

6. RESULTADOS

6.1 Células competentes y transformación

La primera parte experimental del trabajo consistió en la obtención de células competentes y posterior transformación de éstas para la elaboración de un control positivo. La transformación resultó más exitosa con la cepa DH5 α de *E. coli* en comparación con la cepa XL1-blue. De manera que las colonias utilizadas en todos los estudios corresponden a las de DH5 α transformadas. La figura 6.1 muestra la placa de medio S.O.C. con ampicilina de células DH5 α transformadas con pAULO-T315I.



Figura 6.1. Placa de medio S.O.C. con ampicilina en la que aparecen colonias DH5 α transformadas con el plásmido pAULO-T315I.

La eficiencia de transformación de DH5 α con pAULO-T315I se calculó como sigue:

$$\text{ufc transformadas} = \frac{(48) (10\ 000)(100)}{50} = 9.6 \times 10^5 \text{ ufc}$$

En la ecuación anterior el 48 corresponde al número de colonias observadas en la placa después de incubarla toda la noche. Este valor corresponde al promedio de 3 repeticiones. El volumen de células competentes previo a la transformación fue 100 μL al cual se le añadieron posteriormente 400 μL más de medio, por lo cual el coeficiente de dilución es 10 000. El 50 corresponde al volumen de medio empleado sobre la placa. El resultado con XL1-blue fue de 4×10^4 ufc. En este caso se emplearon 100 μL de medio para sembrar en placa.

Para calcular la eficiencia de la transformación con DH5 α se divide el valor obtenido de ufc entre la cantidad de plásmido empleado:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{9.6 \times 10^5 \text{ ufc}}{0.25 \mu\text{g}} = 3.8 \times 10^6 \text{ ufc}/\mu\text{g}$$

En la que 9.6×10^5 corresponde a las ufc transformadas y 0.25 μg fue la cantidad de plásmido empleado para la transformación (5 μL con una concentración de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de plásmido pAULO-T315I). La eficiencia de transformación para XL1-blue fue de 1.6×10^5 ufc/ μg .

Como control de transformación se empleó pUC18. DH5 α transformada con este plásmido tuvo una eficiencia de 1.26×10^7 ufc/ μg y XL1-blue 1.2×10^7 ufc/ μg .

6.2 Lisis alcalina y extracción del plásmido

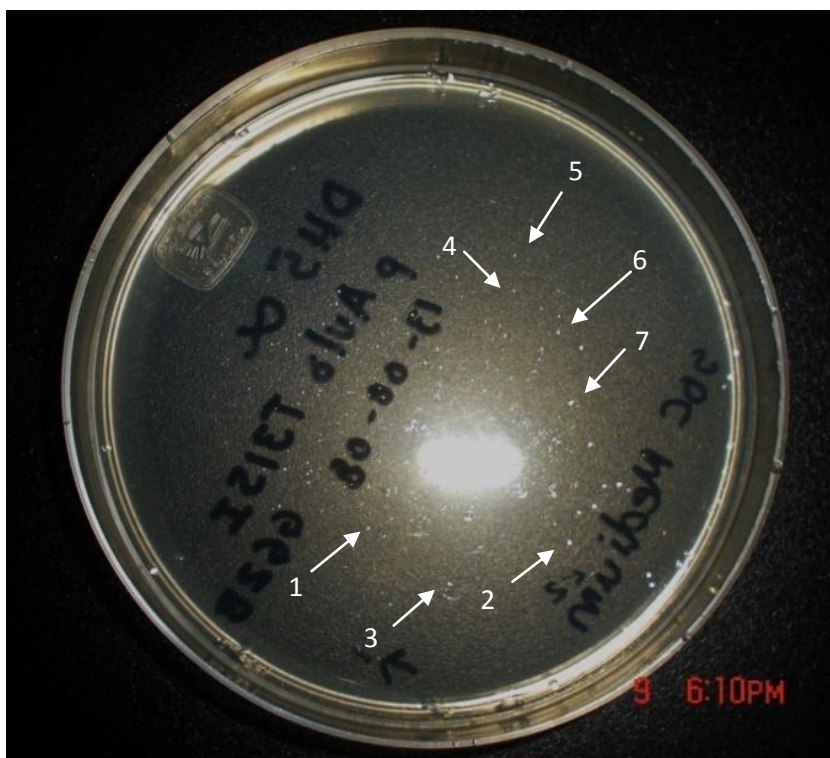


Figura 6.2. Fotografía de la placa con medio S.O.C. con células DH5 α transformadas con pAULO-T315I. Las colonias empleadas para minilizados están marcadas con una flecha y numeradas del 1 al 7.

Para la extracción del plásmido de las células transformadas, se seleccionaron colonias lo más aisladas posible las cuales constituyen clonas diferentes. Fueron 7 las colonias seleccionadas (figura 6.2) a las cuales se les sometió a lisis alcalina para posterior extracción de DNA de plásmido con el método de minipreparados para identificar las clonas que poseen el plásmido de interés. La figura 6.3 muestra un gel de agarosa con los resultados obtenidos de los minilizados.

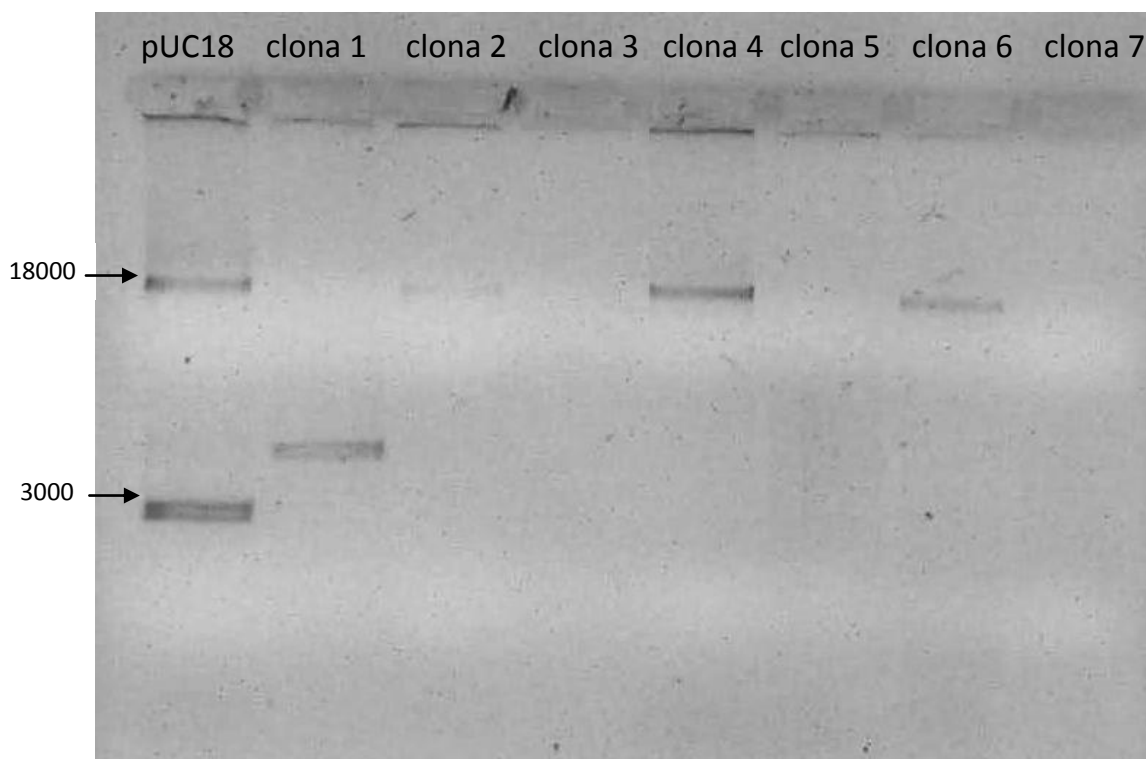


Figura 6.3. Plásmidos obtenidos por minilizados de 7 colonias seleccionadas. Se observan resultados positivos para las clonas 2, 4 y 6. La banda más intensa se observa con la clona 4. La clona 1 presenta un producto diferente de pAULO-T315I. El plásmido control empleado fue pUC18. Gel de agarosa al 0.8 %.

Como se puede observar en la fotografía, las clonas 3, 5 y 7 no contienen plásmido, mientras que las clonas 1, 2, 4 y 6 sí. De estas últimas, las que muestran bandas más intensas son las colonias 1 y 4. Sin embargo, la clona 1 presenta una banda de algún producto que no corresponde a pAULO. Por su parte, la colonia 2 presenta la banda más nítida de las clonas positivas para el plásmido. Las clonas 4 y 6 fueron resembradas y se les volvió a someter a minilizados para comprobar la presencia del plásmido. La figura 6.4 muestra las bandas de plásmido de las colonias 6 y 4.

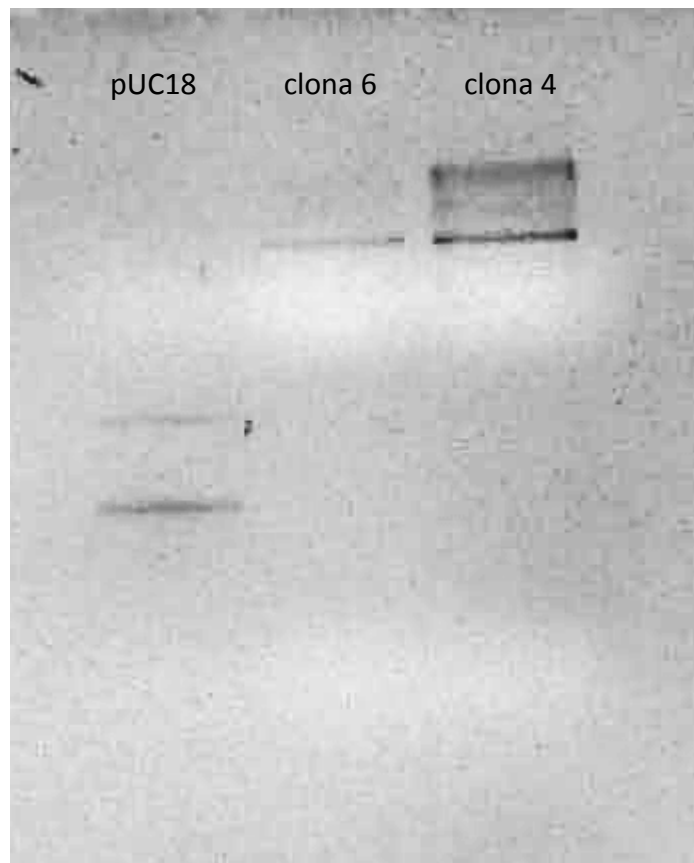


Figura 6.4. Plásmidos obtenidos de las clonas 4 y 6 sometidas a minilisisados.

Gel de agarosa al 0.8%

La clona seleccionada para la extracción final de plásmido fue la 4 por presentar una banda más intensa. Para la lisis alcalina subsecuente se utilizaron 200 mL de medio LB con ampicilina para crecer la clona 4 y posterior extracción del plásmido. En la figura 6.5 se muestra el gel del plásmido obtenido.

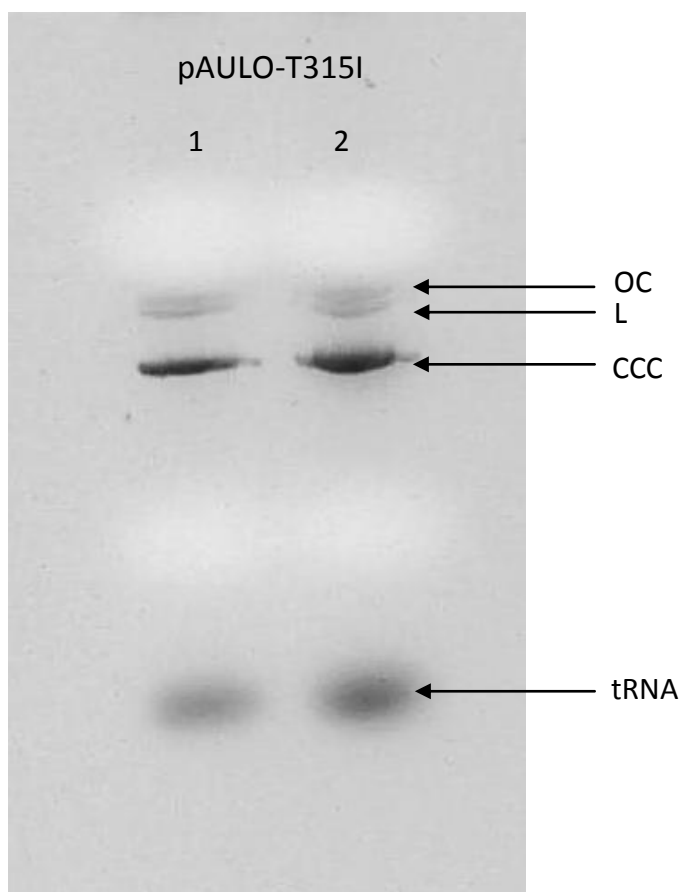


Figura 6.5. Plásmido pAULO-T315I obtenido de lisis alcalina de la clona 4. Se presentan dos bandas (1 y 2) porque los 200 mL de medio se separaron en dos muestras de 100 mL cada una lisadas por separado. Los topoisómeros OC, L y CCC están señalados con flechas así como la presencia de tRNA remanente después del tratamiento con RNAasa. Gel de agarosa al 0.8%.

En la figura 6.5 se puede observar la presencia de pAULO-T315I con bandas más intensas por la cantidad obtenida de plásmido en comparación a los minilizados. Son dos las bandas mostradas ya que el lisado de los 200 mL de medio con crecimiento se hizo en dos porciones de 100 mL por separado. Asimismo se aprecia la presencia de topoisómeros del plásmido. En primer lugar está la banda correspondiente a OC (open circular) en el cual el plásmido se encuentra totalmente abierto y ligeramente más abajo se encuentran el topoisómero L (lineal)

seguida de una banda más intensa de CCC (Covalently Closed Circle) el cual presenta superhelicidad. En la parte inferior se encuentra una “mancha” remanente de tRNA. Previamente a la toma de la fotografía, las muestras de plásmido fueron sometidas a un tratamiento de RNAasa a 45°C durante toda la noche y precipitación con acetato de sodio 3M para eliminar en lo posible la presencia de RNA. La muestra de plásmido se diluyó en 1 mL de buffer TE.

6.3 Cuantificación de DNA

Los valores obtenidos de las densidades ópticas medidas a longitudes de onda de 260 y 280 nm de una dilución 1:1000 de la muestra de pAULO-T315I son los siguientes:

OD ₂₆₀	0.065
OD ₂₈₀	0.036

De acuerdo a los valores anteriores el cociente OD₂₆₀ / OD₂₈₀ es 1.8, el cual constituye un valor aceptable de pureza.

Una vez conocido el valor de OD₂₆₀ se puede calcular la concentración de DNA de doble cadena considerando que un valor OD₂₆₀ de 1 corresponde a 50µg/mL de dsDNA.

Entonces la concentración de pAULO-T315I es:

$$[]_{DNA} = \frac{(50 \mu g/mL)(1)}{0.065} = 3.25 \mu g/mL$$

Considerando la dilución 1:1000 con la que se midieron los valores de OD₂₆₀, la concentración total de plásmido en la muestra es de 3.25 mg/mL.

De acuerdo a la ecuación en la sección 5.2.5 de Materiales y Métodos, el cálculo del número de copias de plásmido en toda la muestra (1 mL) se resolvió de la siguiente manera:

$$\# \text{ de copias de dsDNA} = \frac{(3.25) (6.022 \times 10^{23})}{(17949) (1 \times 10^3) (660)} = 1.65 \times 10^{14} \text{ copias/mL}$$

De manera que si se toma 1 µL de muestra, hay 1.65×10^{11} copias de plásmido.

6.4 Amplificación por ARMS-PCR

Las amplificaciones por ARMS-PCR se hicieron como se describe en la sección 5.3. Como se comentó en la introducción se necesitan dos mezclas de oligonucleótidos. En este método la mezcla de primers T en condiciones normales, sólo amplifica al alelo específico no mutado. Mientras que la mezcla de primers I lo hace para el alelo con la mutación. A continuación se muestran las secuencias de los amplicones normal y mutado:

Secuencia del amplicón normal (T)	5' <u>AGCCCCGTTCTATATCATCT</u> C TGAGTTCATGACCTACGGG AACCTCCTGGACTACCTGAGGGAGTGCAACCGGCAGGAGG T G <u>AACGCCGTGGTGCTGCT</u> 3'
Secuencia del amplicón mutado (I)	5' <u>AGCCCCGTTCTATATCATCT</u> T TGAGTTCATGACCTACGGG AACCTCCTGGACTACCTGAGGGAGTGCAACCGGCAGGAGG T G <u>AACGCCGTGGTGCTGCT</u> 3'

Tabla 6.1. Secuencias de los productos de amplificación T e I. Las bases subrayadas corresponden a los primers. La base en negrita corresponde al nucleótido afectado por la mutación C→T.

Los dos productos de amplificación tienen una longitud de 100 bases de manera que en un gel las bandas del mutado y el normal corren a la misma distancia. En la mezcla de reacción se empleó como control positivo pAULO-T315I y como control negativo DNA humano sin la mutación. En la figura 6.6 se observa un gel en la que se muestran los productos de amplificación del control positivo y negativo con las dos mezclas de primers (I y T).

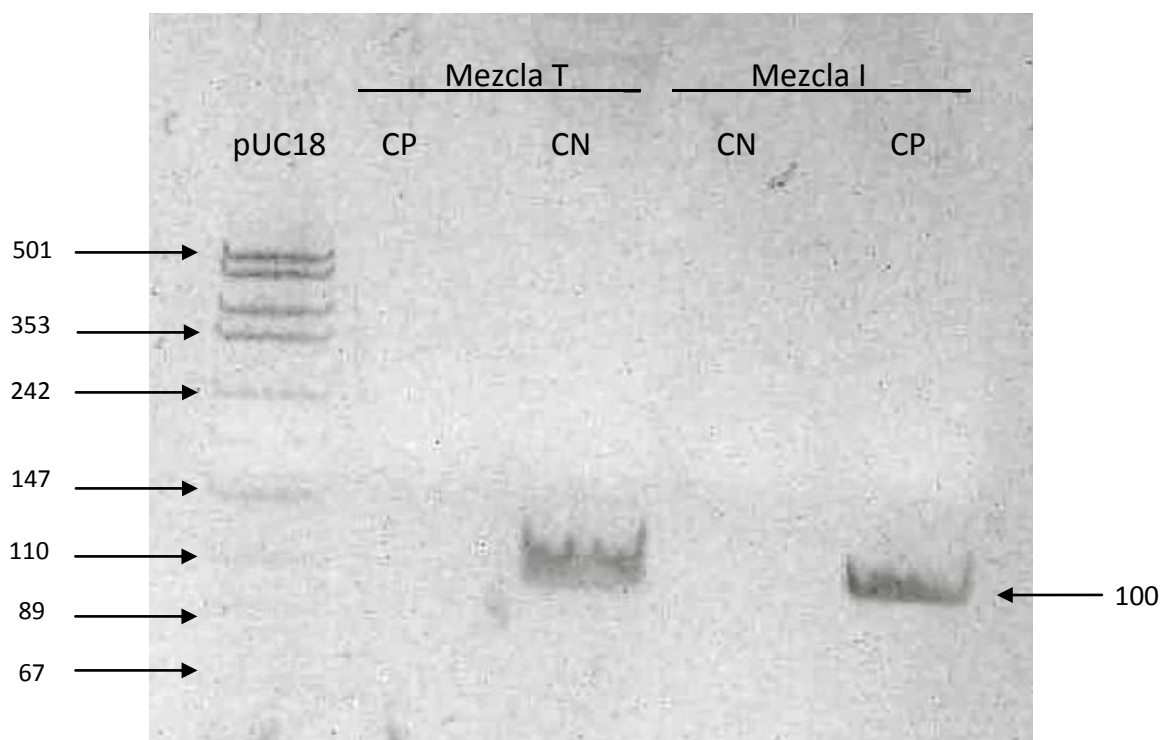


Figura 6.6. Productos de amplificación de CP: control positivo (plásmido pAULO-T315I) y de CN: control negativo (DNA humano sin la mutación T315I) cada uno sometido a amplificación con las dos mezclas de primers (mezcla T y mezcla I). El producto de amplificación con la mezcla T es positivo para CN y negativo para CP, mientras que con la mezcla I, el producto de amplificación es positivo con CP y negativo para CN. El marcador es pUC18 digerido con *Hpa II*. Gel de poliacrilamida al 4.5%.

La misma amplificación se realizó con la muestra del paciente positivo para la mutación T315I proporcionada por el Dr. Guillermo J. Ruiz Argüelles, el cual sirvió como control

positivo temporal. La figura 6.7 muestra el gel de los productos de amplificación del control negativo y del paciente positivo para T315I.

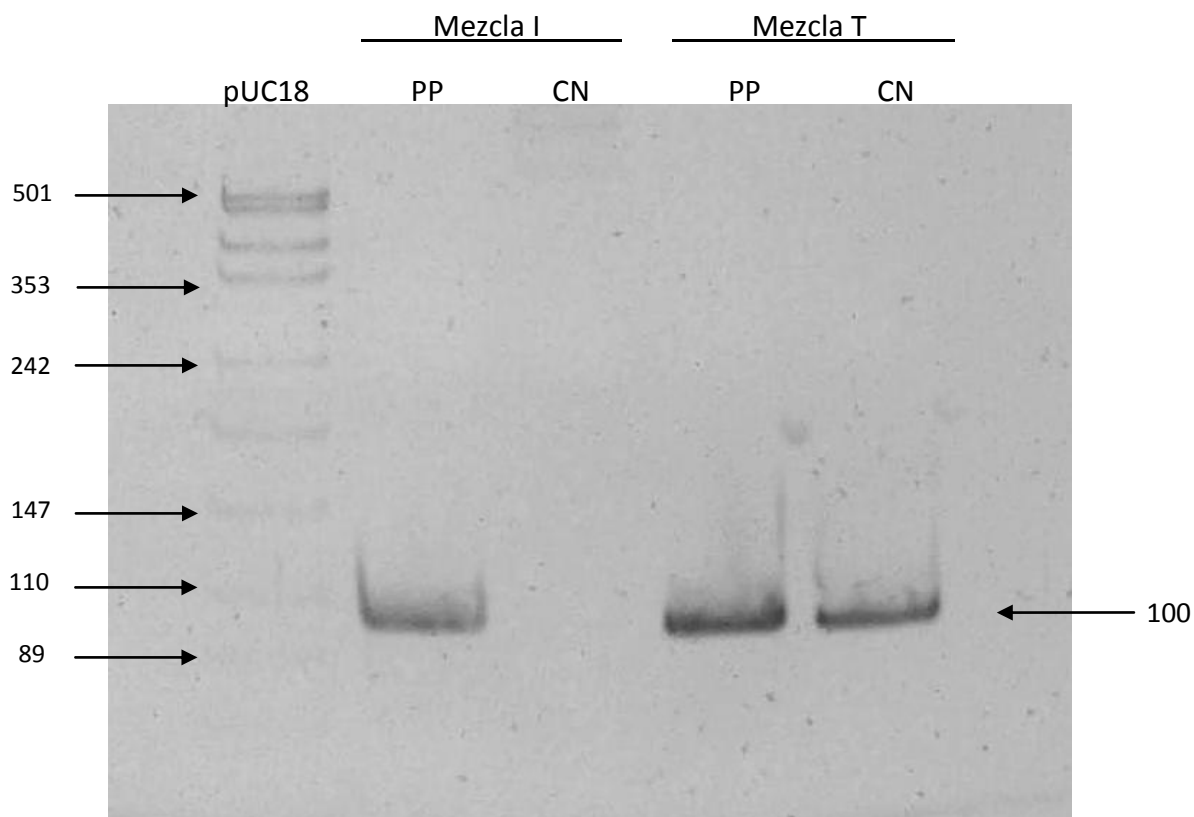


Figura 6.7. Productos de amplificación de PP: paciente positivo (Con la mutación T315I de ABL1) y CN: control negativo (DNA humano normal) con la mezcla de primers I y la mezcla T. Como se observa el paciente positivo presenta bandas tanto con la mezcla I como con la mezcla T lo cual indica que es heterocigoto para la mutación T315I. Gel de poliacrilamida al 4.5%.

6.5 Caracterización de los productos de amplificación

Para la caracterización de los productos de amplificación se hicieron digestiones con las enzimas *Hpa II* y *Dde I* como se ha descrito en la sección 5.4 de Materiales y Métodos.

La enzima *Hpa II* reconoce y corta la secuencia CCGG y *Dde I* corta en la secuencia CTNAG. En la tabla 6.2 se muestra la secuencia de los productos de amplificación I y T y los sitios de restricción.

Amplicón I con <i>HpaII</i>	5'AGCCCCGTTCTATATCATCATTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTC CTGGACTACCTGAGGGAGTGCAAC CCGG CAGGAGGTGAACGCCGTGGT GCTGCT 3'
Amplicón I con <i>Dde I</i>	5'AGCCCCGTTCTATATCATCATTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTC CTGGACTAC CTGAG GGAGTGCAACCGGCAGGAGGTGAACGCCGTGGT GCTGCT 3'
Amplicón T con <i>Dde I</i>	5'AGCCCCGTTCTATATCATCA CTGAG TTCATGACCTACGGGAACCTC CTGGACTAC CTGAG GGAGTGCAACCGGCAGGAGGTGAACGCCGTGGT GCTGCT 3'

Tabla 6.2. Secuencias de productos de amplificación I y T en las que se resalta en negritas y subrayado las secuencias de los sitios en que las enzimas hacen el corte. El amplicón T da los mismos patrones de restricción que el amplicón I con *Hpa II* por lo que se omitió en la tabla. Por su parte, los amplicones T e I tienen distintos patrones de restricción con *Dde I*.

La figura 6.8 indica los patrones de restricción del producto de amplificación I con *Hpa II* y con *Dde I*. Por su parte la figura 6.9 muestra la digestión del amplicón T con *Dde I*.

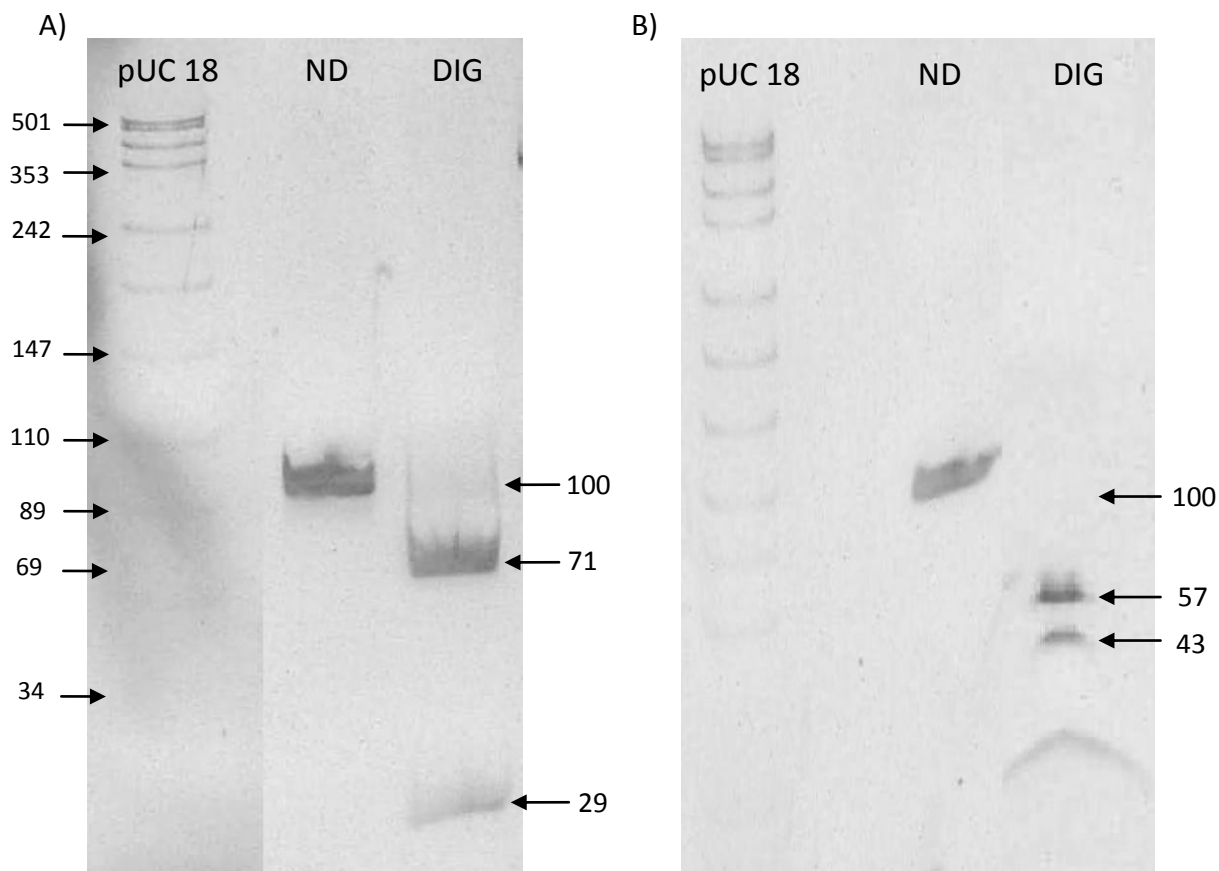


Figura 6.8. A) Perfil de restricción del producto de amplificación I digerido con la enzima *Hpa II*. Primero se muestra al no digerido (ND) y en segundo lugar al producto digerido (DIG) el cual muestra una banda de 71 y otra de 29 bases. B) Digestión del amplicón I con *Dde I*. En primer lugar se observa también el producto no digerido (ND) y en segundo lugar el digerido (DIG) con dos bandas, una de 57 y otra de 43 bases. Marcador pUC18 digerido con *Hpa II*. Gel de poliacrilamida al 6.0%.

La figura anterior muestra los perfiles de restricción del amplicón I con *Hpa II* y *Dde I*. Con *Hpa II* se observan dos bandas (de 71 y 29 bases) mientras que con *Dde I* una de 57 y otra de 43 de acuerdo a la información de la tabla 6.2.

La digestión del amplicón T con la enzima *Hpa II* tiene un patrón de restricción igual al del amplicón I ya que el sitio de corte de esta enzima está presente en ambos productos. Sin

embargo, el patrón de restricción con *Dde I* sí es diferente como se muestra en la figura 6.9 lo cual permite distinguir el amplicón T del I.

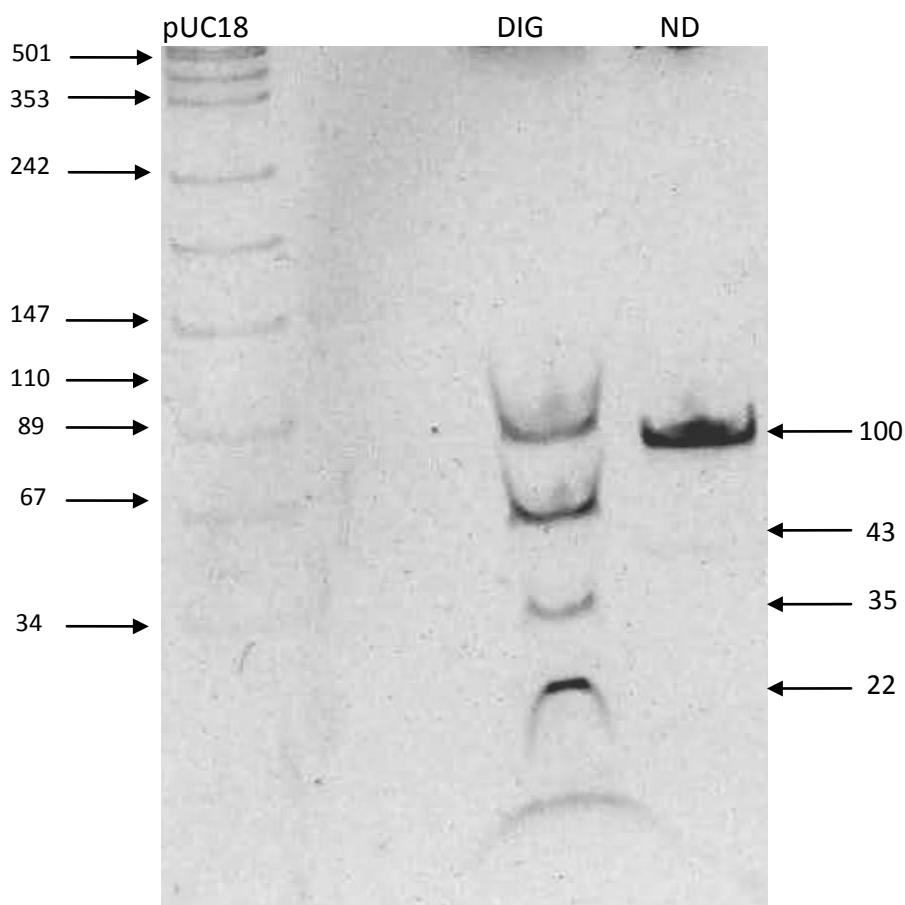


Figura 6.9. Digestión del amplicón T con *Dde I*. En primer lugar se observan las bandas correspondientes al amplicón digerido (DIG) y en segundo lugar el no digerido (ND). Hay cuatro bandas como resultado de la digestión; la primera corresponde al amplicón remanente que no fue digerido, la siguiente a una banda de 43 bases de longitud, otra de 35 y finalmente una de 22 lo cual concuerda con el número de bandas esperado a partir de la información de la tabla 6.2. Esta digestión permite distinguir entre el amplicón I y el T, ya que el primero presenta dos bandas producidas por la digestión con *Dde I* mientras que T presenta tres. Gel de poliacrilamida al 6.0%.

6.6 Especificidad y sensibilidad analíticas

Para medir la especificidad analítica se realizaron ampliificaciones con el control negativo a diferentes concentraciones de primer I como se menciona en la sección 5.5. Se partió de una muestra de DNA humano sano con una concentración de $0.391 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ cuyo número de copias es de $1.1 \times 10^5/\mu\text{L}$ pero para fines prácticos en las diluciones se consideró un valor de 100 000.

Se realizaron 6 diluciones 1:3 de DNA humano en TE a las cuales corresponden los siguientes números de copias: dilución 1, 30 000 copias; dilución 2, 10 000 copias; dilución 3, 3 000 copias; dilución 4, 1000 copias; dilución 5, 300 copias; dilución 6, 100 copias. En las mezclas de reacción se empleó $1 \mu\text{L}$ de muestra de DNA y se amplificó a concentraciones de primer 1x, 2x y 4x. No hubo bandas observables con la mezcla I a concentraciones 1x ni 2x. Con una concentración 4x sí se obtuvieron productos de amplificación de las dos primeras diluciones como se muestra en la figura 6.10.

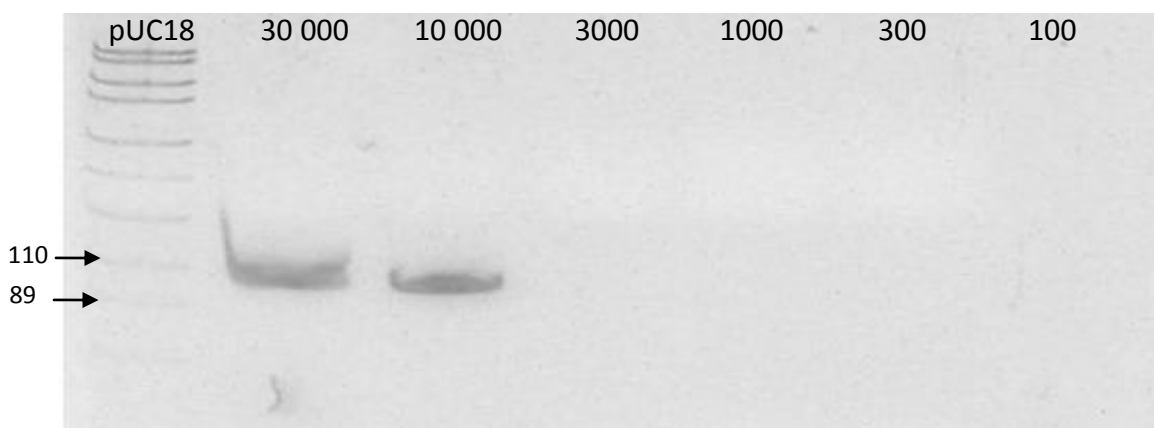


Figura 6.10. Productos de amplificación de diluciones 1:3 de DNA humano (control negativo) en TE con mezcla I de primers a concentración 4x. Las bandas que son positivas corresponden a las diluciones 1 y 2 las cuales tienen 30 000 y 10 000 copias de DNA humano respectivamente. Gel de poliacrilamida al 4.5%.

De acuerdo a los resultados de la figura 6.10 se obtiene que el número de copias mínimo de DNA humano a la que el resultado es positivo con la mezcla I (4x) es de 10 000 copias.

Las diluciones 1:3 preparadas de Control Positivo (plásmido pAULO-T315I) en DNA humano se iniciaron a partir de una concentración 1:1, es decir 10 000 copias de DNA humano y 10 000 copias de pAULO-T315I. Por lo tanto las diluciones 1:3 contenían los siguientes números de copias de Control Positivo: dilución 1, 10 000; dilución 2, 3 000; dilución 3, 1000; dilución 4, 300, dilución 5, 100, dilución 6, 30. Dichas diluciones de Control positivo / DNA humano fueron amplificadas con la mezcla T y con la mezcla I de primers. Como todas tienen una concentración prácticamente constante de DNA humano (control negativo), los resultados son los mismos para las 6 diluciones con mezcla T de primers como se observa en la figura 6.11.

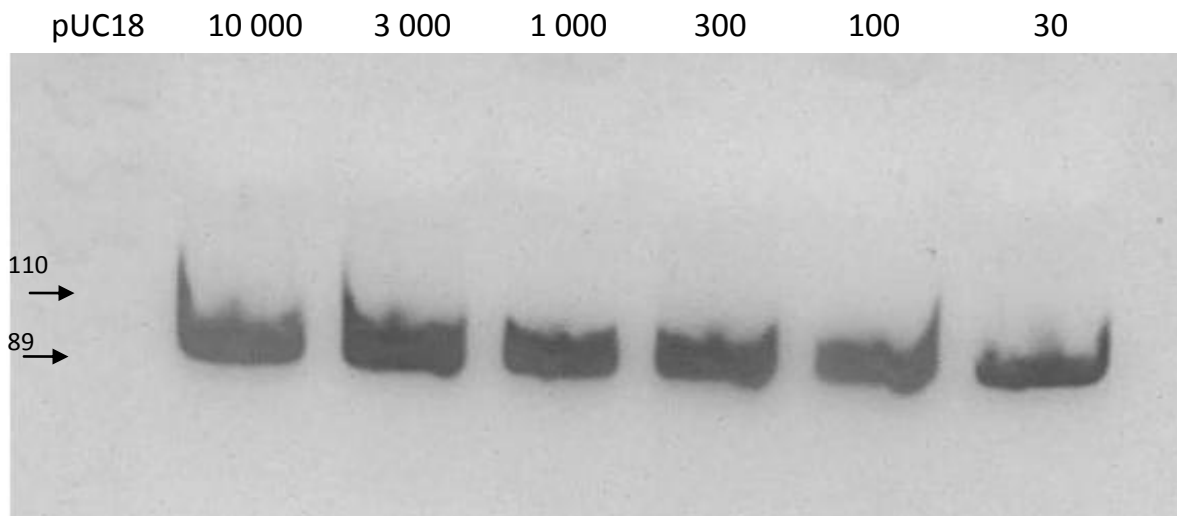


Figura. 6.11. Amplificación de diluciones CP/CN (pAULO-T315I /DNA humano normal) con mezcla T de primers. En la parte superior se especifica el número de copias de Control Positivo presente en las diluciones. Todas las diluciones dan resultados positivos por presencia constante de DNA humano (control negativo). Gel de poliacrilamida al 4.5 %.

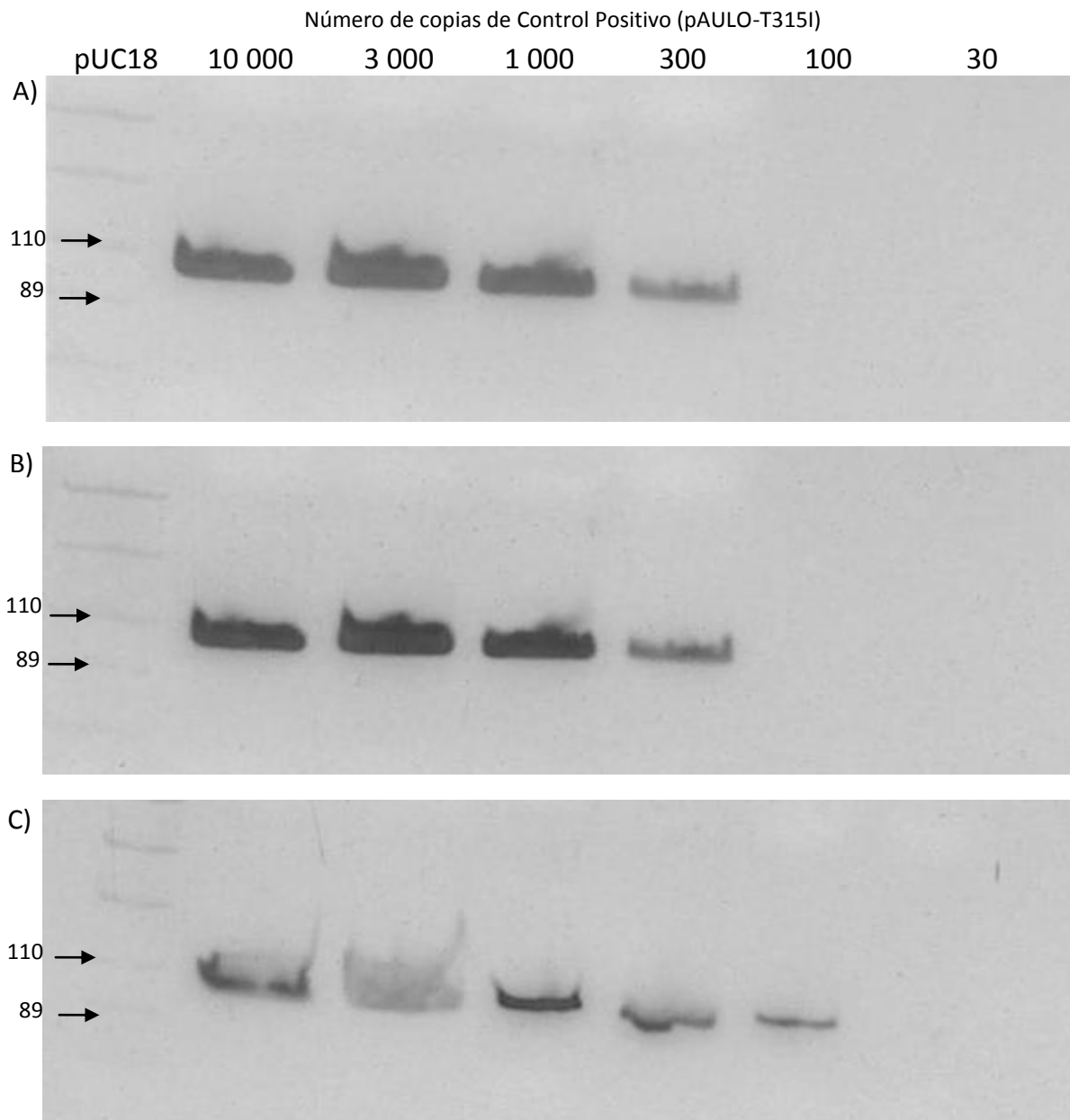


Figura 6.12. Productos de amplificación de las diluciones CP/CN (pAULO-T315I/DNA humano) a diferentes concentraciones de mezcla I de primer. A) Amplificación a una concentración 1x. Las diluciones 1, 2, 3 y 4 son positivas. A esta concentración de primers se pueden detectar hasta 300 copias de control positivo en DNA humano. B) Productos de amplificación con primers al 2x. Los resultados son positivos para las diluciones 1, 2, 3 y 4. A esta concentración de primers se pueden detectar hasta 300 copias al igual que en A). C) Productos de amplificación con mezcla 4x de primers I. Eventualmente resultó positiva la amplificación de la dilución con 100 copias de CP en tres amplificaciones de diez. Geles de poliacrilamida al 4.5 %.

En la figura 1.12-A se observa que las amplificaciones son positivas para las diluciones que contienen 10 000, 3 000, 1 000 y 300 copias de Control Positivo con la mezcla I de primers a concentración de 1x. Esto indica que con una concentración de primers de 0.5 μM (respecto al volumen final de la mezcla de reacción por microtubo) se pueden detectar hasta 300 copias de Control Positivo en DNA humano normal en diez repeticiones.

También se realizaron diez amplificaciones con una mezcla de primers I a una concentración 2x (1.0 μM respecto del volumen final). En la figura 1.12-B se observa que a esta concentración de primers también se pueden detectar hasta 300 copias de control positivo en DNA humano al igual que con 1x de primers en las diez repeticiones.

Finalmente, se hicieron amplificaciones de las diluciones Control Positivo / DNA humano con una concentración 4x de mezcla I de primers (2.0 μM respecto al volumen final de mezcla). Los resultados se muestran en la figura 6.12-C. Como se puede observar, la amplificación resulta positiva en las diluciones 1, 2, 3 y 4 tal como cabría esperar de acuerdo a los resultados obtenidos a concentraciones de 1x y 2x. Sin embargo, eventualmente también resulta positiva la amplificación de la dilución 5 (100 copias). Se realizaron diez repeticiones de las cuales en tres resultaron positivas para de la dilución 5. A esta concentración de primers también puede observarse una mayor presencia de productos inespecíficos.

A partir de los resultados obtenidos, se puede decir que la sensibilidad del método es de 300 copias de Control Positivo (pAULO-T315I) por cada 10 000 copias de control negativo (DNA humano normal). Es decir una sensibilidad analítica de 0.03 a concentraciones de 0.5 - 1.0 μM de primers.