



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

Estandarización de las técnicas de Extracción,
Cuantificación y Electroforesis de ARN para su
incorporación al Manual de Bioquímica Celular y de los
Tejidos I

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A: VALENTINA ZAMORA XOLO



Directora: M. en C. Araceli García del Valle

Asesora: Mtra. Leonor Aguilar Santelises

Ciudad de México, marzo 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se desarrolló en los Laboratorios L-320 y L-402 de Bioquímica Celular y de los tejidos I. Facultad de Estudios Superiores C. II, Batalla 5 de mayo S/N, Iztapalapa, Ejercito de Oriente, 09230 Ciudad de México, con el apoyo de **DGAPA** a través del programa **PAPIME** proyecto **PE211918**.

AGRADECIMIENTOS

Cuando el agradecimiento es infinito...sobran las palabras

M en C. Araceli García del Valle y Mtra. Leonor Aguilar Santelises por su aporte en mi formación académica y personal. Así como su guía en este proyecto.

A la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega, por el apoyo para la realización de este trabajo, así como su aporte para la mejora de este.

M. en C. Margarita Cruz Millán por su aporte en mi vida personal.

A la Q.F.B Rosalba Cervantes Cruz y Dra. Raquel Retana Ugalde por el tiempo invertido en la revisión del presente.

Al Mtro. Leonardo por su apoyo inicial en el proceso.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| MARCO TEÓRICO | 2 |
| Ácidos nucleicos | 2 |
| ARN | 2 |
| Dogma Central de la Biología | 5 |
| Principales tipos de ARN | 5 |
| ARN Mensajero | 5 |
| ARN de Transferencia | 6 |
| ARN Ribosomal | 6 |
| Otros ARNs | 6 |
| Transcripción | 6 |
| Traducción | 8 |
| Aislamiento y Purificación | 8 |
| Métodos de aislamiento | 9 |
| Aislamiento de células mononucleares | 9 |
| Extracción de ARN de la célula | 10 |
| Determinación de la concentración de ARN | 12 |
| Espectro electromagnético, aromaticidad y absorción UV | 12 |
| Ley de Lambert y Beer | 14 |
| Espectro de absorción UV para aminoácidos aromáticos y proteínas | 15 |
| Cuantificación basada en espectrometría UV: | 16 |
| Determinación de la calidad del ARN purificado | 17 |
| Determinación de la integridad del ARN purificado | 18 |
| Electroforesis | 18 |
| Electroforesis zonal | 19 |
| Electroforesis de ácidos nucleicos | 19 |
| Búfer de carga | 19 |
| Búfer de corrimiento | 19 |
| Marcadores de Peso Molecular | 20 |
| Tinción | 21 |

| | |
|---|----|
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 22 |
| OBJETIVO GENERAL | 23 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 23 |
| HIPÓTESIS | 24 |
| METODOLOGÍA | 25 |
| CONTEO CELULAR | 26 |
| EXTRACCIÓN DE ARN | 26 |
| CUANTIFICACIÓN DE ARN | 27 |
| ELECTROFORESIS DE ARN | 27 |
| RESULTADOS | 29 |
| ANÁLISIS DE RESULTADOS | 36 |
| CONCLUSIONES | 41 |
| REFERENCIAS | 42 |
| ANEXOS | 45 |
| Anexo 1: Práctica de Extracción de ARN Humano. | 45 |
| Anexo 2: Práctica de Cuantificación de ARN Humano. | 57 |
| Anexo 3: Práctica electroforesis de ARN..... | 63 |

INTRODUCCIÓN

Los ácidos nucleicos son polímeros formados por la repetición de millones de monómeros denominados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos de ellos, el ADN y el ARN, cada uno con una función particular pero igual de importante. El papel fundamental del ARN en la expresión génica es lo que le convierte en objeto de interés para la comprensión del genoma humano, por lo cual ha sido un tema de estudio a través de los años. Con esa finalidad es que el desarrollo de técnicas para su aislamiento, purificación y extracción también ha cobrado importancia puesto que para que su análisis sea útil, se requiere de muestras íntegras y completas.

En la actualidad existen diversos métodos para su extracción, desde aquellos que precisan días con la cuidadosa preparación de reactivos, después con el uso de kits comerciales y ahora usando tecnología robotizada de punta. No obstante, la estandarización de aquellos en los que se hace uso de sales de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (modificado), con los que se obtiene un buen rendimiento en la cantidad de ARN con reactivos convencionales, son los más empleados.

Según Kondo¹ existen dos tipos de estandarización; la de las cosas y la del trabajo. La utilidad de comprender esto reside en que la realización de la primera impacta en el desarrollo de la segunda. Por ejemplo, si se considera la estandarización de un procedimiento, los instrumentos que facilitan lograr este objetivo deben ajustarse a las necesidades inmediatas del proceso.

En respuesta a lo anteriormente expuesto, se ha propuesto el desarrollo de guías que permitan la ejecución de técnicas de manera reproducible y consistente, en el área de la Biología Molecular. Dado que el Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I, se trata del primer acercamiento del alumno a esta área, se propone como objetivo de este trabajo la incorporación de la técnica estandarizada para la Extracción, Cuantificación y Electroforesis de ARN al manual del laboratorio, con la

finalidad de que los alumnos además de reforzar el fundamento de la misma, aprendan a ejecutar la técnica, considerándose las condiciones del laboratorio, tal como el número de alumnos, equipos, material, reactivos y tiempo de las sesiones de laboratorio

MARCO TEÓRICO

Ácidos nucleicos

Cada ser vivo posee características morfológicas, fisiológicas y conductuales que han sido transmitidas de una generación a otra. La información necesaria para esto, en la célula eucariota, se localiza al interior del núcleo mientras que, en las procariotas, en el nucleoide. Se encuentra de manera codificada, organizada en estructuras, cuya unidad fundamental es el gen. Un gen es una porción de toda la información o instrucciones necesarias, no solo en la transmisión hereditaria sino en el desarrollo y funcionamiento del organismo. Toda esa información se encuentra contenida en una molécula llamada Ácido Desoxirribonucleico (ADN).

Si bien es cierto que el ADN es de suma importancia para la vida no es la única esencial, el ácido ribonucleico (ARN) es quien posibilita que la información codificada sea comprendida por las células.

Ambas se encuentran conformadas por monómeros llamados nucleótidos, compuestos de tres partes: una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos, y al menos un grupo fosfato. Sin embargo, poseen características estructurales que son la causa de la diferencia funcional entre ellas y que se encuentran enunciadas en el cuadro 1.

ARN

El ácido ribonucleico es un polímero lineal de cuatro tipos diferentes de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster (Figura 2). Además de su participación en la síntesis de proteínas, entre sus funciones se encuentra la regulación de la expresión génica,

la diferenciación celular y la catálisis (las moléculas de ARN catalítico se conocen como ribozimas).^{2,3}

Cuadro 1. Comparación de características estructurales y funcionales de ácidos

| Características | ARN | ADN |
|---------------------------------|--|--|
| Configuración espacial | Generalmente de cadena lineal con ocasionales estructuras tridimensionales | Doble (excepto en algunos virus), helicoidal |
| Bases | Adenina-Uracilo Guanina-Citosina | Adenina-Timina Guanina-Citosina |
| Pentosa | Ribosa | Desoxirribosa |
| Transcripción de la información | Porciones | Completa |

Químicamente se diferencia del ADN porque contiene un azúcar ribosa con dos grupos hidroxilos en posición 2' y 3', cuyo grupo libre en la posición 2 es lo que le confiere la cualidad de ser más reactivo. Asimismo, la base complementaria de la Adenina, el Uracilo en el ARN mientras que en el ADN es Timina.⁴

Las bases púricas y pirimídicas, presentes en su estructura, son hidrofóbicas y relativamente insolubles en agua a pH cercano a 7. Es la razón de que existan interacciones de "apilamiento" que no es más que los planos de los anillos de dos o más bases, situados de forma paralela debido a la combinación de interacciones de tipo Van der Waals y Dipolo-dipolo entre las bases. El apilamiento ayuda a mantener el mínimo contacto con el agua y es importante en la estabilización de la estructura tridimensional del ARN.^{4,5}

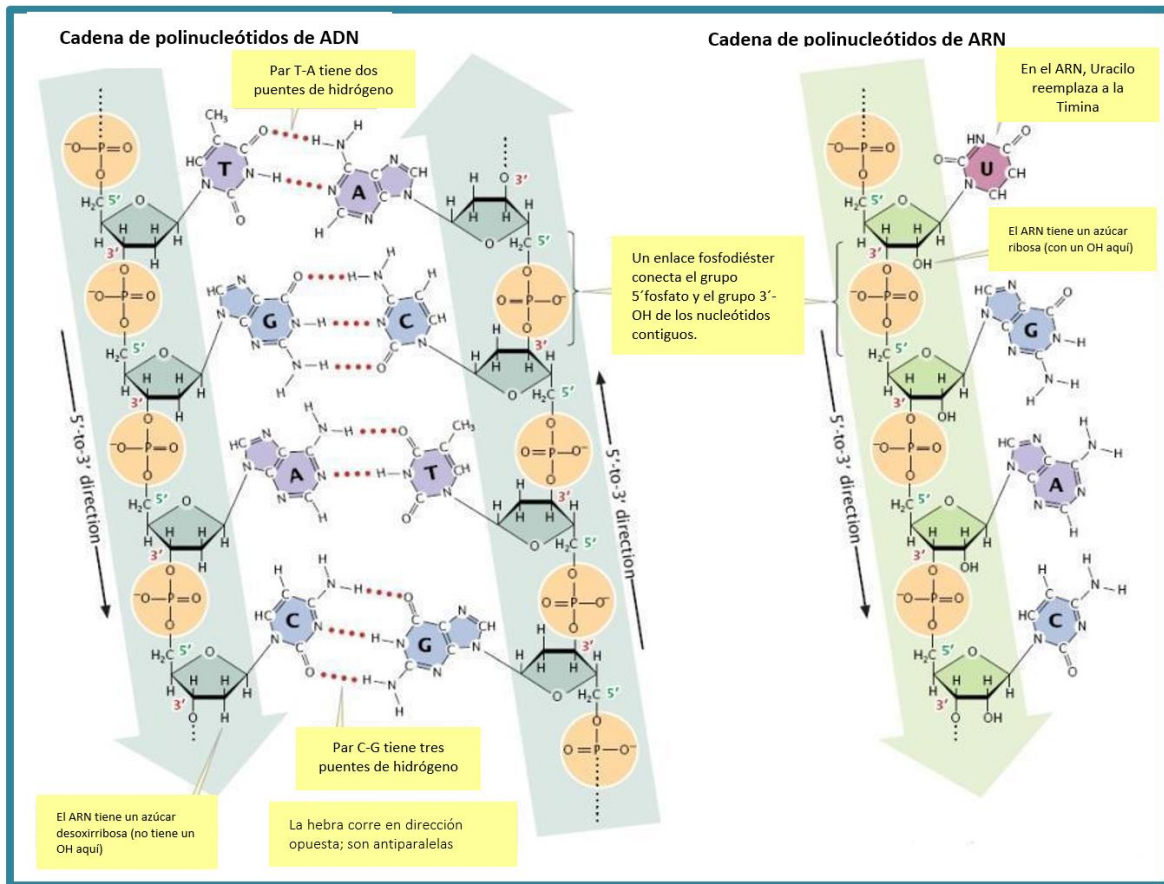


Figura 1. Comparación estructural de las moléculas de ADN y ARN. ⁴²

Es importante señalar que algunas de las funciones, de ciertos tipos de ARN, se encuentran asociadas a las estructuras tridimensionales que el ARN es capaz de adoptar como el caso del ARN de transferencia.^{2,6}

Asimismo, debe destacarse que el ARN es químicamente lábil y susceptible a la degradación mediada por endo y exonucleasas. La ribosa del ARN, como se ha mencionado, posee un grupo hidroxilo (OH) libre en la posición 2'. Este grupo es el responsable de que el ARN sea fácilmente hidrolizado en una solución acuosa alcalina.⁴

Dogma Central de la Biología

La expresión génica es el proceso mediante el cual la información contenida en el Ácido desoxirribonucleico modifica la actividad celular. Dicho proceso es explicado como un flujo de información genética de ADN a ARN y de este a las proteínas.^{8,9}

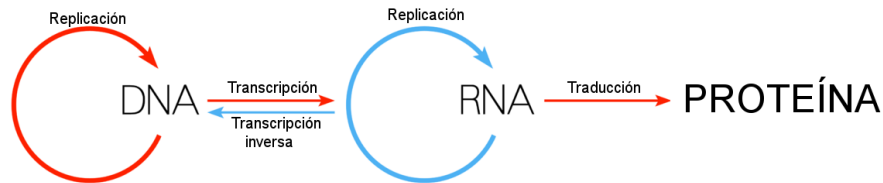


Figura 2. Dogma Central de la Biología Molecular. Se muestra el diseño de Crick de acuerdo a una nota inédita de 1956.²³

Determinada la relación existente entre la porción de información genética y sus productos funcionales, las proteínas; se puede comprender la importancia de la intervención del ARN en dicho proceso, pues se trata de un precursor en la síntesis de las cadenas polipeptídicas.^{9,10}

De manera general se aplica este principio en todos los seres vivos. No obstante; existen variaciones en el proceso entre organismos eucariotas y procariontas. una de ellas es que la transcripción en eucariotas se realiza en el núcleo y la traducción en el citoplasma mientras que todo el proceso, en procariontas, se realiza en el citoplasma. Por lo cual la distancia entre ADN y ribosoma es menor y los procesos son realizados casi simultáneamente, por lo que en este tipo de organismos la fase maduración del ARN [la remoción de intrones, así como la adición del casquete o caperuza y de la cadena de Poli(A)] no se realice en células bacterianas.^{11,12}

Principales tipos de ARN

ARN Mensajero

El ARN mensajero (ARN_m) es una molécula corta y lineal de estructura primaria. Se encuentra en una proporción de 2 al 5 % en la célula. Se origina, en el núcleo, a partir de una hebra de ADN que sirve como molde. Dicho ARN_m debe llevar a cabo un proceso de maduración antes de su salida hacia los ribosomas. Una vez en el

citoplasma, el ARN_m puede servir como guía para controlar la incorporación de aminoácidos en el orden específico codificado por la secuencia de nucleótidos del ADN y el ARN_m.⁹

ARN de Transferencia

Son ARNs adaptadores que seleccionan los aminoácidos requeridos y los retienen en el lugar adecuado del ribosoma para que se puedan incorporar a las proteínas.³ Son moléculas pequeñas que constan de una estructura tridimensional en forma de trébol, por lo que frecuentemente se les denomina así. La longitud promedio de una molécula de ARN de transferencia (ARN_t) es de 75 nucleótidos. Debido a que cada una de estas moléculas se une a un aminoácido específico, las células poseen al menos una clase de ARN_t para cada uno de los 20 aminoácidos estándar.^{2,13,14}

ARN Ribosomal

Los ARN ribosomales (ARN_r) reconocen y unen otras moléculas, proveen apoyo estructural y catalizan las reacciones químicas por medio de las cuales los aminoácidos se unen de manera covalente. El ARN_r es el tipo de ARN más abundante en células, representa cerca del 80% del ARN de una célula que se esté dividiendo rápidamente.^{6,9,12}

Otros ARNs

Los ARN nucleares pequeños (small nuclear, en inglés) y micro-ARN (snARN y miARN), participan en la edición del ARN_m y la modulación de la expresión de gen al alterar la función del ARN_m.^{9,15}

Transcripción

En la expresión génica se tiene a la transcripción como el primer paso para la transferencia de la información contenida en la secuencia del ADN hacia la secuencia de proteína, utilizando diversos ARN como intermediarios.

La transcripción es un proceso en el que se forma una cadena de ARN, conocido como mensajero (ARN_m) cuando ha madurado, usando como molde una hebra de

ADN. Este proceso, al igual que la replicación y la traducción tiene tres etapas: Iniciación, elongación y terminación.

En la iniciación, la ARN polimerasa se une a una secuencia de ADN llamada promotor que se encuentra al inicio de un gen ARN y separa las cadenas de ADN para proporcionar el molde de cadena sencilla necesario para la transcripción. Una vez colocada la ARN polimerasa en su posición sobre el promotor, puede comenzar el siguiente paso de la transcripción: la elongación, esto es que la hebra de ARN se alarga al agregar nuevos nucleótidos en la dirección 3' a 5'. Finalmente se tiene la terminación; un proceso poco preciso en los eucariotas ya que no hay señales de terminación exactas, la secuencia de ADN de un gen se transcribe (copia) para hacer una molécula de ARN como ocurre en procariotas. Se sugieren dos formas de terminación, una de ellas es que se encuentra señalizada por la información contenida en sitios de la secuencia del ADN que se está transcribiendo y la otra para las que carecen de secuencia de terminación es una secuencia a la que se unen una serie de proteínas reguladoras específicas de la terminación, como rho (hexámeros proteicos de la familia de las helicasas).

Posteriormente, este ARN (ARN_m) debe pasar por un proceso de maduración antes de su salida del núcleo. Para ello primero debe ocurrir el splicing o corte y empalme que es la remoción de aquellos fragmentos de información genética que no serán utilizados en la codificación de la proteína de interés, los llamados intrones. El siguiente paso en el proceso de maduración es la adición de varias adeninas en el extremo 3' conocido como cadena poli (A) cuya función es estabilizadora. De la misma forma se da la unión del CAP o caperuza en el extremo 5' del ARN_m, con lo cual se dará el inicio de la señalización para la síntesis de proteínas una vez que el ARN_m haya salido a través de los poros nucleares hacia el ribosoma. Cabe señalar que ambas modificaciones de maduración del ARN_m protegen la información contenida frente a las ARNasas que se encuentran en el citoplasma. ^{5,6,14,16,17}

Traducción

La traducción inicia al interaccionar varias proteínas con el CAP o caperuza ligada al extremo 5' de las moléculas de ARN_m. Es en el sitio A del ribosoma donde el ARN_m actúa como el molde para controlar la incorporación de aminoácidos en el orden específico codificado por la secuencia de nucleótidos del ADN.⁶

En el sitio P de los ribosomas los propios ARN ribosomales se encargan del ensamble de los aminoácidos, siguiendo el orden codificado por el ADN, en proteínas específicas.^{10,14,16,17}

Aislamiento y Purificación

El estudio de la expresión génica requiere el aislamiento de ARN total o alguno de sus tipos por lo cual la obtención de muestras en cantidad y calidad necesaria es requerida ¹⁸. Por ello que deben atenderse ciertas consideraciones cuando se elige un método. Entre ellas podemos mencionar:

1. Origen de la muestra: Bacterias o muestras de tejido humano, de esta última se considera la muestra biológica a emplear en este trabajo.¹⁹
2. Método de preparación: pueden ser precipitados frescos o previamente congelados, secciones de tejidos embebidos en parafina o fijados con formalina, secciones de tejido congelado, células fijadas en etanol y muestras preservadas.
3. Uso previsto: secuenciación, determinación de huella genética, PCR, qPCR, Southernblot, RAPD, AFLP y RFLP, digestiones con enzimas de restricción, preparación de librerías para secuenciación por "shotgun".
4. Cantidad de muestra
5. Rendimiento.
6. Automatización.
7. Simplicidad: la operación del kit depende de la experiencia del personal.

Métodos de aislamiento

Aislamiento de células mononucleares

En la actualidad se encuentran numerosas metodologías y sus modificaciones basadas en dos aspectos principales, el grado de alteración celular y la inhibición de las RNAsas. Es importante mencionar que cada técnica tiene sus limitaciones propias y que debe tenerse claro que no existen diversas formas correctas de extraer ARNs de diferentes tipos celulares y tejidos y que existe solo una forma incorrecta de hacerlo que es permitir la acción de RNAsas.^{20, 21}

El tratamiento previo que se haga a la muestra es muy importante para su aislamiento en cantidad y calidad suficientes; por esta razón la elección de la técnica y reactivos dependen de sus atributos o de sus características.

En el caso de la sangre, se trata de un tipo de tejido conectivo compuesto de células, fragmentos celulares y una matriz extracelular líquida denominada plasma sanguíneo. Las células sanguíneas se clasifican en dos tipos: eritrocitos o glóbulos rojos y leucocitos o glóbulos blancos. Los fragmentos celulares son denominados plaquetas cuya función principal es la coagulación sanguínea. Los glóbulos rojos son los responsables del transporte de oxígeno en el organismo mientras que los leucocitos constituyen el principal agente del sistema inmunológico de nuestro cuerpo. Estas células se dividen a su vez en granulares: neutrófilos, basófilos y eosinófilos, y en agranulares: linfocitos y monocitos. Cada uno con una función conocida. Estas células poseen núcleo, mitocondrias y otros orgánulos celulares.

Como es sabido, en la célula, la función del núcleo es mantener la integridad de los genes y controlar las actividades celulares regulando la expresión génica. Por ello se dice que el núcleo es el centro de control de la célula. La obtención del ARN resulta más simple cuantos menos pasos se realicen para su aislamiento, por lo que la sangre resulta el tejido más adecuado para ello.

Al centrifugar una muestra de sangre, los elementos formes más pesados se aglomeran en el fondo del tubo, y el plasma queda en la parte superior. Los leucocitos y las plaquetas sólo forman una capa de color claro en la interfaz entre

los eritrocitos y el plasma. No obstante, esta disposición de las partículas puede ser fácilmente alterada debido a la naturaleza las mismas y el medio en que se encuentran; por tal razón, se justifica el uso de gradientes de densidad que son sustancias que permiten que las partículas que han migrado a través de una solución, por acción de la gravedad o fuerza centrífuga, mantengan su disposición espacial unas respecto a otras, visto que permiten asegurar que no haya convección en el interior del gradiente debido a una disminución de la densidad del medio por causa de un aumento en la temperatura. Otra función importante del gradiente es impedir las mezclas debidas a perturbaciones mecánicas. Finalmente, se tiene que estos evitan el flujo convectivo entre zonas como resultado de sus diferentes densidades, efecto muy pequeño, pero que es muy importante cuando se utilizan concentraciones elevadas.

Extracción de ARN de la célula

Es importante señalar que en la extracción de ácidos nucleicos hay pasos fundamentales, como lo son:

1) Lisis celular a través de la ruptura de las membranas celulares o la pared, mediante métodos que pueden ser:

Físicos: Sonicación, hervido, congelación-descongelación y choque osmótico.

Químicos: mediada por tampones que típicamente caen en una de dos categorías:

- Agentes que solubilizan suavemente la membrana plasmática mientras se mantienen la integridad nuclear y de otros orgánulos, tales como los tampones de lisis hipotónicos no iónicos; los orgánulos y los restos celulares se eliminan del lisado por centrifugación diferencial.²⁰
- Agentes caotrópicos duros tales como una de las sales de guanidinio, dodecil sulfato de sodio (SDS), N-laurilsarcosina (sarcosilo), urea, fenol o cloroformo, que desestabilizan la membrana plasmática y los orgánulos subcelulares a la vez que inactivan la ARNasas

Enzimáticos: Lisozima, la proteinasa K.

2) Desnaturalización de proteínas y Separación: Permite la eliminación progresiva de proteínas y otros contaminantes celulares y la obtención de un material genético cada vez más limpio. Dentro de las metodologías utilizadas las más comunes son la extracción con mezclas de fenol-cloroformo y la separación cromatográfica. En el caso del fenol-cloroformo, el primero se utiliza para la desnaturalización y solubilización de las proteínas y componentes celulares y el cloroformo permite la separación de las fases durante la centrifugación, además de también ser desnaturalizante.

3) Precipitación: Permite la obtención del ácido nucleico listo para ser almacenado o diluido a la concentración deseada para su utilización.²²

El ARN se recupera por precipitación con alcoholes y posterior centrifugación.

Chomczynski y Sacchi describieron un método de aislamiento de ARN total mediante una sola extracción. De manera que propusieron la lisis celular con una mezcla ácida de isotiocianato de guanidinio-fenol, con la desnaturalización proteica por la adición de cloroformo y precipitación del ARN total con alcohol isopropílico.

Determinación de la concentración de ARN

Métodos de cuantificación

Los métodos ópticos espectroscópicos, específicamente los de absorción como el UV-visible son los más usados en la cuantificación de biomoléculas debido a su utilidad, simplicidad y accesibilidad.

Por su parte, los de emisión, como la fluorescencia pese a ser más sensibles que los hace ideales para muestras valiosas y rapidez, son muy costosos, razón por la cual se limita su accesibilidad.

Espectro electromagnético, aromaticidad y absorción UV

La naturaleza dual de la luz es un fenómeno según el cual las partículas pueden comportarse como ondas y viceversa. La dilucidación del comportamiento de ésta se debe al trabajo de la comunidad científica a lo largo de los años. Es debido a estos aportes que puede comprenderse cómo las cargas eléctricas sometidas a aceleración producen campos eléctricos y magnéticos, siendo capaces de transportar energía en el espacio sin necesidad de un medio, pudiendo, por tanto, propagarse en el vacío. La propagación de dichos campos electromagnéticos, conocida como radiación electromagnética, se realiza como una oscilación perpendicular por lo tanto en ondas electromagnéticas transversales.

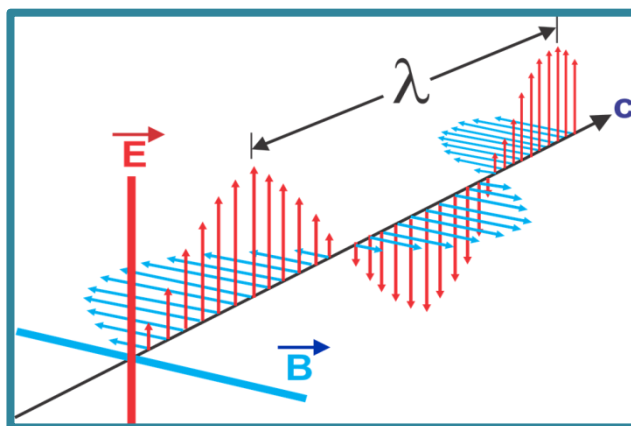


Figura 3. Dirección de la propagación de las ondas de los campos eléctricos y magnéticos.

La luz visible es tan sólo una parte de lo que se conoce como espectro electromagnético, que es el conjunto de todas las longitudes de onda de todas las radiaciones electromagnéticas y cuya clasificación obedece a un parámetro físico denominado longitud de onda.

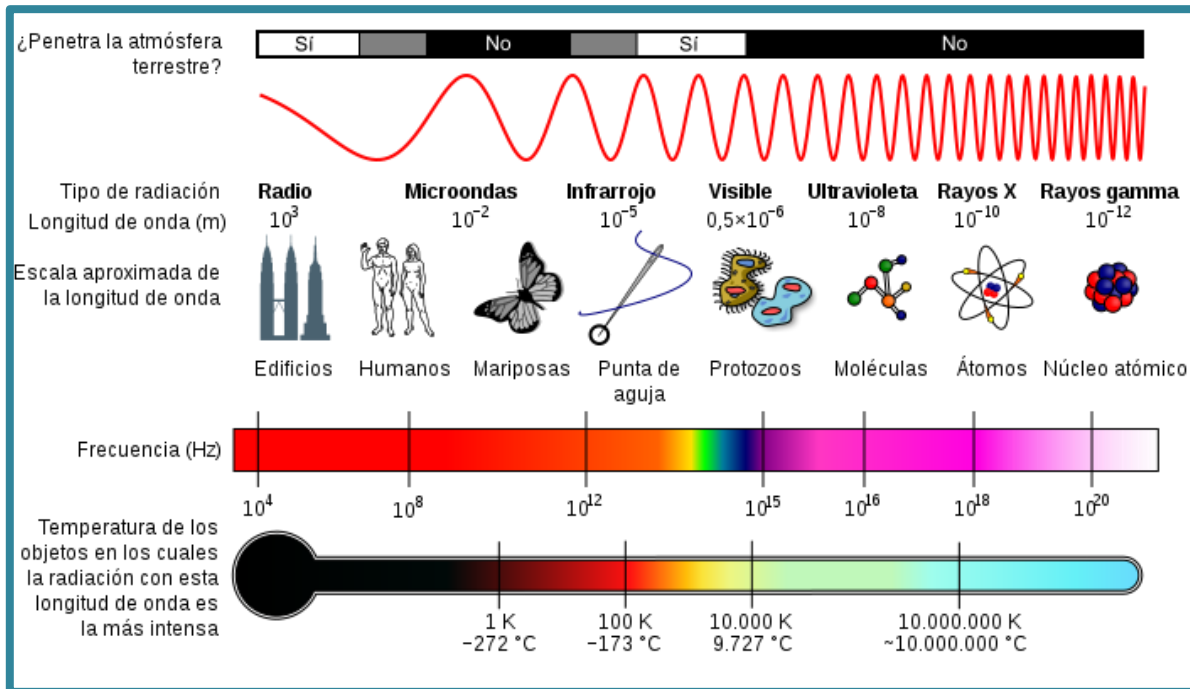


Figura 4. Diagrama del espectro electromagnético.

La radiación electromagnética interactúa con la materia, el resultado de ello puede ser la desviación de las ondas electromagnéticas o su absorción parcial, transformándose en energía térmica o bien siendo reemitida con o sin cambio de longitud de onda.

En esta interacción las moléculas y átomos absorben un fotón (partícula portadora de todas las formas de radiación electromagnética) por tal razón su energía interna aumenta, es decir pasa de un *estado basal* o *fundamental* a un estado de *excitación (inestable)*. La radiación absorbida produce cambios en los enlaces intramoleculares y/o movimiento de los electrones alrededor del átomo. Esto es conocido como *transiciones* y pueden ser de tres tipos: *rotacionales*, *vibracionales*, *electrónicas*, así como una combinación de ellas, tal es el caso de la región UV y visible para los cuales la energía absorbida es mucho mayor y por ende se pueden

tener las tres. Debido a la inestabilidad del estado excitado la molécula tiende a regresar a su estado inicial por lo cual libera la energía excedente en forma de calor o de radiación electromagnética nuevamente (emisión).

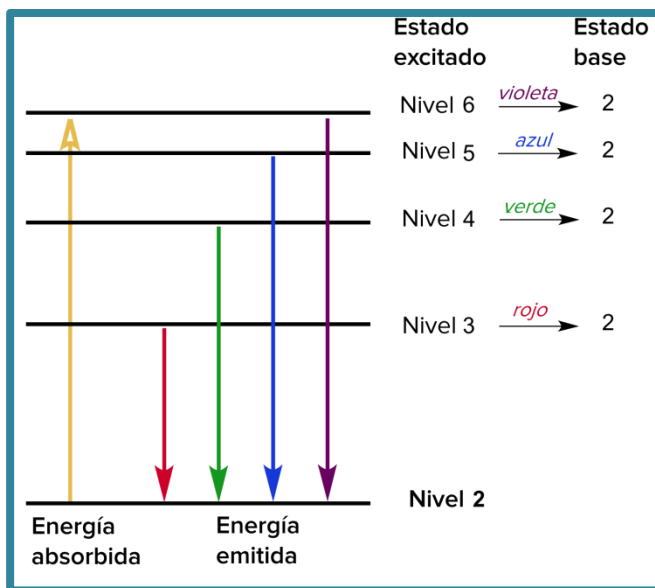


Figura 5. Diagrama que representa, de manera general, transición electrónica.

Moléculas orgánicas con electrones deslocalizados en sistemas aromáticos suelen absorber a 150-400 nm (ultravioleta) o en la región visible de 400-800 nm.

Las pirimidinas y purinas libres, presentes en el ARN, son moléculas aromáticas, una propiedad que influye en su estructura, distribución electrónica y capacidad para absorber la luz. La deslocalización de electrones en el anillo genera enlaces dobles parciales que conforman una ligera deformación en las bases. Estos electrones deslocalizados se pueden excitar al recibir energía en forma de luz ultravioleta. Por esta razón se dice que a 260 nanómetros las bases absorben luz UV. Lo que permite calcular la concentración a partir del coeficiente de extinción molar y la ecuación de Lambert-Beer.

Ley de Lambert y Beer

La cantidad de radiación electromagnética absorbida por una sustancia puede ser relacionada cuantitativamente con la concentración de dichas sustancias en

solución, motivo por el cual la absorbancia de un soluto depende linealmente de la concentración, si se considera que la l y ϵ (característico de cada sustancia) son constantes.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Donde:

A = absorbancia

ϵ = Coeficiente de extinción molar ($L \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

l = longitud de la celda (cm)

Sin embargo, dicha ley puede sufrir desviaciones de naturaleza química, entre ellas podemos destacar la variación de la absorptividad debida a un cambio en el índice de refracción de la solución, lo que suele suceder a concentraciones muy elevadas.

Espectro de absorción UV para aminoácidos aromáticos y proteínas

Como se ha mencionado, la sangre está compuesta por diversas sustancias entre las que destacan las proteínas, que constituyen el 7-9% del plasma. Las proteínas, dependiendo de su composición de aminoácidos, tienen un espectro de absorción amplio, grupo de péptidos de la cadena principal de una proteína absorbe la luz en un rango de 180 a 230 nm. Las cadenas que tienen residuos aromáticos solo absorben la luz en un rango de 240 a 300 nm, con picos en la región de 260 a 280 nm. Este pico se presenta debido a múltiples contribuyentes de residuos de fenilalanina, tirosina y triptófano y un poco por la cisteína (puentes disulfuro).

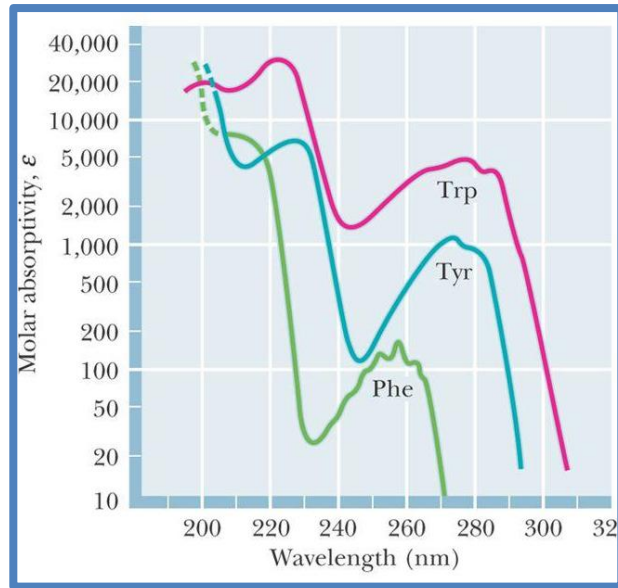


Figura 6. Espectro de absorción UV de aminoácidos aromáticos a pH 6.²⁵

Cuantificación basada en espectrometría UV:

El anillo de las bases (Adenina, Citosina, Guanina, Uracilo) presenta enlaces simples y dobles enlaces alternados, es por ello que absorben en la región UV.

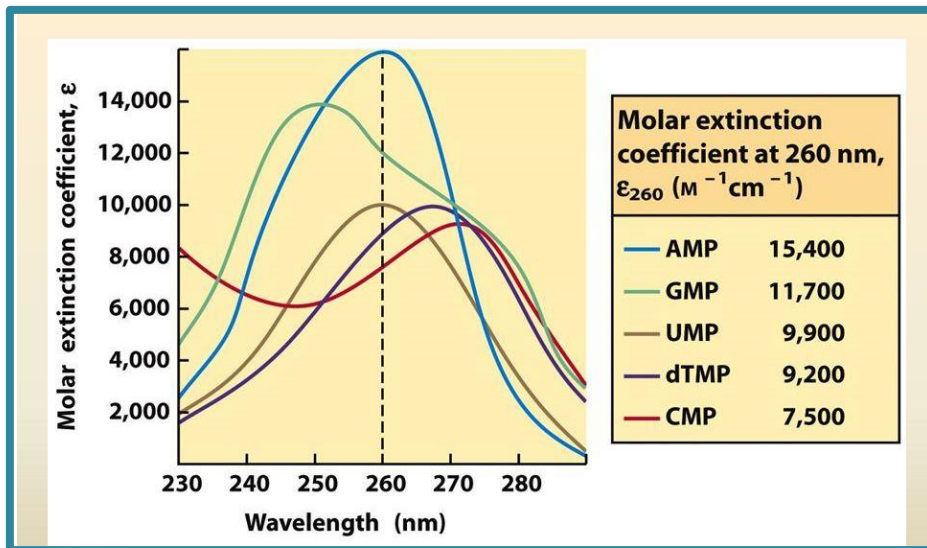


Figura 7. Espectro de absorción de las bases nitrogenadas que conforman a los ácidos nucleicos.⁵

La concentración de las muestras de ARN se determina empleando luz ultravioleta, con un máximo de absorbancia a 260 nm. Las mediciones de absorbancia a esta longitud de onda permiten el cálculo directo de la concentración de ácido nucleico en una muestra.

Sambrook y Russell han descrito un método para la concentración de ácidos nucleicos para lo cual en un espectrofotómetro UV se realiza la medición de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) utilizando la fórmula siguiente:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g} / \text{mL} = A_{260} \times \text{dilución} \times 40$$

A_{260} : Absorbancia a 260 nm

Dilución: Factor de dilución

40: Coeficiente de extinción promedio de ARN (40 μg / OD 260).

Determinación de la calidad del ARN purificado

Los cálculos basados en la absorbancia a 260 nm proporcionan poca información sobre la calidad y pureza de la muestra; en presencia de exceso de sal, proteínas contaminantes y / o solventes orgánicos remanentes, el valor de absorbancia puede ser sesgado significativamente. Por este motivo existe una serie de relaciones de absorbancia que proporcionan una estimación razonable de la pureza de la preparación:

| | | |
|---------------------|---------|---|
| A_{260} / A_{280} | 2.0 | Debajo de 1.8 sugiere contaminación proteica. |
| A_{260} / A_{230} | 2.0-2.4 | Debajo de 1.8 sugiere contaminación orgánica. |
| A_{260} / A_{240} | 1.4 | Debajo de 1.4 sugiere una cantidad excesiva de sal. |

El pH del diluyente influye en la relación de absorbancia por lo cual es más confiable realizar las mediciones en un rango de pH de 7.5 a 8.5.²⁰

Determinación de la integridad del ARN purificado

Como ya se mencionó, los estudios de expresión génica requieren de muestras de ARN íntegro, por lo que deben verificarse antes de usarse en aplicaciones prácticas, debido a que como ya se mencionó el ARN es muy susceptible a las RNAsas presentes en la muestra o en el entorno.

Los métodos electroforéticos además de servir como método de separación de mezclas complejas (proteínas, péptidos, azúcares, ácidos nucleicos, y los iones inorgánicos) aportan un criterio de integridad de las biomoléculas.

Electroforesis

La electroforesis es una metodología que permite la separación de moléculas y partículas, en solución, debido a la influencia de un campo eléctrico.

La velocidad de migración o movilidad a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son; el potencial eléctrico, la carga neta y el coeficiente de fricción que a su vez está sujeto al tamaño y la forma de la molécula; asimismo debe considerarse a la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo. Generalmente se utilizan tres principios básicos para su clasificación: electroforesis zonal, isotacoforesis y enfoque isoeléctrico. De la misma manera, se toma en cuenta el medio en el que se lleva a cabo la separación electroforética, en solución libre (como en los sistemas de flujo libre y capilar) o en matrices de soporte (geles a base de polímeros).

La electroforesis en gel es una técnica frecuentemente utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los soportes usuales en la separación de ácidos nucleicos son polímeros, como la poliacrilamida o agarosa.

Electroforesis zonal

Esta técnica implica la migración de moléculas a través de un soporte inerte y homogéneo como el papel o geles. Este soporte disminuye la influencia de factores como perturbaciones mecánicas o las corrientes de convección ocasionadas por cambios de temperatura. La elección de estos dependerá de lo que se busque, por ejemplo, la separación de los componentes de una mezcla, la determinación de la pureza e integridad, o el cambio de conformación de alguno de ellos.

Electroforesis de ácidos nucleicos

El soporte ideal debe ser químicamente inerte, sin grupos ionizables, consistente, homogéneo, estable y barato. La selección del soporte obedece, en primera instancia, al tamaño de las moléculas, el ARN es una molécula voluminosa, por lo que se usa agarosa que proporciona un tamaño de poro suficiente para permitir su separación.

La agarosa es un polímero que forma una red tridimensional que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del solvente. La separación del ARN se basa en el aprovechamiento de la carga negativa del esqueleto de fosfato de la biomolécula. De acuerdo con la concentración del gel, el rango de separación lineal variará. Se recomienda entre 1 y 1.2% para maximizar el poder de resolución del gel, así como su manejo porque su consistencia no es frágil.

Búfer de carga

Facilita la visualización y sedimentación del ARN en los pozos para lo cual emplean distintos tipos de colorantes, cada uno de ellos exhibe un patrón de migración diferente.

Búfer de corrimiento

También conocido como tampón, esta sustancia es esencial para el mantenimiento del pH en el sistema y por lo tanto de la muestra.

La fuerza iónica de los búferes es importante porque cuando es baja, permite velocidades de migración más rápidas y con menor desprendimiento de calor. Generalmente, se emplean tampones con fuerzas iónicas moderadas (0.05-0.10M).

Entre los amortiguadores más empleados se encuentran: Tris-acetato-EDTA (TAE), Tris-borato-EDTA (TBE) y Tris-fosfato-EDTA (TPE).

Marcadores de Peso Molecular

La determinación del tamaño de los tipos de ARN se realiza comparando una muestra de ARN con los estándares de peso molecular. Existen estándares externos, disponibles comercialmente, los cuales deben ser desnaturalizados mediante el mismo método que las muestras y los internos que forman parte de la muestra experimental y suelen ser ARN grandes tales como los ribosómicos. Dado que estos marcadores forman parte de la muestra, se desnaturalizarán durante la preparación de la muestra para electroforesis.

Respecto a los estándares externos, se tiene que el ADN y el ARN no son electroforéticamente equivalentes a menos que ambos hayan sido glioxalados (Desnaturalizante que impide que la cadena se aparee consigo misma y la muestra migre en el gel a una altura que no corresponde con su tamaño). Al ser diferentes, el ADN es útil como estándares solo si está dentro del rango de la mayoría de los ARN celulares (en humanos, los tamaños de los ARNr 28S y 18S son 5025 y 1868 bases, respectivamente).

Como ya se ha dicho el ARNr es el producto más abundante (80 - 85% del ARN total) por consiguiente es también usado como estándar en vista de que en la separación electroforética pueden visualizarse dos bandas muy diferentes y fácilmente observables, los ARNr 28S y 18S.

Los ARNr altamente abundantes pueden ser muy útiles como controles internos a porque pueden indicar la integridad de la muestra mediante inspección visual y proporcionar evidencia de que se ha cargado una masa equivalente de ARN total en cada pozo.²²

Tinción

Bromuro de etidio

Se trata de una sustancia para teñir, ampliamente utilizada por sus ventajas en la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Es un intercalador de fenantridina, estructuralmente similar al yoduro de propidio. Suele intercalarse entre los ácidos nucleicos sin una preferencia de secuencia aparente, una vez cada 4 - 5 pares de bases, precisamente por esta característica tiene un efecto mutagénico, ya que al ser un agente intercalante se inserta entre las bases de una molécula de ADN, interrumpiendo la alineación y el emparejamiento de bases de las cadenas complementarias, lo que puede inducir a una errónea replicación del ADN. También es irritante de mucosas, por estas razones debe tenerse cuidado con su manipulación, es decir en la protección de quien lo use, así como de su desecho.

El bromuro de etidio se puede agregar al gel fundido (inferior a los 60 °C), para teñir el gel al concluir la electroforesis o directamente a la muestra de ARN antes de cargar los pozos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la formación de los químicos farmacéuticos biólogos, la bioquímica celular es el primer acercamiento a la Biología molecular, disciplina que les permite comprender de qué manera la expresión génica rige las funciones celulares y tisulares en el cuerpo humano. Entender la compleja relación de ácidos nucleicos y sus productos funcionales permite conocer o contribuir a determinar la causa de la alteración de varios procesos biológicos. Debido a esto, el estudio de la molécula del ARN representa un primer paso en el desarrollo de conocimiento y avances científicos que mejoran la calidad de vida del ser humano.

Por lo anterior es de suma importancia que los contenidos procedimentales de extracción, cuantificación y electroforesis de ARN se incluyan desde los primeros niveles en la formación científica de los estudiantes de la carrera Química Farmacéutico Biológica.

Igualmente resulta significativo que el alumno aprenda y ponga en práctica las técnicas de Biología molecular de vanguardia, de tal forma que se le proporcionen fundamentos y bases que le den habilidades para sus materias siguientes en el plan de estudio y en el área terminal que seleccione. De esta manera, los alumnos obtendrán los conocimientos y habilidades técnicas para aplicarlos en las distintas áreas de su vida profesional y de investigación.

OBJETIVO GENERAL

Incorporar las técnicas de extracción, cuantificación y electroforesis de ARN humano en la actualización del manual de Bioquímica Celular y de los Tejidos I.

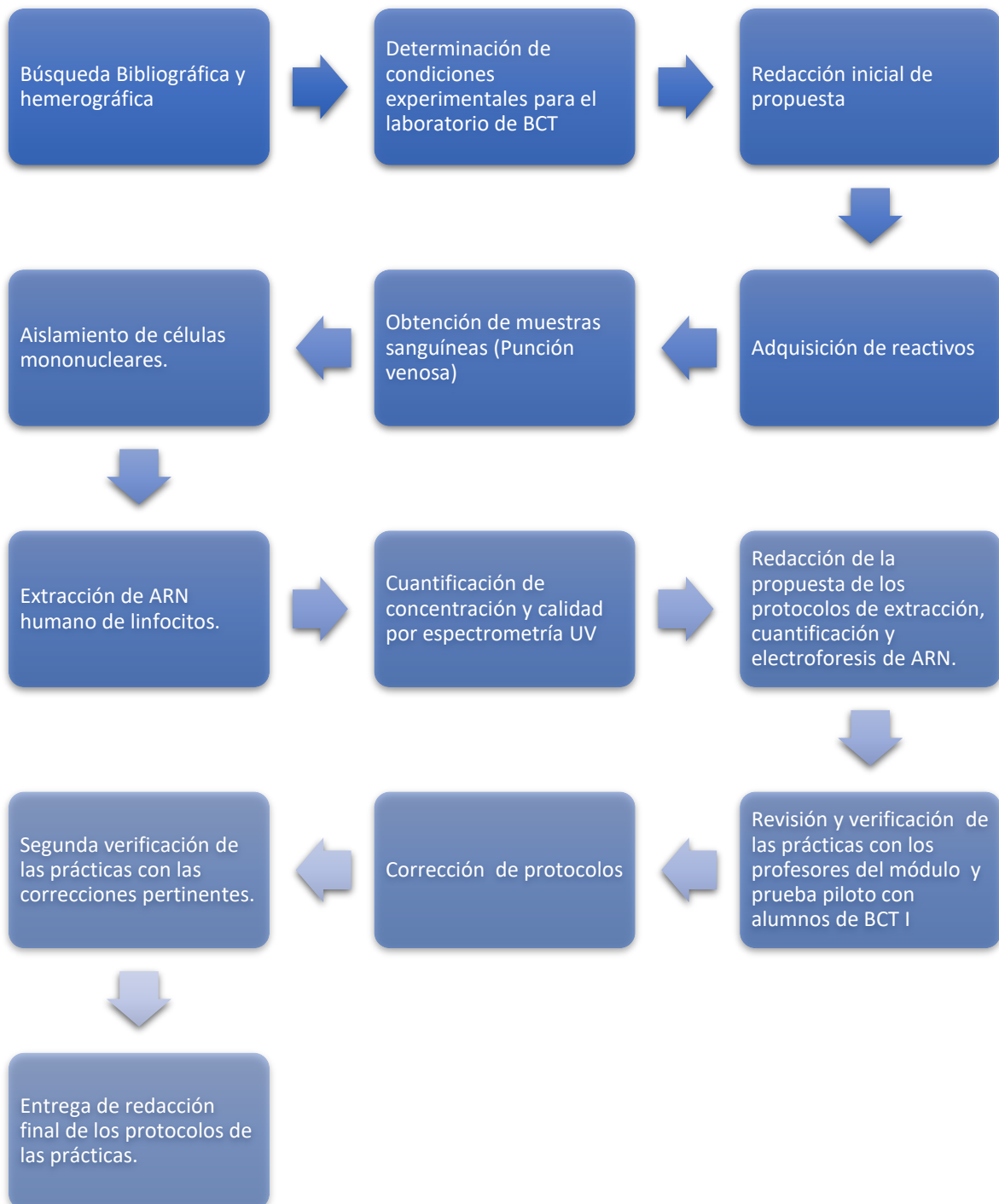
OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar células mononucleares de sangre humana.
- Obtener muestras de ARN a partir de linfocitos humanos utilizando el reactivo comercial TRIzol® y TriReagent®.
- Cuantificar la concentración y la calidad del ARN recolectado en el laboratorio de BCT I por el método espectrofotométrico usando el equipo Eppendorf Biophotometer Plus ®.
- Determinar las condiciones experimentales para la electroforesis de ARN humano.
- Redactar la propuesta de los protocolos de extracción, cuantificación y electroforesis de ARN humano considerando las condiciones e infraestructura del laboratorio de BCT I.
- Probar las técnicas estandarizadas de Extracción, Cuantificación y Electroforesis de ARN con alumnos y profesores del laboratorio de BCT I.
- Elaborar los protocolos para la práctica de Extracción, cuantificación y electroforesis de ARN humano.

HIPÓTESIS

Se estandarizarán las técnicas de Extracción, Cuantificación y Electroforesis de ARN a partir de sangre humana atendiendo al número de alumnos, equipos, material y tiempo de sesiones del módulo del Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I para su posterior incorporación al manual del mismo, con el objetivo de que los alumnos de dicho módulo refuercen el fundamento del tema mediante la ejecución de forma simple y reproducible de estas técnicas puesto que representa el primer acercamiento de ellos al área de la Biología Molecular.

METODOLOGÍA



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE VENOSA HUMANA

1. Se realizó la extracción sanguínea por punción venosa en un tubo con anticoagulante EDTA.
2. En un tubo cónico de 15 mL se adicionó 1 mL de una sustancia formadora de gradiente de densidad llamada Ficoll-Paque PLUS®, por cada mL de sangre, esto se realizó lentamente y por las paredes del tubo.
3. Se procedió a probar la centrifugación a 2500 y 3000 rpm en centrífuga con dos tipos de rotor: basculante y de ángulo fijo, durante 30 minutos; con la finalidad de obtener 4 bandas: una capa acuosa amarillo claro en la parte superior, una delgada capa blanca lechosa debajo de la capa acuosa, una capa acuosa transparente y finalmente una capa rojo oscuro.
4. Se tomó el mayor volumen posible de la capa blanca lechoso a un tubo cónico de 1.5 mL., teniendo cuidado de no transferir alguna de las otras fases (Ficoll o plasma).
5. Se adicionó la cantidad necesaria de buffer fosfato salino (PBS) para completar 1 mL.

CONTEO CELULAR

- Se procedió a la cuenta de células en un volumen de 20 μ L de la muestra del paso 5, en un hemocitómetro.

EXTRACCIÓN DE ARN

Se probaron los reactivos Tri Reagent y TrIZol

1. A las muestras obtenidas con aproximadamente 4.5 millones de células se adicionó 1 mL de reactivo Tri Reagent o TrIZol, se pipeteó el lisado hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogeneizar bien.

2. Se dejaron reposar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añadió 0.2 mL de cloroformo y mezcló por inversión. Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se centrifugó la mezcla resultante a 12,000 rpm durante 15 minutos. La centrifugación separó la mezcla en 3 fases.
5. Se transfirió la fase acuosa a un tubo cónico de 1.5 mL. y añadió 0.5 mL de alcohol isopropílico y mezcló.
6. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se decantó; posterior a ello se adicionó 1 mL de etanol frío al 75 %. Se centrifugó la muestra a 7500 rpm durante 10 minutos.
7. Se decantó el sobrenadante y dejó secar el sedimento de ARN. Se agregaron 0.05 mL (50 μ L) de agua libre de ARNasas al sedimento de ARN.

CUANTIFICACIÓN DE ARN

- Se realizaron diluciones de las muestras de ARN con agua libre de ARNasas, 1:20, 1:25 y 1:50.
- Estas muestras se cuantificaron en el Biofotómetro Eppendorf®, ajustando el equipo a cero de absorbancia con 50 μ L de agua libre de ARNasas.

ELECTROFORESIS DE ARN

1. Se probaron concentraciones entre 0.8-1.2 %; del gel de agarosa, antes de que solidificara se adicionaron 5 μ L de Bromuro de etidio.
2. Se diluyó el buffer TBE 10X a concentraciones de 0.5X a 1.2X.
3. Se prepararon las muestras de ARN, dependiendo de la concentración original de ARN por cada 5 μ L de muestra se adicionó 1 μ L de búfer de carga 5X Promega® obteniendo concentraciones de 1,3,5,7,10,15 μ g de ARN que fueron colocadas en los pozos.

4. Finalmente se montó el sistema conectando los electrodos de acuerdo con el código de colores, rojo-rojo y negro-negro y se procedió a encender la fuente de poder, seleccionando 75 V. el corrimiento electroforético fue de 50 minutos.

5. Se observaron las bandas de ARN ribosomal: subunidades 28s y 18s. utilizando el transiluminador FastGene® LED Illuminator (recurso del laboratorio de BCT I), pero también se observaron las bandas en el equipo ChemiDoc® MP Imaging System de la UMIES de la FES Zaragoza.

PRUEBAS PILOTO

-Una vez establecidas las condiciones de los procedimientos de extracción, cuantificación y determinación de la integridad de ARN (electroforesis) se procedió a realizar 2 pruebas piloto, una con alumnos del grupo 1402 del semestre 2019-1 y otra en el curso de profesores del módulo Bioquímica Celular y de los Tejidos I “Curso teórico-Práctico Aspectos experimentales de Biología Molecular: Extracción ARN”, durante el intersemestre 2019-1 y 2019-2.

RESULTADOS

Se obtuvieron las muestras sanguíneas por punción venosa empleando tubos Vacutainer® con EDTA. Se encontró que el volumen adecuado para obtener una media de 4.5 millones de células para la extracción de ARN fue de 4 mL de sangre, las cuales fueron tratadas con Ficoll-Paque®, una sustancia formadora de gradiente de densidad, para lograr el aislamiento de las células mononucleares (linfocitos). De estos últimos se tomó un volumen de 300 µL. En el cuadro 2 se presentan los resultados del conteo celular.

Cuadro 2. Conteo celular en muestras de sangre tratadas con Ficoll-Paque®.

| | Volumen 300 µL | Volumen variable | Valor p (IC 95%) |
|--|-------------------|---------------------|------------------|
| Células en 1mm² x10⁴ mL | | | |
| Media | 4538666.66 | 3118666.66 | 6.42e(-5)* |
| Desviación estándar | 855752.52 | 800659.25 | |
| Mínimo | 2900000.00 | 2200000.00 | |
| Máximo | 5900000.00 | 4740000.00 | |

*Estadísticamente significativa ($p < 0.0001$), prueba t de Student y de Welch.

Se probaron dos reactivos para la extracción de ARN el TriReagent® y TriZol®. A continuación, se presentan los cuadros 3 y 4 que muestra las concentraciones e índices de pureza del ARN obtenido con los dos reactivos de extracción empleados. Asimismo, en el cuadro 5 se resumen la comparación estadística de los dos reactivos comerciales, el cual evidencia que TriReagent es el reactivo comercial más conveniente para su uso en el Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I.

Cuadro 3. Concentración y relación de absorbancias de muestras de células mononucleares tratadas con TriReagent®.

| Concentración Dilución 1:50 (µg/mL) | Concentración real | Rel 260/280 | Rel 260/230 | A280 | A260 | A230 |
|---|-----------------------|----------------|----------------|-------|-------|-------|
| 1 | 50 | 2.1818 | 1.8462 | 0.011 | 0.024 | 0.013 |
| 2.4 | 120 | 1.9032 | 1.7879 | 0.031 | 0.059 | 0.033 |
| 2.4 | 120 | 1.9375 | 1.8235 | 0.032 | 0.062 | 0.034 |
| 3.1 | 155 | 2.1081 | 1.9500 | 0.037 | 0.078 | 0.04 |
| 3.2 | 160 | 1.8810 | 2.0256 | 0.042 | 0.079 | 0.039 |
| 3.5 | 175 | 1.9130 | 1.8333 | 0.046 | 0.088 | 0.048 |
| 3.7 | 185 | 1.9796 | 1.8654 | 0.049 | 0.097 | 0.052 |
| 4.3 | 215 | 2.0377 | 2.0377 | 0.053 | 0.108 | 0.053 |
| 4.4 | 220 | 1.9643 | 2.0370 | 0.056 | 0.11 | 0.054 |
| 4.4 | 220 | 1.8387 | 2.1111 | 0.062 | 0.114 | 0.054 |
| 4.7 | 235 | 1.8438 | 1.9344 | 0.064 | 0.118 | 0.061 |
| 4.9 | 245 | 1.8906 | 1.9516 | 0.064 | 0.121 | 0.062 |
| 5.5 | 275 | 1.8133 | 1.8630 | 0.075 | 0.136 | 0.073 |
| 6.2 | 310 | 1.9136 | 2.1528 | 0.081 | 0.155 | 0.072 |
| 6.3 | 315 | 1.9383 | 1.8471 | 0.081 | 0.157 | 0.085 |

Cuadro 4. Concentración y relación de absorbancias de muestras de células mononucleares tratadas con TriZol®.

| Concentración Dilución 1:50 (µg/mL) | Concentración real | Rel 260/280 | Rel 260/230 | A280 | A260 | A230 |
|-------------------------------------|--------------------|-------------|-------------|-------|-------|-------|
| 0.5 | 25 | 2.6000 | 0.3421 | 0.005 | 0.013 | 0.038 |
| 1.1 | 55 | 2.2500 | 0.6429 | 0.012 | 0.027 | 0.042 |
| 1.1 | 55 | 1.8000 | 0.6585 | 0.015 | 0.027 | 0.041 |
| 1.2 | 60 | 1.7222 | 0.3735 | 0.018 | 0.031 | 0.083 |
| 1.2 | 60 | 1.8235 | 0.4921 | 0.017 | 0.031 | 0.063 |
| 1.3 | 65 | 2.0000 | 0.6885 | 0.021 | 0.042 | 0.061 |
| 1.3 | 65 | 1.9545 | 0.6719 | 0.022 | 0.043 | 0.064 |
| 1.3 | 65 | 1.8182 | 0.6667 | 0.022 | 0.04 | 0.06 |
| 1.4 | 70 | 1.8750 | 0.6818 | 0.024 | 0.045 | 0.066 |
| 1.6 | 80 | 1.8400 | 0.6765 | 0.025 | 0.046 | 0.068 |
| 1.8 | 90 | 1.8800 | 0.6351 | 0.025 | 0.047 | 0.074 |
| 1.9 | 95 | 1.8077 | 0.5802 | 0.026 | 0.047 | 0.081 |
| 1.9 | 95 | 1.8000 | 0.8852 | 0.03 | 0.054 | 0.061 |
| 2.1 | 105 | 1.8276 | 0.7794 | 0.029 | 0.053 | 0.068 |
| 2.5 | 125 | 1.9091 | 0.4315 | 0.033 | 0.063 | 0.146 |

Cuadro 5. Comparación de protocolos para extracción de ARN en sangre humana.

| | TriReagent® | TriZol® | Diferencia | Valor p (IC 95%) |
|----------------------------|-------------|---------|------------|------------------|
| Concentración µg/mL | | | | |
| Media | 4.00 | 1.48 | 2.52 | 7.8e(-7)* |
| Desviación estándar | 1.46 | 0.49 | | |
| Mínimo | | | | |
| Máximo | | | | |
| Índice 280/260 | | | | |
| Media | 1.94 | 1.87 | | |
| Mediana ⁺ | 1.91 | 1.84 | | 0.023 |
| Desviación estándar | 0.10 | 0.12 | | |
| Mínimo | | | | |
| Máximo | | | | |
| Índice 260/230 | | | | |
| Media | 1.93 | 0.61 | 1.32 | 7.574e(-22) . |
| Desviación estándar | 0.11 | 0.15 | | |
| Mínimo | | | | |
| Máximo | | | | |

*Estadísticamente significativa entre los grupos de entrada (P <0.001), prueba t de Student

·Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de entrada (P = <0.001), prueba t de Student.

+ Prueba de los rangos con signos de Wilcoxon

En las figuras 8 y 9 se muestra la frecuencia de las concentraciones de ARN obtenidas en las muestras a partir de 4 mL de sangre venosa.

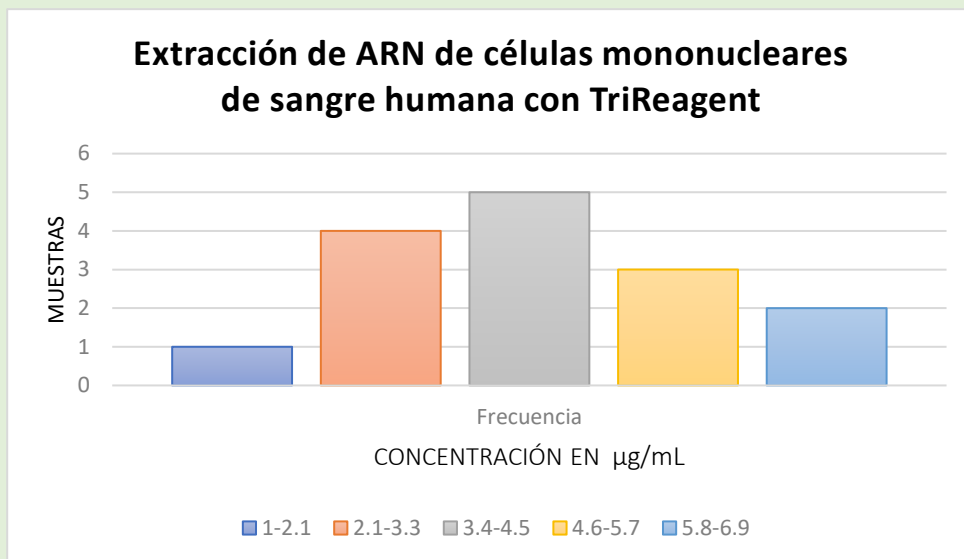


Figura 8. Concentración de ARN de muestras tratadas con TriReagent®.

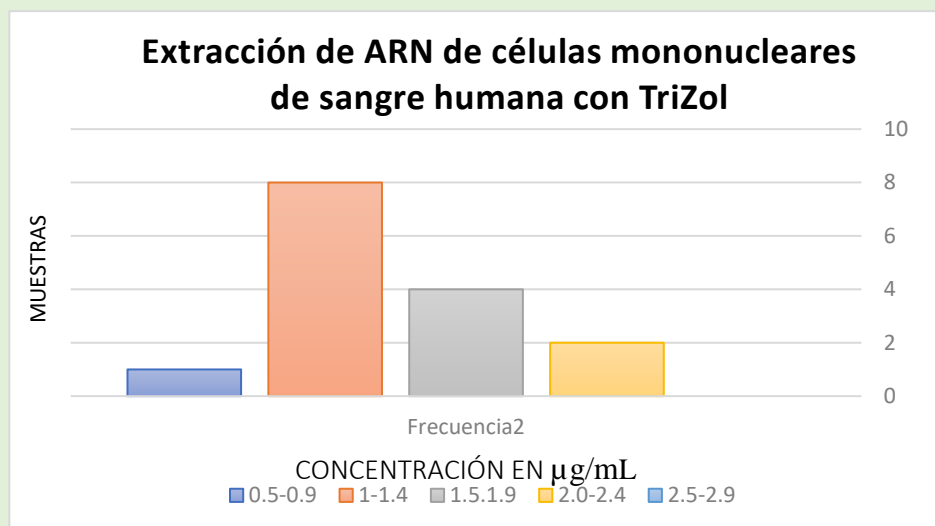


Figura 9. Concentración de ARN de muestras tratadas con TriZol®

ELECTROFORESIS

Para las muestras: se colocó 1 μL de Buffer de carga por cada 5 μL y se determinó un mínimo de 5 μg de ARN por pozo.

Para el gel: Se realizó con agarosa al 1% en TBE al 1X (100 mL), con 5 μL de bromuro de etidio.

Para el corrimiento, se usó buffer TBE al 1X, a 75 voltios durante 50 minutos.

Las figuras 10 y 11, ejemplifican la integridad del ARN obtenido, con el protocolo propuesto, en las que se observan las dos bandas que indican la presencia de las subunidades 28s y 18s del ARNr.

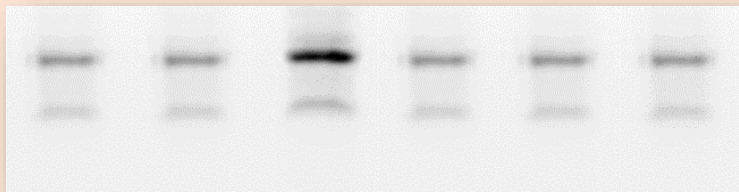


Figura 10. Integridad de las muestras de ARN obtenidos mediante el uso de TriReagent®. Visualizado en el ChemiDoc® MP Imaging System

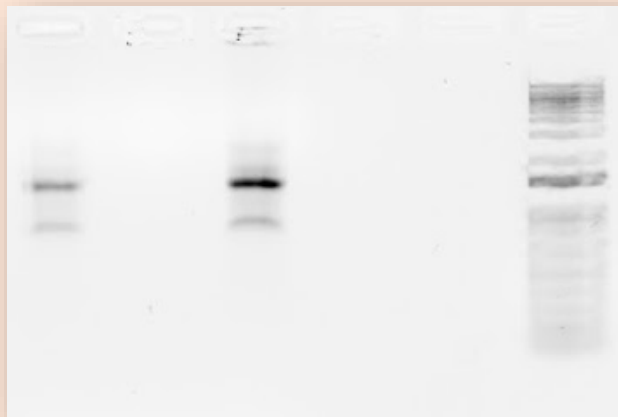


Figura. Muestras con 3 µg de ARN obtenido mediante el uso de TriZol®, con 3 lavados de etanol al 75 %. Visualizado en el ChemiDoc® MP Imaging System.

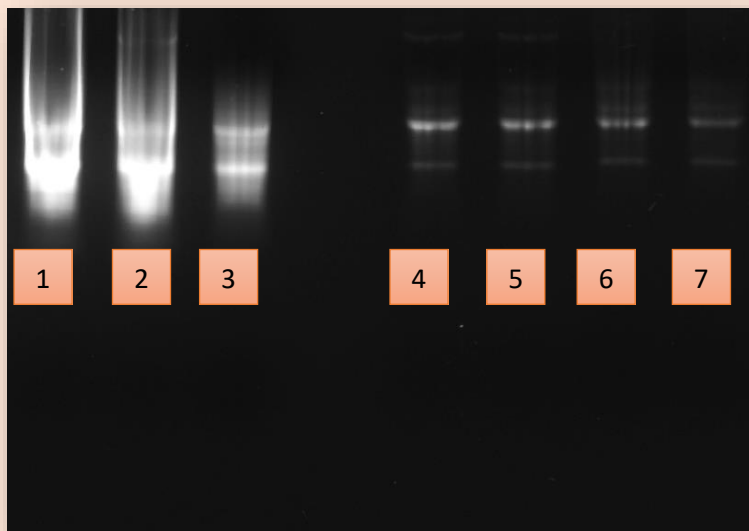


Figura 12. Electroforesis en agarosa al 1% de muestras de ARN obtenido mediante el uso de TriZol®. Del pozo 1 al 3: 12 µg de muestra; del pozo 4 al 7: 1 µg.

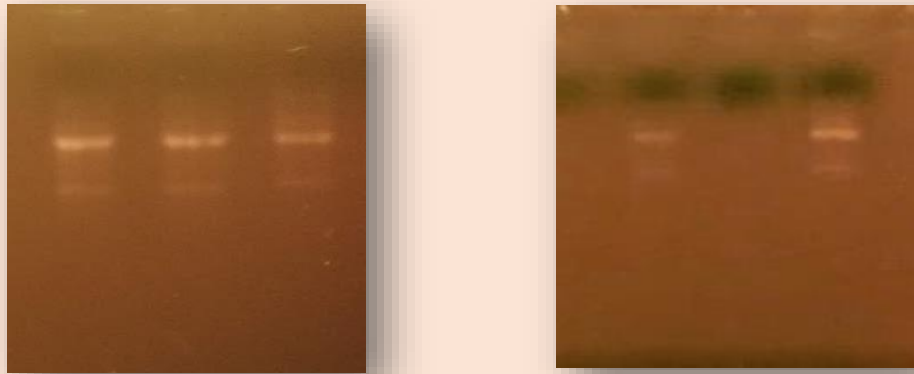


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra las subunidades 28s y 18s. Con 6 μg de los productos de ARN obtenidos mediante el uso de TriZol® y TriReagent. Visualizado en el FastGene® LED Illuminator.

Después de que las condiciones fueron establecidas se realizaron dos pruebas piloto para profesores y alumnos de la asignatura de Bioquímica Celular y de los Tejidos I, en las que se realizaron la extracción, cuantificación y determinación de la integridad de ARN a partir de una muestra de sangre humana, a partir de éstas se realizaron las modificaciones pertinentes a los protocolos y ayudaron para establecer los tiempos de cada paso, ajustando a las sesiones de laboratorio del módulo. De esta manera se pudo realizar la redacción final de los protocolos de las 3 técnicas, los cuales se encuentran en el anexo del presente trabajo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La implementación de los tres protocolos de extracción, cuantificación y electroforesis de ARN al Manual de Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos, debió considerar varios aspectos para su estandarización, como son el número de alumnos, los reactivos requeridos, los equipos, el material, y tiempo de las sesiones de laboratorio.

El primer punto para deliberar fueron los reactivos empleados para la extracción del ARN, por dicho motivo se realizó una revisión de las técnicas más actuales para la extracción de ácidos nucleicos, encontrándose una gran variedad, desde las más convencionales como la de Chomczynski y Sacchi (1987) y sus variantes, el uso de columnas de sílice, perlas magnéticas, una combinación de las anteriores en kits comerciales, hasta equipos automatizados que llevan a cabo todo el proceso.

La elección de la técnica obedeció en primera instancia al tipo de muestra, es decir si estas son frescas o conservadas, asimismo el origen de ellas para determinar un pretratamiento por lo cual se optó por el uso de sangre humana venosa que puede ser extraída durante la sesión del laboratorio de BCT I. Posteriormente, basados en el costo-beneficio, la cantidad de muestras y el uso posterior que se dará al ARN extraído fue que se descartó el uso de columnas de sílice y/o perlas magnéticas pues pese a ofrecer la ventaja de usar sangre total, un considerable rendimiento y reducción del tiempo de trabajo, no justifican el uso de estas en un laboratorio de docencia dado que la participación del alumno es menor. Por ejemplo, se tiene un equipo que incluye la extracción orgánica del ARN y columna de sílice por lo que no se requiere aislamiento celular previo. Mientras que la extracción orgánica es también de alta pureza y conveniente cuando el número de muestras es pequeño, considerándose 10 muestras por sesión, 60 al semestre.

Referente a la extracción con solventes orgánicos, como se encuentra optimizado para muestras celulares, se hizo la elección de un reactivo conocido como Ficoll-Paque® el cual permite aislar células mononucleares (linfocitos) de sangre periférica con alto rendimiento, mediante un procedimiento de centrifugación simple

y rápido. No obstante, se debe tener especial cuidado cuando es añadida la sangre al tubo que contiene esta solución puesto que una rápida y/o brusca adición estropea la muestra. De igual manera una vez que los linfocitos son separados en una capa color blanco lechoso deben ser extraídos cuidadosamente procurando tomar sólo esta porción para evitar arrastrar otras células, solventes o sales que causan una menor pureza en la muestra final. El tiempo y velocidad de centrifugación se vio limitada por el modelo de la centrífuga, dado que varía el radio del rotor, así como el tipo: fijo o basculante. Sin embargo, determinadas estas variables se procedió a una recuperación de la interfase celular (linfocitos) de 300 μ L, cuando se parte de un volumen de 4 mL de sangre total. Un volumen menor a 300 μ L se tradujo en un menor número de células y por ende, menor concentración del ARN extraído.

La lisis celular se realizó por un método químico para lo cual se contempló dos reactivos comerciales: TriZol® y TriReagent®, una solución monofásica que contiene fenol con tiocianato de guanidina. Dado que se asegura una extracción de igual eficacia, se procedió a la comparación de ambos reactivos con el fin de determinar que no había una diferencia significativa entre ellos. Por este motivo se realizó la medición de la absorción UV debido a que es el método más fácil y rápido para determinar la concentración y la pureza del ARN. Con estos datos, se realizó una comparación estadística, encontrándose diferencia significativa en cuanto a la pureza del material extraído, TriReagent demuestra una pureza estadísticamente significativa, mayor que la de Trizol (cuadro 5). Los datos de las muestras tratadas con el reactivo Trizol® presentan un índice de pureza 280/260 que resulta aceptable puesto que se encuentra dentro del rango, más el índice 260/230 muestra valores debajo del admisible, indicativo de la presencia de sustancias contaminantes que absorben entre 230 y 270 nm, como el fenol y guanidina.

La opción viable para solucionar esto es añadir un paso adicional durante la extracción, una vez que se adicionó el Trizol®, cloroformo y se centrifugó, la fase acuosa obtenida se transferirá a un nuevo tubo que contendrá solo cloroformo, agitándose y centrifugándose nuevamente. De la misma manera dos o tres lavados extra de etanol al 75 % contribuirían a una eliminación efectiva de las cantidades

residuales de fenol sin disminuir demasiado el rendimiento de ARN y con sólo un poco de tiempo extra. Ciertamente que es opcional y dependerá totalmente del propósito que se destine al ARN obtenido.

Con relación a la integridad de la muestra se llevó a cabo la electroforesis del ARN extraído, para lo cual se determinó que con 1 μg (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de muestra era suficiente para ser visualizado en el equipo ChemiDoc® MP Imaging System.

Por otra parte, es a partir de 5 μg (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que las bandas de ARNr pueden ser observadas, clara y definidamente, en el transiluminador (FastGene® LED Illuminator), porque la sensibilidad del equipo es menor que el primero, por lo cual se requiere una mayor cantidad de muestra, lo que no representa problema en la aplicación en los pozos del gel mientras se tengan concentraciones mayores a ésta. Aun así, se observó que con 4 μg bandas tenues podían ser identificadas y estas podían ser colocadas sin problema en los pozos.

La realización de la prueba piloto con profesores y alumnos de la asignatura de Bioquímica Celular y de los Tejidos I, evidenció algunos aspectos de las técnicas que debían ser considerados, como es el caso de la concentración obtenida y empleada para su cuantificación, por tal razón las muestras de ARN tuvieron que ser diluidas para que pudieran ser determinadas con el equipo Biophometer Eppendorf®, sin embargo se observó que al realizar esto la pureza de las muestras disminuye lo que se relaciona con un alto contenido de impurezas que elevan la absorbancia de la muestra, esto fue observado cuando se tomaba un volumen mayor de células mononucleares al establecido con arrastre de Ficoll o plasma o bien en el paso de la recuperación de la fase acuosa después de agregar el Trizol o TriReagent si se tomaba la porción intermedia que contiene ADN. Del mismo modo una homogeneización incompleta, en segundo paso mencionado, influye sobre el resultado obtenido ya que no hay una completa disociación de las estructuras celulares.

Respecto a la electroforesis, se determinó que una inadecuada dilución causa que el ARN 28S y 18S sea visible en las posiciones correctas en el carril, aunque detrás de una especie de frotis (Figura 7).

Con estos primeros resultados se determinó la importancia de un adecuado pipeteo, dado que esto es fundamental ya que de no hacerlo se tienen retrasos en la técnica porque se resuspenda la muestra o bien se arrastren sustancias que interfieren en los análisis posteriores que se requieran.

Acerca de la electroforesis se concretó las diluciones a emplear cuando se tienen altas concentraciones de ARN, así como el tiempo óptimo de corrimiento manteniendo condiciones que permitan mantener el voltaje y evitar un calentamiento del sistema, la sugerencia es enfriar el buffer de corrimiento previamente a la corrida. En cuanto a la concentración del gel, se comprobó que esta podía disminuirse hasta el 1% y los resultados eran igualmente adecuados para el propósito.

Es de suma importancia mencionar que el material y reactivos usados debe ser exclusivo para esta práctica y tratado con cuidado porque la contaminación de esto afecta negativamente los resultados esperados, esto incluye la degradación del material biológico obtenido o la de los reactivos. Por ello la cristalería deberá ser lavada y después tratada con agua libre de ARNasas, dilución al 0.1 % con Dietilpirocarbonato (DEPC), reactivos grado biología molecular, fraccionados de preferencia, considerando que serán manipulados por varias personas y más importante aún los reactivos deberán ser resguardados en un área específica.

La segunda prueba piloto permitió estimar el tiempo de las sesiones de laboratorio, así como la organización de las actividades basadas en la experiencia de los alumnos incluyendo los materiales y equipos. Con base en ello se sugiere realizar la introducción a la práctica que incluye fundamentos, uso de equipos, precauciones y resolución de dudas con lo que se pretende evitar retrasos en la parte experimental. Esta última sería dividida en dos partes, la primera se realizaría después de la explicación, esto sería la toma de muestra sanguínea y extracción de células mononucleares que podrían ser resguardadas en congelación en medio PBS. La segunda sesión contempla la extracción del ARN en un tiempo no mayor a 70 minutos, con la posterior cuantificación y electroforesis. Debido a esto se propone realizar la preparación del gel y mientras este solidifica realizar la cuantificación de

la muestra en el equipo BioPhometer[®] y finalmente realizar la preparación de las muestras, aplicación y corrimiento del gel. La electroforesis es importante para que ellos puedan visualizar la integridad de la muestra, no obstante, esto es opcional.

CONCLUSIONES

- Se determinaron las condiciones para el aislamiento de células mononucleares a partir de sangre humana.
- Se estandarizaron los protocolos para la extracción de ARN usando dos reactivos comerciales, determinándose la viabilidad de ambos, siendo TriReagent el que demostró una pureza superior en la extracción.
- Se establecieron los requisitos para la determinar la concentración e integridad de la muestra de ARN a través de la electroforesis en agarosa.
- Todos los protocolos se diseñaron considerando el equipo y material disponible en el laboratorio al igual que el tiempo del que se dispone.
- Se llevaron a cabo dos pruebas piloto con profesores y alumnos para rectificar el proceso.
- En consecuencia, se realizó la redacción de los protocolos de las técnicas de Extracción, Cuantificación y Electroforesis de ARN humano para su incorporación en la actualización del manual de Bioquímica Celular y de los Tejidos I.

REFERENCIAS

1. Kondo Y. *Human Motivation*. 2ed. Tokio; 1993.
2. McKee T, McKee JR. *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. 5th ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2013.
3. Tamarin RH. *Principios de Genética*. 6th ed. United State of America: McGraw-Hill Education; 1999.
4. Hicks J.J. *Bioquímica*. 2da ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2007.
5. Lehninger A, Nelson D. *Principios de Bioquímica*. 5a ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2009.
6. Karp G. *Biología Celular y Molecular, Conceptos y experimentos*. 3rd ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2009.
7. Cobb M. *60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology*. PLOS Biol. 2017 September 18; 15(9).
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Granum MAS, editor. New York: Garland Science; 2008.
9. Lodish H, Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Mont. *Biología Celular y Molecular*. 5th ed. Colombia: Editorial Médica Panamericana; 2005.
10. Snyder L, Peters J, Henken T, Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria*. 3rd ed. Washington DC: ASM Press; 2007.
11. Watson J D. *Molecular Biology of the Gene*. 17th ed. United States of America: Pearson Education; 2014.
12. Mathews C K. *Bioquímica*. 3rd ed. Madrid: Pearson Educación; 2002.
13. Klug WS. *Principios de Genética*. 8th ed. Madrid: Pearson Education; 2006.
14. Murray R K, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Well PA. *Harper Bioquímica Ilustrada*. 1st ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2010.
15. Jiménez LF. *Biología Celular y Molecular*. 1st ed. Figueroa LG, editor. México: Pearson Educación; 2003.
16. Lewin B. *Genes VIII*. 8th ed. Carlson G, editor. United State of America: Pearson Prentice Hall; 2004.
17. Skoog, D. A., Holler, J. H., Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*. 5a Edición. España: Editorial McGraw Hill; 2001.
18. Hernández L., González C. *Introducción al análisis instrumental*. España: Ariel; 2004.

19. Nwokeoji A, Kilby PM, Portwood DE, Dickman M. RNA Swift: *A rapid, versatile RNA extraction method free from phenol and chloroform*. Anal Biochem. 2016 November; 512.
20. Madera MV, Suárez A. *Evaluation of two RNA extraction methods in children's saliva*. Revista Odontológica Mexicana. 2017 October-December; 21(4).
21. Grabmüller M. *Comparative evaluation of different extraction and quantification methods for forensic RNA analysis*. Forensic Science International: Genetics. 2015 May; 16.
22. Farrell RE. *RNA Methodologies*. 5th ed. San Diego, CA: Academic Press, Elsevier; 2017.
23. Mommaerts K, Sánchez I, Betsou F, Mathieson W. *Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions*. Anal Biochem. 2015; 479: 51-53.
24. Saeed El-Ashram., Ibrahim Al Nasr., Sun Xou. *Nucleic acid protocols: Extraction and optimization*. Biotechnology Reports. 2016 December; 12: 33-39.
25. Porto A. *Esquema de las sucesivas versiones del dogma central de la biología molecular*. 2013. Archivo: Central Dogma.png de PhiLiP.
26. Yikrazuul. *Estructura de rayos X del tRNA Phe de la levadura*. 2010. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TRNA-Phe_yeast_1ehz.png.
27. Wetlaufer. D.B 1962. *Ultraviolet Spectra of proteins and amino acids*. Advances in protein Chemistry 17:303-390
28. Bøyum, A., Scand. J., (1968). *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood*. (Paper IV). Clin. Lab. Invest. 21 Suppl, 97, 77–89.
29. Separation of human peripheral blood monocytes on continuous density gradients of Polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll). Brandslund, I., Møller-Rasmussen, J., Fisker, D., et al. J Immunol Methods, 48, 199–211 (1982).
30. Lee S.T., Garcia A., Jeffrey D.A ,Jiang X, Stauffer B., Miyamoto S. et. al. *Optimization of phenol-chloroform RNA extraction*. MethodsX. 2018; 5: 599–608.
31. Mathews, C.K.; Van Holde, K.E. y Ahern, K.G. *Biochemistry*. 3a. ed., Addison-Wesley Longman, Inc., San Francisco, California, 2000.
32. Koontz, L. *Chapter Four - Agarose Gel Electrophoresis. Methods in Enzymology*. Vol 529. USA: Elsevier Inc.; 2013. 35-45.
33. Pestov, D.G. Mansour, F. H. *Separation of long RNA by agarose–formaldehyde gel electrophoresis*. Anal Biochem. 2013; 444(1): 18-20.
34. Aranda, PS, LaJoie, DM, Jorcyk, CL. *Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality*. Electrophoresis. 2012; 33(2):366-9.
35. Qiang L., Xuemin L., Sommer S. *pK-Matched Running Buffers for Gel Electrophoresis*. Anal Biochem. 1999; 270(1).112-122.

36. Bhatia S, Dahiya R. *Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science*. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences: Academic Press; 2015:121-156.
37. P. Kanani, Y. M. Shukla, A. R. Modi et al. *Standardization of an efficient protocol for isolation of RNA from Cuminum cyminum*. JKUSUS. Available on: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.12.008>
38. V. Die J, Román B. *RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies*. J. Exp. Bot. 2012;63(17): 6069–6077.
39. Afshar-Mohammadian, M., Rezadoost, M.H., Fallah, S.F. *Comparative analysis and innovation of a simple and rapid method for high-quality RNA and DNA extraction of kiwifruit*. MethodsX. 2018; 5: 352-361.
40. Petrov A., Tsa A., Puglisi J.D. *Chapter Sixteen - Analysis of RNA by Analytical Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. Jon Lorsch. Methods in Enzymology. Vol. 530. Academic Press: 2013.p.301-313.
41. Kolitz S., Lorsch J. *Chapter Eighteen - Explanatory Chapter: Nucleic Acid Concentration Determination*. Methods in Enzymology. Vol. 530. Academic Press: 2013.p. 331-336.
42. Genetic Essential Concepts and Connection. First Edition© 2010 W.H Freeman and Company.

ANEXOS

Anexo 1: Práctica de Extracción de ARN Humano.

EXTRACCIÓN DE ARN HUMANO

Objetivos

- ✓ Extraer células mononucleares de sangre.
- ✓ Analizar el fundamento de la extracción de ARN.
- ✓ Extraer el ARN de una muestra de sangre utilizando el método de Chomczynski y Sacchiz.

Antecedentes académicos

- ✓ Ácidos nucleicos: ARN y ADN
- ✓ Tipos de ARN y sus funciones
- ✓ Propiedades fisicoquímicas del ARN
- ✓ Métodos de extracción y purificación de ARN
- ✓ Tipos de centrifugación
- ✓ Gradientes de densidad: propiedades y funciones.

Introducción

El ARN es un polímero lineal de cuatro tipos diferentes de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Además de su participación en la síntesis de proteínas, entre sus funciones se tiene la regulación de la expresión génica, la diferenciación celular y la catálisis.

Químicamente se diferencia del ADN porque contiene un azúcar ribosa con dos grupos hidroxilos en posición 2' y 3', cuyo grupo libre en la posición 2 es lo que le confiere la cualidad de ser más reactivo. En el cuadro 1 se enuncian más diferencias entre ambos polinucleótidos.

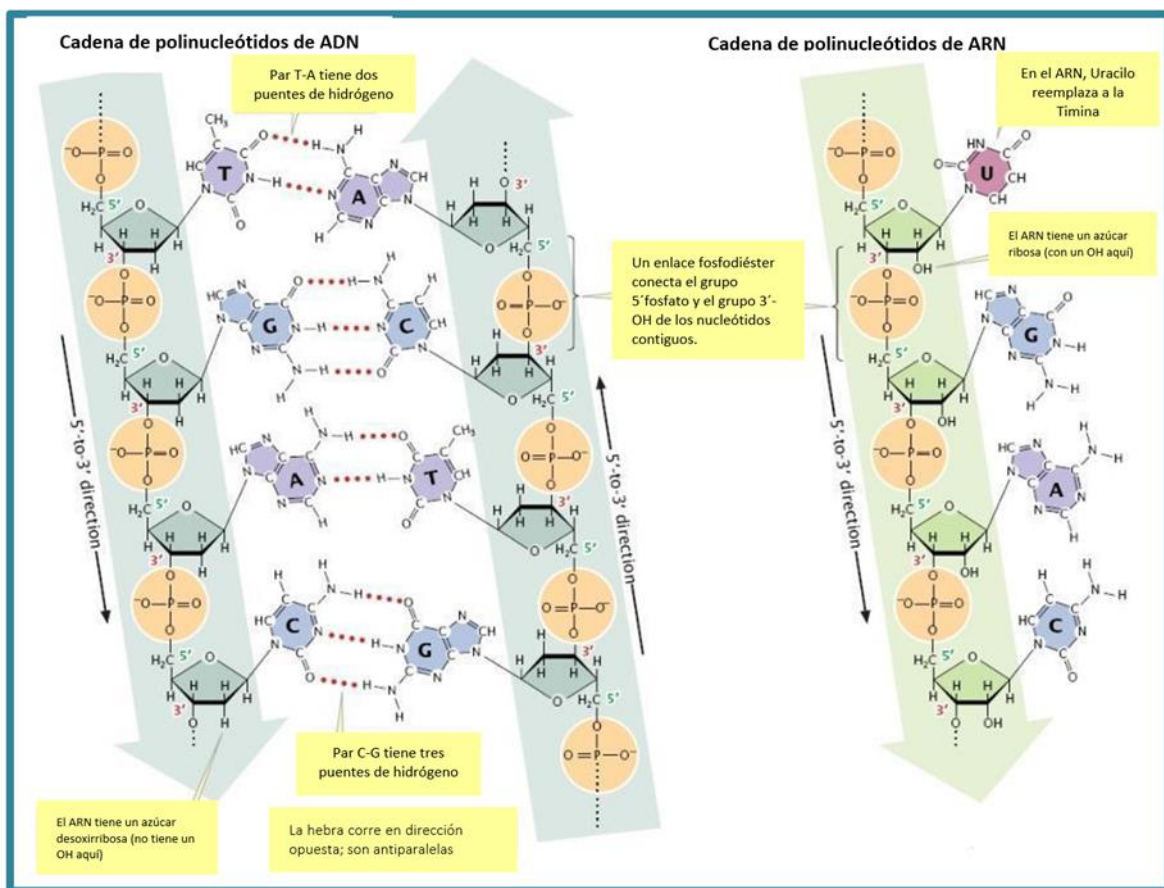


Fig.1. Comparación estructural de ADN y ARN.

En primera instancia se sabe que el ADN es quien contiene las instrucciones, codificadas, que determinan todas las características y funciones de un

organismo. Sin embargo, no es hasta la dilucidación de la relación del flujo de información entre genes y las proteínas (Dogma central de la Biología) que se ha podido comprender la importancia de la intervención del ARN en dicho proceso, pues se trata de un precursor en la síntesis de las cadenas polipeptídicas.^{1,5}

Tipos de ARN

De manera generalmente se hace referencia a tres tipos. El ARN mensajero (ARNm) quien es el encargado de llevar la información a los ribosomas, este se encuentra en una proporción de 2 al 5 % en la célula. Se origina, en el núcleo, a partir de una hebra de ADN que sirve como molde.

El ARN de transferencia (ARNt), los adaptadores que seleccionan los aminoácidos y los retienen en el lugar adecuado del ribosoma para que se puedan incorporar a las proteínas. Los ARN ribosomales (ARNr) quienes reconocen y unen otras moléculas, proveen apoyo estructural y catalizan las reacciones químicas por medio de las cuales los aminoácidos se unen de manera covalente y forman las proteínas. El más abundante ya que representa cerca del 80% del ARN de una célula que se está dividiendo rápidamente.^{1, 2, 4}

Estos tres son los usualmente mencionados en la literatura, dada su específica función aun cuando existen otros tipos de ARN igualmente importantes como lo son los ARN nucleares pequeños (small nuclear; snARN) y micro-ARN (miARN). Los miARN participan en la síntesis de proteína, mientras que los snARN lo hacen en la edición del ARNm, es decir en la conversión del ARN nuclear heterogéneo (snoARN) a ARNm (ARN listo para salir del núcleo, maduro), así como en la modulación de la expresión de gen al alterar la función del RNAm.^{3, 12}

Por su parte ARN enzimático (ribozimas), con funciones catalíticas, asociadas al procesado del propio ARN.

Transcripción

Es el primer paso en el complejo proceso conocido como expresión génica, esto es copiar una secuencia de ADN (gen) para producir una molécula de ARN, el ARN mensajero o codificante.

El ARNm debe pasar por un proceso de maduración antes de su salida del núcleo. Para ello primero debe ocurrir el splicing o corte y empalme que es la remoción de aquellos fragmentos de información genética que no serán utilizados en la codificación de la proteína de interés, los llamados intrones. El

siguiente paso consiste en la adición de una cadena de poli(A) que se trata de un conjunto de Adeninas en el extremo 3' y que tiene función estabilizadora. De la misma forma se da la unión del CAP o caperuza en el extremo 5' del ARNm, con lo cual se dará el inicio de la señalización para la síntesis de proteínas una vez que la cadena ARNm haya salido a través de los poros nucleares hacia el ribosoma. Cabe señalar que los dos anteriores funcionan como protectores de la información frente a las RNAsas que se encuentran en el citoplasma.^{3, 4, 6, 7,8}

Traducción

En esta etapa el ARNm se decodifica para seleccionar los aminoácidos que formarán a la proteína. La iniciación, del proceso, es debido a la interacción de varias proteínas y el CAP o caperuza ligado al extremo 5' de las moléculas de ARNm. Es en el sitio A del ribosoma donde ARNm actúa como el molde para controlar la incorporación de aminoácidos en el orden específico codificado por la secuencia de nucleótidos del ADN.⁴

En el sitio P, es donde el ARN ribosomal se encarga del ensamble de los aminoácidos, siguiendo el orden codificado por el ADN, en proteínas específicas.^{5, 6, 7,8}

Cuadro 1. Comparación de características estructurales y funcionales de ácidos nucleico.

| Características | ARN | ADN |
|---------------------------------|--|--|
| Configuración espacial | Generalmente lineal con ocasionales estructuras tridimensionales | Doble (excepto en algunos virus), helicoidal |
| Bases | Adenina-Uracilo Guanina-Citosina | Adenina-Timina Guanina-Citosina |
| Pentosa | Ribosa | Desoxirribosa |
| Transcripción de la información | Porciones | Completa |

Aislamiento de células mononucleares

En la célula, la función del núcleo es mantener la integridad de los genes y controlar las actividades celulares regulando la expresión génica. Por ello se dice que el núcleo es el centro de control de la célula. La obtención del ARN resulta más simple cuantos menos pasos se realicen para el aislamiento de este de la célula, por lo que la sangre resulta el tejido más adecuado para ello. La sangre está compuesta de una porción celular, llamada elementos formes, y una porción líquida, llamada plasma (matriz extracelular). Cuando se centrifuga una muestra de sangre, los elementos formes más pesados se aglomeran en el fondo del tubo, y el plasma queda en la parte superior. Los leucocitos y las plaquetas sólo forman una “capa leucocitaria” de color claro en la interfaz entre los eritrocitos aglomerados y el plasma. No obstante, esta disposición de las partículas puede ser fácilmente alterada debido a la naturaleza de las partículas, el medio en el que se encuentran, por tal razón es que se requiere del uso de gradientes de densidad que son sustancias que permiten que las partículas que han migrado a través de una solución, por acción de la gravedad o fuerza centrífuga, mantengan su disposición espacial unas respecto a otras, visto que permiten asegurar que no haya convección en el interior del gradiente debido a una disminución de la densidad del medio por causa de un aumento en la temperatura. Una segunda función importante del gradiente es el impedir las mezclas debidas a perturbaciones mecánicas. Finalmente, se tiene que estos evitan el flujo convectivo entre zonas como resultado de sus diferentes densidades, este efecto es muy pequeño, pero muy importante cuando se utilizan concentraciones elevadas.

Extracción y Purificación de ARN

En la extracción de ácidos nucleicos hay pasos fundamentales, como lo son:

- 1) Lisis celular a través de la ruptura de las membranas celulares o la pared, mediante métodos que pueden ser químicos, físicos o enzimáticos.
- 2) Desnaturalización de proteínas y Separación: Permite la eliminación progresiva de proteínas y otros contaminantes celulares y la obtención de un material genético cada vez más limpio. Dentro de las metodologías utilizadas las más comunes son la extracción con mezclas de fenol-cloroformo y la separación cromatográfica.
- 3) Precipitación: Permite la obtención del ácido nucleico listo para ser almacenado o diluido a la concentración deseada para su utilización.¹¹

Actualmente se encuentran numerosas metodologías y modificaciones, basadas en dos categorías principales; el grado de alteración celular y la inhibición de las ARNasas. Cada una con ventajas y limitaciones propias. Por esta razón, debe tenerse claro que no existe una forma correcta de extraer el ARN de las células y tejidos, y que la única manera incorrecta de hacerlo es permitir la introducción de la actividad de la ARNasas.^{9, 10}

Chomczynski y Sacchi describieron un método de aislamiento de ARN total mediante una sola extracción. Por tal motivo propusieron la lisis celular con una mezcla ácida de isotiocianato de guanidinio-fenol, con la desnaturalización proteica por la adición de cloroformo y precipitación del ARN total con alcohol isopropílico.

Material y Equipo

- Tubos Vacutainer® de 4 mL con EDTA (tapón lila)
- Soporte de aguja
- Aguja para toma múltiple 21G x 38mm
- Torundas
- Ligadura
- Guantes de látex
- Centrífuga Sigma 2-66E
- Micropipetas p200, p1000.
- Puntas nuevas para micropipetas
- Agua libre de ARNasas (agua estéril con DEPC, Dietilpirocarbonato)
- Gradilla
- Tubos cónicos 1.5 mL
- Tubos cónicos de 15 mL
- Ficoll-Paque PLUS®
- Tri Reagent® o Trizol®
- Isopropanol
- Cloroformo
- Etanol al 75 %
- DEPC (Diluir 1 mL del reactivo en 999 mL de agua milliQ o bidestilada, agitar continuamente durante 12 horas protegido de la luz)

Método

A.-Extracción de células mononucleares a partir de un volumen de 4 mL de una muestra de sangre humana.

1. Realizar la técnica de extracción sanguínea de un integrante del equipo para obtener una muestra en un tubo que contenga anticoagulante EDTA (Fig. 2).
2. En un tubo cónico de 15 mL adicionar 4 mL de Ficoll-Paque PLUS[®], a continuación, depositar lentamente y por las paredes del tubo, los 4 mL de sangre. (Fig. 3)

Nota: es de suma importancia que la muestra no se mezcle con el contenido del tubo al momento de adicionarla.

3. Dejar reposar durante 5 minutos (Fig. 4) y proceder a centrifugar a 2500 rpm durante 30 minutos. Al término, debe verse una capa acuosa amarillo claro en la parte superior, una delgada capa blanca lechosa debajo de la capa acuosa, una capa acuosa transparente y finalmente

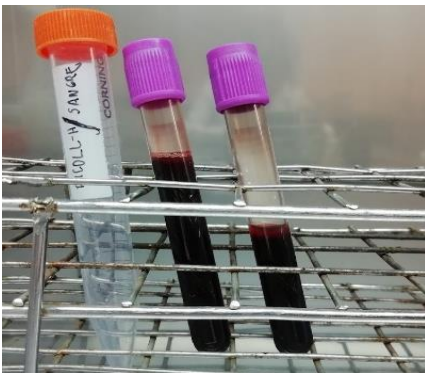


Fig.2 Ficoll-Paque Y muestras de sangre en EDTA.



Fig.3. Adición por las paredes del tubo, de sangre al tubo con Ficoll-Paque.

una capa rojo oscuro. (Fig. 5)



Fig.4 Sedimentación de los componentes de la sangre a través de solución de Ficoll-Paque.

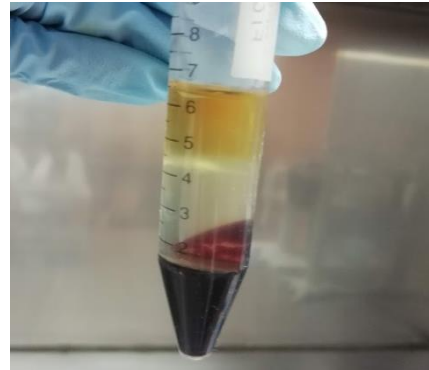


Fig.5 Componentes sanguíneos después de la centrifugación

4. Tomar de la capa blanco lechoso, el mayor volumen posible, sin llevarse el ficoll o plasma, y transferir a un tubo cónico de 1.5 mL.

Nota: Tomar cuidadosamente en pequeñas porciones de 50-100 μ L hasta máximo 300 μ L.

B.- Extracción de ARN con Tri Reagent®

4.1.1 Adicionar 1 mL de reactivo Tri Reagent. Pipetear el lisado hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogeneizar (Fig. 6). Dejar reposar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente.



Fig. 6 Adición de Tri Reagent.



Fig. 7 Reposo de las muestras con Tri Reagent

4.1.2 Añadir 0.2 mL de cloroformo por mL de Reactivo TRI Reagent (Fig. 7) utilizado. Mezclar, por inversión del tubo, durante 15 segundos y deje reposar 5 minutos a temperatura ambiente. (Fig. 8).

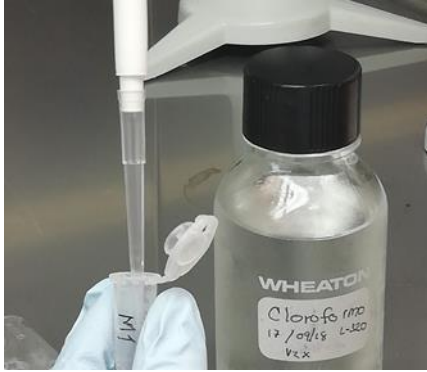


Fig. 8 Muestra después de la centrifugación

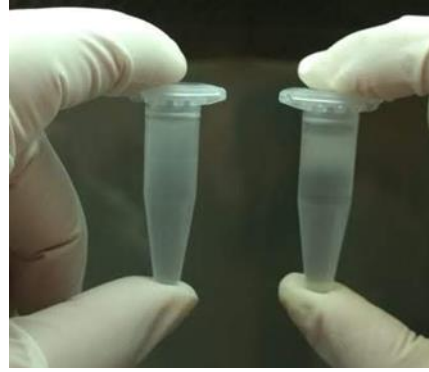


Fig. 9. Adición de alcohol isopropílico

4.1.3 Centrifugar la mezcla resultante a 12,000 rpm durante 15 minutos. La centrifugación separa la mezcla en 3 fases: una fase acuosa superior incolora (que contiene ARN), una interfase (que contiene ADN) y una fase orgánica rosa (contiene proteína).

4.1.4 Transferir la fase acuosa (transparente) a un tubo nuevo, añadir 0.5 mL de alcohol isopropílico y mezclar (Fig. 9).

Nota: Evite transferir cualquiera de la capa interfásica u orgánica a la pipeta cuando retire la fase acuosa.

4.1.5. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos. El precipitado de ARN formará un sedimento en el costado y el fondo del tubo.

4.1.6 Decantar el sobrenadante, de un sólo movimiento a un vaso de precipitados, y adicionar 1 mL de etanol frío al 75 %. Centrifugar la muestra a 7500 rpm durante 10 minutos.

4.1.7 Decantar el sobrenadante, de un sólo movimiento a un vaso de precipitados y secar brevemente el sedimento de ARN durante 15 minutos. Agregar 0.05 mL (50 μ L) de agua libre de ARNasas al sedimento de ARN (Fig.11)



Fig 10. Secado del ARN

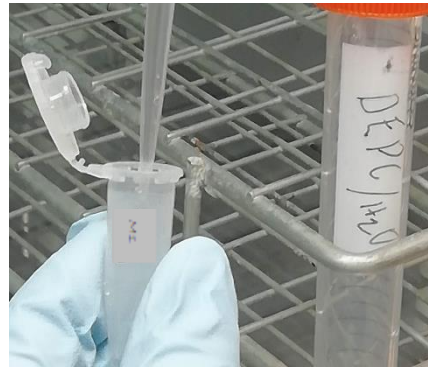


Fig.11 Reconstitución del ARN

C.- Extracción de ARN con TRIzol®

4.2.1. Agregar 0.75 mL de reactivo TRIzol® por 0.25 mL de la suspensión del paso 3 ($5-10 \times 10^6$ células, de 3 a 6 millones por cada 4 mL de sangre extraída). Pipetear el lisado hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogeneizar. Deje reposar durante 15 minutos.

4.2.2. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada mL de reactivo TRIzol® utilizado para lisis, luego tapar de forma segura el tubo y agitar, por inversión continua, durante 15 segundos.

4.2.3. Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 12,000 rpm a 4 °C. Se obtendrá una fase acuosa (superior incolora), lechosa (interfase, ADN) y orgánica (proteica)

4.2.4. Transferir la fase acuosa que contiene el ARN a un tubo nuevo, para ello inclinar el tubo a 45 °C y pipetear la solución hacia las paredes. (Fig. 12 y 13)

Nota: Evite transferir cualquiera de la capa interfásica u orgánica a la pipeta cuando retire la fase acuosa.



Fig. 12. Transferencia de la fase acuosa (incolora)

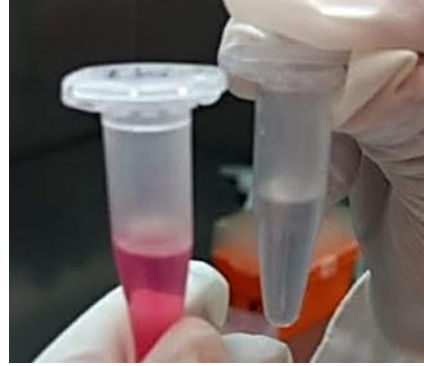


Fig. 13. Fase orgánica (tubo de la izquierda); fase acuosa (derecha).

4.2.5. Agregar 0.5 mL de isopropanol a la fase acuosa, invierta y deje reposar durante 10 minutos en hielo.

4.2.6. Centrifugar durante 15 minutos a 12,000 rpm a 4 ° C. El precipitado de ARN total forma un sedimento blanco similar al gel en el fondo del tubo. Desechar el sobrenadante.

4.2.7 Resuspender el sedimento en 1 mL de etanol frío al 75%. Agitar la muestra suavemente y centrifugar a 7500 rpm por 10 minutos a 4 ° C. Desechar el sobrenadante y dejar secar de 5 a 10 minutos.

4.2.8 Resuspender nuevamente en agua libre de RNAsas, en un volumen de 50 µL.

Resultados

Describir los cambios físicos que se presentan en cada uno de los pasos de la extracción y purificación de DNA.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la función de las RNAsas?
2. ¿De qué tipo de muestras se puede aislar el ARN? ¿Por qué?
3. ¿Cuáles son las ventajas de usar gradientes de densidad sintéticos como el Ficoll-Paque?
4. ¿Qué otros métodos de extracción existen?

5. ¿Para la precipitación del ARN que otras sustancias pueden emplearse?

Referencias

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Granum MAS, editor. New York: Garland Science; 2008.
2. Watson J D. *Molecular Biology of the Gene*. 17th ed. United States of America: Pearson Education; 2014.
3. Lehninger A, Nelson D. *Principios de Bioquímica*. 5a ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2009.
4. Karp G. *Biología Celular y Molecular, Conceptos y experimentos*. 3er ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2009.
5. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Mont. *Biología Celular y Molecular*. 5a ed. Colombia: Editorial Médica Panamericana; 2005.
6. Jiménez LF. *Biología Celular y Molecular*. 1a ed. Figueroa LG, editor. México: Pearson Educación; 2003.
7. Klug WS. *Principios de Genética*. 8a ed. Madrid: Pearson Education; 2006.
8. Lewin B. *Genes VIII*. 8th ed. Carlson G, editor. United States of America: Pearson Prentice Hall; 2004.
9. Farrell RE. *RNA Methodologies*. 5th ed. San Diego, CA: Academic Press, Elsevier; 2017.
11. Saeed El-Ashram., Ibrahim Al Nasr., Sun Xou. *Nucleic acid protocols: Extraction and optimization*. *Biotechnology Reports*. 2016 December; 12: 33-39.
12. Chomczynski P, Sacchi N. *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. *Nature protocols*. 2006;1(2):581-5.

CUANTIFICACIÓN DE ARN HUMANO

Objetivos

- ✓ Cuantificar el ARN de una muestra problema, por el método espectrofotométrico, utilizando un biofotómetro

Antecedentes académicos

- ✓ Características fisicoquímicas del ARN.
- ✓ Funcionamiento del equipo BioPhotometer

Introducción

La naturaleza dual de la luz es un fenómeno según el cual las partículas pueden comportarse como ondas y viceversa. La dilucidación del comportamiento de ésta se debe al trabajo de la comunidad científica a lo largo de los años. Y es gracias a estos aportes que puede comprenderse cómo las cargas eléctricas sometidas a aceleración producen campos eléctricos y magnéticos, siendo capaces de transportar energía en el espacio sin necesidad de un medio, pudiendo, por tanto, propagarse en el vacío. La propagación de dichos campos electromagnéticos, conocida como radiación electromagnética, se realiza como una oscilación perpendicular por lo tanto en ondas electromagnéticas transversales.

La luz visible es tan solo una parte de lo que se conoce como espectro electromagnético, que es el conjunto de todas las longitudes de onda de todas las radiaciones electromagnéticas y cuya clasificación obedece a un parámetro físico denominado longitud de onda.

La radiación electromagnética interacciona con la materia, el resultado de ello puede ser la desviación de las ondas electromagnéticas o su absorción parcial, transformándose en energía térmica o bien siendo reemitida con o sin cambio de longitud de onda.

En esta interacción las moléculas y átomos absorben un fotón (partícula portadora de todas las formas de radiación electromagnética) por lo que su energía interna aumenta, es decir pasa de un estado basal o fundamental a un estado de excitación (inestable). La radiación absorbida produce cambios en los enlaces intramoleculares y/o movimiento de los electrones alrededor del átomo. Esto es conocido como transiciones y pueden ser de tres tipos: rotacionales, vibracionales, electrónicas, así como una combinación de ellas, tal es el caso de la región UV y visible para los cuales la energía absorbida es mucho mayor y por ende se pueden tener las tres. Debido a la inestabilidad del estado excitado la molécula tiende a regresar a su estado inicial por lo cual libera la energía excedente en forma de calor o de radiación electromagnética nuevamente (emisión).

Moléculas orgánicas con electrones deslocalizados en sistemas aromáticos suelen absorber a 150-400 nm (ultravioleta) o en la región visible de 400-800 nm.

Las pirimidinas y purinas libres, presentes en el ARN, son moléculas aromáticas, una propiedad que influye en su estructura, distribución electrónica y capacidad para absorber la luz. La deslocalización de electrones en el anillo genera enlaces dobles parciales que conforma una ligera deformación en las bases. Estos electrones deslocalizados se pueden excitar al recibir energía en forma de luz ultravioleta. Es por ello que se dice que a 260 nanómetros las bases absorben luz UV. Lo que permite calcular la concentración a partir del coeficiente de extinción molar y la ecuación de Lambert-Beer.

Determinación de la concentración y calidad de ARN

La concentración y pureza de las muestras de ARN se determinan empleando luz ultravioleta, con un máximo de absorbancia a 260 nm. Las mediciones de absorbancia a esta longitud de onda permiten el cálculo directo de la concentración de ácido nucleico en una muestra:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g} / \text{mL} = A_{260} \times \text{dilución} \times 40$$

A_{260} : Absorbancia a 260 nm

Dilución: Factor de dilución

40: Coeficiente de extinción promedio de ARN (40 μg / OD 260).

Los cálculos basados en la absorbancia a 260 nm proporcionan poca información sobre la calidad y pureza de la muestra; en presencia de exceso de sal, proteínas contaminantes y / o solventes orgánicos remanentes, el valor de absorbancia puede ser sesgado significativamente. Por este motivo existe una serie de relaciones de absorbancia que proporcionan una estimación razonable de la pureza de la preparación:

| | | |
|---------------------|---------|---|
| A_{260} / A_{280} | 2.0 | Debajo de 1.8 sugiere contaminación proteica. |
| A_{260} / A_{230} | 2.0-2.4 | Debajo de 1.8 sugiere contaminación orgánica. |
| A_{260} / A_{240} | 1.4 | Debajo de 1.4 sugiere una cantidad excesiva de sal. |

Material y Equipo

- Equipo BioPhotometer®
- Celdas para espectrofotómetro
- Micropipetas p200, p1000.
- Puntas nuevas para micropipetas
- Agua libre de ARNasas (agua con DEPC, dietilpirocarbonato)
- Guantes estériles
- Gradilla
- Tubos cónicos 1.5 mL

Material Biológico

- Muestras de ARN humano

Método

5. Mezclar la muestra de ARN y realizar una dilución 1:50 (Fig.2), para ello colocar 4 microlitros de la solución original y adicionar 196 microlitros de solución libre de ARNasas.

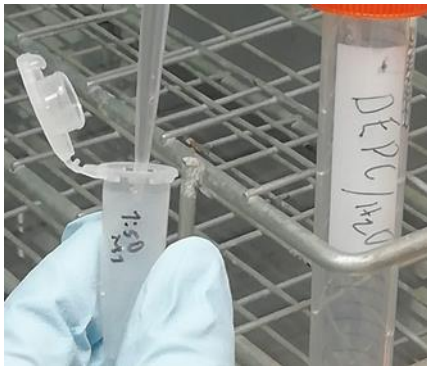


Fig.1 Dilución 1:50 de la muestra.



Fig.2. Biofotómetro Eppendorf®.

6. Encender el equipo (Fig. 2) del botón que se encuentra en la parte posterior y seleccionar la función No. 9 que permite medir la concentración de ARN y de su pureza.
7. Calibrar el Biofotómetro, ajustando el equipo a cero de absorbancia, para ello, tomar 50 μ L de agua libre de ARNasas y colocar en una celda del Biofotómetro. Situar la celda en el portacelda, presionar el botón "blank" (Fig 3) y observar en la pantalla los ceros (Fig. 4).

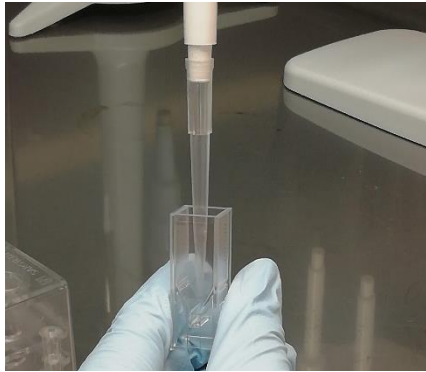


Fig.3. Colocación de la muestra en la celda.



Fig.4. Ajuste de absorbancia con el blanco de concentración.

8. Mezclar la muestra y colocar 50 μL en la celda (Fig. 5), insertar esta en el portacelda y oprimir el botón "Sample". Registrar todos los datos que aparecen en la pantalla (Fig.5).



Fig.5 Resultados de medición de una muestra de ARN.

Cuestionario

1. ¿Por qué otro método se puede cuantificar la concentración de ARN?
2. ¿Cuál es el significado de los índices 280/260 y 260/230?
3. ¿Qué importancia tiene esto?

Referencias

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Garland Science, editor. New York: Garland Science; 2008.
2. Lehninger A, Nelson D. *Principios de Bioquímica*. 5a ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2009.
3. Karp G. *Biología Celular y Molecular, Conceptos y experimentos*. 3er ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2009.
4. Lodish H, Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Mont. *Biología Celular y Molecular*. 5th ed. Colombia: Editorial Médica Panamericana; 2005.
5. Klug WS. *Principios de Genética*. 8th ed. Madrid: Pearson Education; 2006.
6. Farrell RE. *RNA Methodologies*. 5th ed. San Diego, CA: Academic Press, Elsevier; 2017.
7. Hernández L., González C. *Introducción al análisis instrumental*. España: Ariel; 2004.
8. Skoog, D. A., Holler, J. H., Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*. 5a Edición. España: Editorial McGraw Hill; 2001.
9. Saeed El-Ashram. *Nucleic acid protocols: Extraction and optimization*. *Biotechnology Reports*. 2016 December; 12.

Anexo 3: Práctica electroforesis de ARN.

ELECTROFORESIS DE ARN

Objetivos

- ✓ Realizar la electroforesis del ADN extraído, purificado y cuantificado.
- ✓ Analizar las bandas obtenidas en el gel.

Antecedentes académicos

- ✓ Fundamento de la electroforesis
- ✓ Moléculas que se pueden separar por electroforesis
- ✓ Medios de soporte para realizar la electroforesis
- ✓ Ejemplos de separación electroforética de ARN humano.

Introducción

Diversos estudios científicos requieren de una muestra de ARN íntegra, es por ello que el estado de esta debe verificarse antes de proceder con las aplicaciones prácticas de este debido a la vulnerabilidad de la molécula frente a las ARNasas que se encuentran en la muestra o en el entorno.

Los métodos electroforéticos además de servir como método de separación de mezclas complejas (proteínas, péptidos, azúcares, ácidos nucleicos, y los iones inorgánicos) aportan un criterio de integridad de las biomoléculas.

Como es sabido, la electroforesis es una metodología que permite la separación de moléculas y partículas, en solución, debido a la influencia de un campo eléctrico. Esta técnica es frecuentemente utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los soportes usuales en la separación de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa.

La separación del ARN se basa en el aprovechamiento de la carga negativa del esqueleto de fosfato de la biomolécula. De acuerdo con la concentración del gel, el rango de separación lineal variará. Se recomienda entre 1 y 1.2% para maximizar el poder de resolución del gel, así como su manejo, porque a esta concentración su consistencia no es frágil.

Anteriormente se ha hablado del ARN, sus características principales, los tipos y las funciones que cada uno de ellos tiene. En razón a esto se sabe que el ARN ribosomal (ARNr) es el más abundante en la célula y que está asociado a proteínas específicas, forma parte de los ribosomas.

Los ribosomas constan de dos componentes principales; las subunidades grandes y pequeñas. La mayor de los dos se conoce como la subunidad 60S y el más pequeño se conoce como la subunidad 40S.

En la extracción de ARN, las 80 proteínas ribosómicas se eliminan de los ARNr que, a su vez, se purifican juntamente con las otras especies de ARN celular. La eliminación de las proteínas de las subunidades 60S y 40S produce los ARNr 28S y 18S, respectivamente. Los ARNr 5S y 5.8S, mucho más pequeños, también componentes integrales de los ribosomas eucarióticos se liberan de los ribosomas intactos al eliminar la proteína.²²

Los ARNr altamente abundantes pueden ser muy útiles como controles internos a causa de su capacidad de actuar como marcadores de peso molecular, indicar la integridad de la muestra mediante inspección visual y proporcionar evidencia de que se ha cargado una masa equivalente de ARN total en cada pozo.

Material y Equipo

- Cámara de electroforesis
- Micropipetas p20, p200 y p1000 μL
- Puntas nuevas para micropipetas
- Fuente de poder
- Papel cera
- Transiluminador
- Matraz Erlenmeyer de 125 mL
- Probeta de 1000 mL
- Frasco de 1 Litro para TBE
- Tubos cónicos de 0.5 mL

Reactivos

- Amortiguador TBE 10X
- Bromuro de Etidio, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Promega®
- Buffer de carga 5X Promega®
- Marcador de peso molecular Promega®
- Agarosa grado biología molecular

1. En una probeta medir 100 mL de TBE 10X y diluir en 900 mL agua con dietilpircarbonato (DEPC). Agitar y conservar para su posterior uso.
2. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL pesar 1g de agarosa y adicionar 100 mL de la solución del paso anterior, agitar hasta disolver.
3. Calentar la solución con el fin de disolver por completo la agarosa en el microondas durante aproximadamente un minuto y medio o

calentar en placa de calentamiento, con agitación, hasta que se observe transparente.

4. Enfriar mínimo a 60 °C y agregar 5 μ L de Bromuro de etidio, agitar hasta que la solución tome un color café claro uniforme, y verter en el soporte del gel y colocar el peine de electroforesis (Fig.).
5. Dejar que solidifique el gel, al menos 25 minutos. Mientras tanto, preparar las muestras.
6. Con base en la concentración de las muestras, calcular la cantidad en mL que contenga 5 μ g de ARN.

Nota: El volumen máximo de muestra pura que se puede colocar en el pozo es de 28 μ L.

7. En tubos cónicos de 0.5 mL, identificados previamente, colocar la cantidad calculada de acuerdo con el punto 6. Por cada 5 μ L de muestra, adicionar 1 μ L de búfer de carga 5X Promega®(Fig. 1).
8. En un tubo identificado correctamente, adicionar 1 μ L del búfer para marcador de peso molecular y 3 μ L del marcador, homogeneizar.

Nota: Si es necesario, centrifugar (spin) los tubos durante 2 a 3 s para recoger toda la muestra en la parte inferior del tubo.

9. Desmontar el soporte para gel y colocar este último dentro de la cámara para electroforesis en la posición adecuada llenar la misma poco antes de la marca **Máximo**, con el búfer 1% del punto 1
10. Designar números a los pozos y poner las muestras identificadas. Dejar un pozo entre la última muestra y el marcador de peso molecular. Guardar el registro.



Fig. 1. Buffer de carga 5X.

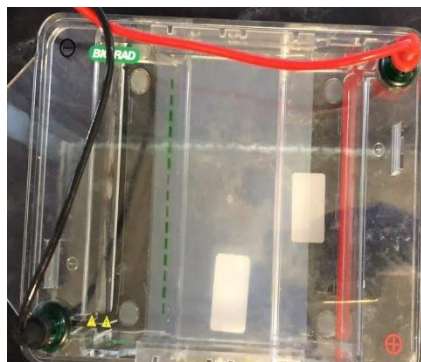


Fig. 2. Sistema de electroforesis de ARN humano

11. Colocar la tapa de la cámara, conectar los electrodos de acuerdo con el código de colores, rojo-rojo y negro-negro. (Fig. 3)
12. Encender la fuente de poder, seleccionar 75 V. Conectar los electrodos a la fuente de poder e iniciar el corrimiento electroforético durante 50 minutos. (Fig. 4)

Nota: Es importante respetar el tiempo de corrimiento, el colorante de rastreo (amarillo) debe recorrer máximo el 75% de la longitud del gel.

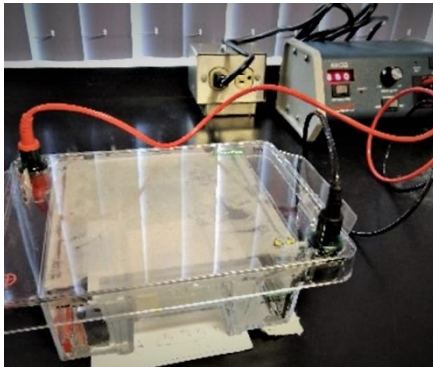


Fig. 3. Corrimiento de gel de electroforesis de ARN

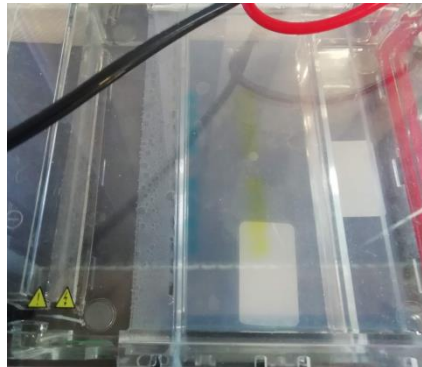


Fig. 4. Colorantes del buffer de carga.

13. Detener el corrimiento: Apagar la fuente de poder y después retirar la tapa de la cámara. Retirar el soporte con el gel, procurar retirar en este momento el exceso de búfer (TBE). Colocar sobre una superficie adsorbente.
14. Conectar el transiluminador FastGene® LED Illuminator. A continuación, transferir el gel a este. (Fig.5) Encender el transiluminador y visualizar el gel. (Fig. 6)

Nota: Realizar la transferencia del gel con cuidado para evitar que este se dañe.

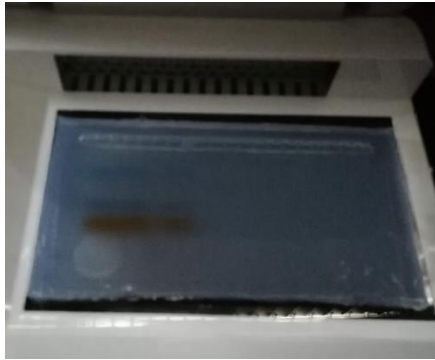


Fig. 5. Colocación del gel de electroforesis en el transiluminador FastGene®

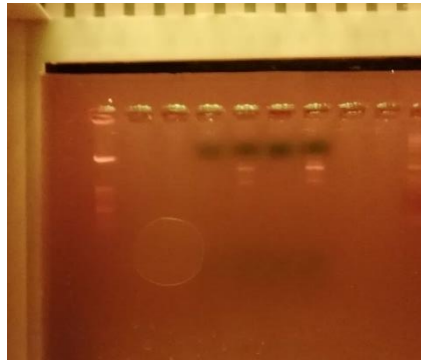


Fig. 6. Al centro, bandas de ARN ribosomal: subunidades 28s y 18s. A los costados marcadores de peso molecular

Resultados

- ✓ Obtener una imagen de la electroforesis de las muestras de ARN.
- ✓ Comparar las bandas de cada carril y establecer que es cada banda.
- ✓ Realizar un análisis de resultados.

Cuestionario

1. ¿Qué otros polímeros se usan para preparar geles de electroforesis de ácidos nucleicos? ¿Por qué?
2. ¿Cuál es la función de cada componente del TBE?
3. ¿Qué otra sustancia puede usarse en sustitución de este?
4. Mencione tres desnaturizantes usuales en la electroforesis de ARN
5. Mencione otras sustancias que se usen en la tinción de geles de agarosa.

Referencias

1. Farrell RE. *RNA Methodologies*. 5th ed. San Diego, CA: Academic Press, Elsevier; 2017.
2. Koontz, L. *Chapter Four - Agarose Gel Electrophoresis. Methods in Enzymology*. Volume 529. USA: Elsevier Inc. ;2013. 35-45.
3. Pestov, D.G. Mansour, F. H. *Separation of long RNA by agarose–formaldehyde gel electrophoresis*. *Anal Biochem*. 2013; 444(1): 18-20.
4. Aranda, PS, LaJoie, DM, Jorcyk, CL. *Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis*. 2012;33(2):366-9.
5. Qiang L., Xuemin L.,Sommer S. *pK-Matched Running Buffers for Gel Electrophoresis*.*Anal Biochem*. 1999.270(1).112-122.