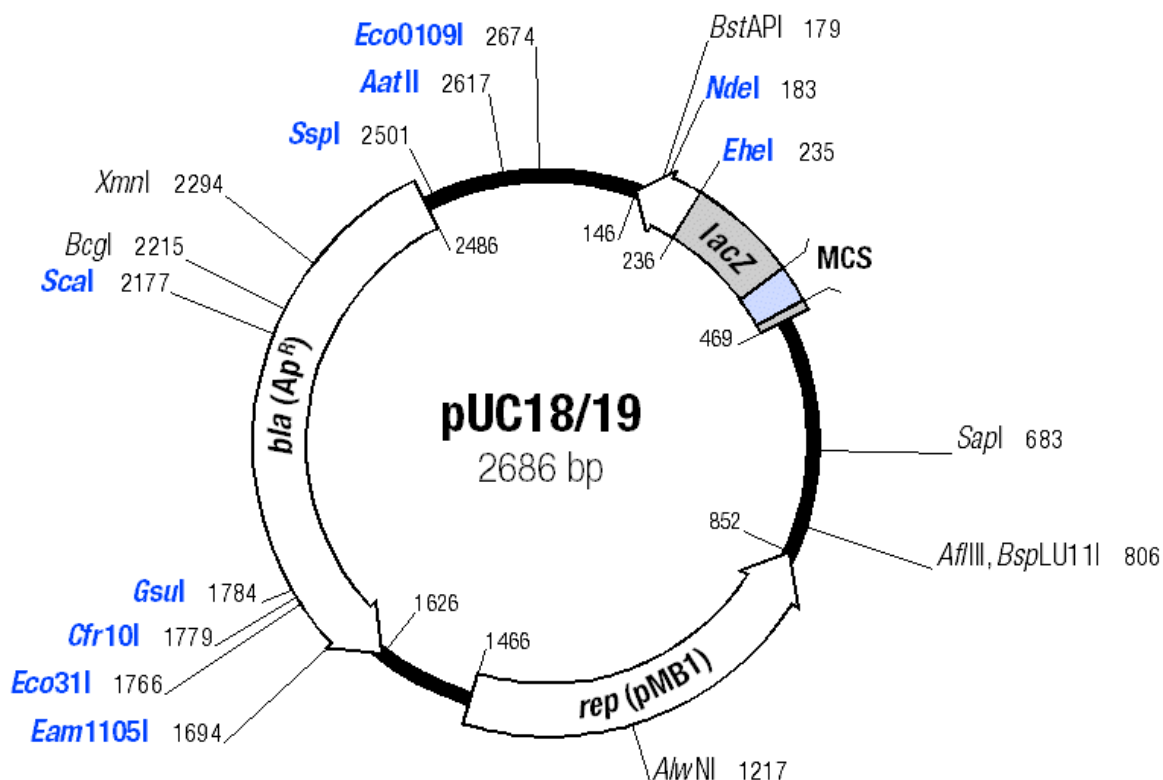


Fig. 5.2. Mapa genético de pUC18 y pUC19 (Fermentas Life Sciences, 2006)

5.2.2 Células competentes

Para la obtención de células competentes se empleó el protocolo reportado por Zhiming Tu et al. (2005), al cual se le hicieron algunas modificaciones para adecuarlo a las condiciones imperantes. La preparación de las soluciones empleadas se describe en la sección de Anexos 9.1, 9.2 y 9.3.

El método consistió en inocular 2 mL de medio líquido S.O.C. fresco e incubar a 37°C durante toda la noche en agitación constante. Después tomar 1 mL del medio con crecimiento

y colocarlo en 20 mL de S.O.C. e incubar nuevamente a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una densidad óptica OD₆₀₀ de 0.2-0.4 (2-3 horas aproximadamente).

Una vez que se obtiene la OD₆₀₀ adecuada, los siguientes pasos son siempre a una temperatura de 4°C. Pasar los 20 mL de medio crecido a dos tubos falcon de 15 mL (10 mL en cada tubo) y centrifugar durante 10 min a 4000 rpm. Eliminar el sobrenadante, resuspender el pellet en 5 mL de solución TB e incubar la solución a 4°C durante 25 minutos. Posteriormente centrifugar, eliminar el sobrenadante y disolver el pellet en 1 mL de la solución TB. Mantener siempre a 4°C.

5.2.3 Transformación bacteriana

Para la transformación de las células competentes previamente obtenidas se siguió el protocolo complementario (Tu Z et al., 2005).

Una vez que se obtienen las células competentes, tomar 100 µL de dicha solución y colocarlas en un tubo Eppendorf y añadir 5 µL de la solución de plásmido pAULO-T315I junto con 1 µL de DMSO. Incubar en hielo durante 30 min y posteriormente calentar durante 90 segundos exactamente a 42°C. Incubar nuevamente en hielo durante 5 min y agregar 400 µL de medio S.O.C. líquido e incubar a 37°C durante 45 min. Tomar 50 µL y colocarlos sobre una placa de S.O.C. con ampicilina e incubar toda la noche.

Lo anterior también se realizó con el plásmido control pUC18.

La eficiencia de la transformación en ufc/ μ g se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{ufc transformadas} = \frac{(\text{No. de colonias})(\text{Coeficiente dilución})(\text{Vol. original de transformación})}{\text{Volumen empleado en la placa}}$$

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{ufc transformadas}}{\text{DNA de plásmido (en } \mu\text{g)}}$$

5.2.4 Lisis bacteriana y extracción del plásmido

Previo a la lisis y extracción es necesario crecer colonias bacterianas aisladas en 2 mL de medio LB-Ampicilina durante toda la noche con agitación. Posteriormente se adiciona 1 mL de medio crecido previamente y se colocan en 100 mL de LB-Ampicilina con agitación vigorosa a 37°C durante toda la noche.

El protocolo empleado es una modificación de los métodos de Birnboim y Doly (1979) y Ish-Horowicz y Burke (1981) de acuerdo a Sambrook (1990).

El método consistió en colocar los 100 mL de medio con crecimiento en 2 tubos Falcon de 50 mL y centrifugar a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante y añadir 3 mL de Solución I fría y agitar con vórtex. Añadir 1 mL de solución STE, agitar y centrifugar. Después de retirar el sobrenadante, resuspender el pellet en solución I como se ha señalado previamente y añadir 1 mL de una solución fresca de lisozima pH 8.0 y 2 mL de solución II fría recién preparada. Mezclar con movimientos suaves, almacenar a temperatura

ambiente durante 10 min. Agregar 3 mL de solución III helada, agitar con vórtex y almacenar sobre hielo durante 5 min. A continuación centrifugar a 4000 rpm durante 5 min a 4°C y transferir el sobrenadante en un tubo fresco. Subsiguientemente añadir un volumen igual de una solución de fenol:cloroformo (1:1), mezclar con vórtex y centrifugar como se ha descrito previamente, transferir el sobrenadante a un tubo fresco. Para precipitar el DNA de doble cadena añadir 2 mL de isopropanol, mezclar y almacenar 10 minutos a temperatura ambiente; centrifugar como se ha descrito previamente. Retirar el sobrenadante con mucho cuidado y resuspender el pellet de DNA con 2 mL de etanol frío al 70% por duplicado. Centrifugar y retirar el sobrenadante, permitir secar el pellet de DNA durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente disolver el pellet de DNA en 1 mL de TE con RNAasa. Almacenar a -20°C.

El análisis del plásmido se hizo en geles de agarosa al 0.8 %.

La presencia de tRNA en grandes cantidades requirió de otro tratamiento de RNAasa durante 2 horas o por toda la noche para evitar digestiones parciales. Posteriormente se volvió a extraer con volúmenes iguales de fenol/cloroformo. Se agregó 1/10 parte del volumen de 3 M de acetato de sodio pH 5.2 y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto.

5.2.5 Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se realizó midiendo la densidad óptica a 260 nm. Un valor de OD_{260} igual a 1 corresponde a 50 µg/mL de DNA de doble cadena.

Para calcular la pureza se midió también el valor de OD a 280 nm. El cociente obtenido a partir de OD_{260}/OD_{280} nos proporciona el valor de pureza. Un valor de 1.7-1.9 es aceptable.

Para calcular el número de copias presente en una determinada cantidad de dsDNA se empleó la siguiente ecuación:

$$\# \text{ de copias de dsDNA} = \frac{(\text{cantidad dsDNA}) (6.022 \times 10^{23})}{\#pb (1 \times 10^3)(660)}$$

En donde la cantidad de DNA debe estar expresada en mg. El número de Avogadro corresponde a 6.022×10^{23} ; # pb es la longitud de la cadena de DNA expresado en pares de bases y finalmente 660 (g/mol) corresponde al peso molecular de un par de bases presente en cualquier cadena de dsDNA.

5.3 Amplificación por ARMS-PCR

La amplificación se realizó en una mezcla para PCR constituida por 2.5 μL de buffer 10xPCR con una concentración de MgCl_2 de 15mM, 2.5 μL de 2mM dNTPs, 2.5 μL de solución de primers 5 μM , 1 U de Taq DNA polimerasa y 1 μL de muestra de DNA para un volumen final de 25 μL .

Se emplearon tres primers diferentes distribuidos en dos mezclas. Dos primers son alelo-específicos y están diseñados para ARMS-PCR a los cuales se les hizo un cambio en el penúltimo nucleótido del extremo 3' para originar un desajuste de bases ("mismatch") y aumentar la especificidad por parte de Taq DNA-polimerasa. Se designó con la letra C al

oligonucleótido inespecífico que es común para los dos alelos. Para la mezcla de PCR se emplearon dos mezclas de primers denominadas mezcla T (primer T + primer C) y mezcla I (primer I + primer C). La secuencia de los primers se muestra a continuación:

Oligonucleótido	Secuencia
Primer T	5' AGC CCC CGT TCT ATA TCA T <u>C</u> T C 3'
Primer I	5' AGC CCC CGT TCT ATA TCA T <u>C</u> T T 3'
Primer C	5' AGC AGC ACC ACG GCG TTC ACC T 3'

Tabla 5.1. Secuencia de los tres primers empleados para la amplificación por ARMS-PCR. La base subrayada fue introducida para generar un desajuste de bases.

El perfil de temperaturas en cada ciclo para la amplificación por PCR se muestra en la siguiente tabla:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Primera desnaturalización	94 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	20 segundos	35
Hibridación	60 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	30 segundos	
Post-ciclo (extensión)	72 °C	2 minutos	1

Tabla 5.2. Perfil de temperaturas empleadas para amplificación por ARMS-PCR.

Una muestra de paciente positivo T315I fue proporcionada por el Dr. Guillermo Ruiz Argüelles. Dicha muestra funcionó como control positivo temporal.

5.4 Caracterización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación se analizaron en geles de poliacrilamida al 4.5 % empleando el marcador de pUC18 digerido con *Hpa II*.

En todos los casos los productos de amplificación tienen una longitud de 100 pares de bases. Para poder comprobar que los productos amplificados son los buscados se realizaron digestiones de dichos productos con las enzimas *Hpa II* y *Dde I*.

Las mezclas de digestión consistieron en 7 μL de agua, 2 μL del buffer, 1 μL de la enzima de restricción correspondiente y 10 μL del producto de amplificación (volumen final 20 μL). Las digestiones están listas en 2 h aproximadamente a 37°C para ambas enzimas, sin embargo se dejaron toda la noche para evitar posibles digestiones parciales. El análisis de los fragmentos de restricción se hizo en geles de poliacrilamida al 6.0 % y posterior tinción con bromuro de etidio.

5.5 Especificidad y sensibilidad analíticas

Para medir la especificidad analítica del método se realizaron amplificaciones con DNA humano normal con la mezcla I de primers. Se utilizaron 3 diferentes concentraciones de primers para forzar una amplificación sobre DNA humano (control negativo). Las concentraciones de primers fueron 1x, 2x y 4x considerando x la concentración indicada en el protocolo para la mezcla de PCR descrito en la sección 5.3. La concentración inicial de

control negativo fue de 0.391 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las diluciones del control negativo en TE para amplificación con la mezcla I fueron 1:3, seis diluciones en total.

Después se realizaron diluciones de control positivo/control negativo. La concentración de control negativo empleada en las diluciones con control positivo corresponde a aquella concentración mínima con la que sí se obtuvo producto de amplificación con la mezcla I.

Las diluciones corresponden a 1:3 (control positivo: control negativo) partiendo de una concentración inicial de 100 000 copias de control positivo y control negativo. De dichas soluciones se hicieron amplificaciones con las mezclas de primer I y T a concentraciones 1x, 2x y 4x. De esta forma se obtiene una relación entre la concentración mínima de control positivo que puede ser amplificada y observada en un gel respecto a una concentración dada de control negativo determinándose así la sensibilidad analítica.