

MODIFICACIONES AL MÉTODO DE "UN SOLO PASO" PARA LA OBTENCIÓN DE ARN DE CÉLULAS Y TEJIDOS ANIMALES

Norma de Sambuccetti y Myriam Sánchez de Gómez.

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

Keywords: RNA; mRNA; hypophysis; thymus; rat; growth hormone.

RESUMEN

Se describen las modificaciones introducidas al método de "un solo paso" y su aplicación para aislar ARN de hipófisis humana y de rata, como también de cultivos de linfocitos T de timo de rata, con recuperaciones comparables a las del método clásico de ultracentrifugación. El método modificado aquí descrito, es simple, de fácil aplicación y apropiado para establecer niveles de ácido ribonucleico mensajero.

ABSTRACT

The modifications introduced to the "single-step" method are described. The utilization in the isolation of RNA from human and rat hypophysis and rat thymus T-lymphocytes cultures is discussed. The RNA yields were similar to those obtained by the classic ultracentrifugation method. The present method is simple, easy and suitable to establish mRNA levels.

INTRODUCCIÓN

Para comprender los aspectos que regulan la expresión genética se requiere conocer la estructura y cantidad de ARN producido por un gen en particular. El ARN aislado intacto y en forma pura, permite obtener ARN mensajero para ser empleado en análisis de transferencia (Northern blot) y en transcripción reversa seguida de reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR). Con este objetivo se han desarrollado varios procedimientos

que aunque confiables, en su mayoría involucran la ultracentrifugación (1). El método de "Un solo Paso" originalmente descrito por Chomczynski y Sacchi (2) permite aislar ARN de manera más simple y rápida, aunque se le atribuyen dificultades en la recuperación. En este trabajo se describen las modificaciones introducidas a dicho método y su aplicación en la extracción de ARN total y ARN mensajero de hipófisis humana y de rata, como también de cultivos de linfocitos T aislados de timo de rata. Los resultados obtenidos resultaron comparablemente iguales a los hallados utilizando el método clásico de ultracentrifugación en gradiente de CsCl.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas generales utilizadas.

Todo el material de vidrio, plástico, soportes cromatográficos, agua y reactivos empleados se trataron durante 12 hrs con DEPC (dietilpircarbonato) al 0,1% y luego se esterilizaron (3). Las operaciones que requerían condiciones estériles se realizaron en cabina de flujo laminar horizontal. Los espectros de ultravioleta se tomaron en un espectrofotómetro Hewlett-Packard Diode Array 8451 A. Las homogenizaciones se realizaron en un homogenizador Erbertash Corporation, en tubos de 4 ml.

Material de experimentación.

a) **Hipófisis humanas.**- Se procesaron glándulas obtenidas en autopsias efectuadas en el Instituto de Medicina Legal, Sección de Patología en Santa Fe de Bogotá. El donante, sin importar sexo ni edad, no debía haber presentado cuadro clínico de enfermedades infectocontagiosas y tener como máximo seis horas de fallecido.

b) **Hipófisis de rata.**- Se extrajeron de ochenta ratas macho Fisher 344 de peso ca. 250 g, siguiendo la metodología previamente descrita (4).

c) **Obtención de linfocitos T.**- Del timo de rata (macho, ocho semanas) se obtuvieron linfocitos por gradiente en Ficoll-Paque (5). La interfase que contenía los linfocitos se lavó con buffer Hepes (0,01 M), se suspendió en medio de cultivo RPMI 1640 y se incubó a 37°C por una hora en cajas de poliestireno con el fin de separar los linfocitos T de las células adherentes (linfocitos B).

d) **Cultivo de Linfocitos.**- La población de células T (1×10^7 , pureza 97 %) se cultivó en medio RPMI 1640 durante 144 horas a 37°C en atmósfera normal y en presencia de fitohemaglutinina (PHA) (5,0 µg/ml), Penici-

lina (100 U/ml), Estreptomycin (100 µg/ml) y suero fetal bovino al 10%. El recuento de células se hizo en una cámara de Newbauer y la viabilidad establecida mediante el método de exclusión con Tripán Azul fue siempre superior a 95% (5).

Extracción de ácido ribonucleico.

Se empleó el método de Chomczynski y Sacchi (2) con las siguientes modificaciones. Las hipófisis (0,10 g) o las células T (10⁷) se homogenizaron en 1 ml de solución D1 (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sodio 25 mM pH 7,0; sarcosil 0,25 % y β-mercaptoetanol 0,1 M). El homogenizado se mezcló con acetato de sodio 2 M, pH 4 (0,1 ml) agregando a continuación solución saturada de fenol en agua (1 ml) y la mezcla extractora cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) (0,4 ml). Se mezcló por inversión y se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 4°C. El ARN solubilizado en la fase acuosa se precipitó con isopropanol, se redisolvió en solución D1 (1,5 ml) y se reprecipitó con el mismo alcohol. Se lavó con etanol al 75% (2 x 0,1 ml), se dejó secar en corriente de aire estéril y una vez seco se disolvió en agua DEPC. La concentración se determinó mediante lectura de absorbancia a 260nm y la pureza por la relación de absorbancias a 260/280 nm. Con el fin de hacer una comparación con el método de extracción de ARN utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad, se extrajo una muestra de hipófisis de rata de acuerdo con las condiciones establecidas en un trabajo previo (6).

Purificación de ácido ribonucleico mensajero.

La separación de ARN mensajero se hizo por cromatografía de afinidad sobre Oligo (dT) Celulosa (Pharmacia, Tipo 7) (3), en buffer Tris 0,1 M, pH 7,5 conteniendo EDTA 0,05 M y NaCl 0,5 M. La desorción del ARN poli (A) + se hizo con en mismo buffer sin NaCl. La pureza y recuperación del ARN mensajero se evaluó como se indicó previamente para el ARN total.

Detección y cuantificación de hormona de crecimiento de rata (rGH).

La síntesis *in vitro* de rGH por parte de los linfocitos(7) y su secreción al medio de cultivo, se evaluó mediante radioinmunoanálisis (RIA) específico (8). Los reactivos fueron obtenidos del National Hormone and Pituitary Program (NIDDK), Bethesda, MD, USA. Como segundo antisuero se empleó anti-IgG de mico en conejo obtenido en un trabajo previo (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de ácido ribonucleico total.

La mayor dificultad que presenta el método original de "un solo paso" es la separación de las fases fenol-agua, pues aún después de la centrifugación, persiste la emulsión en la interfase, donde la definición de las dos capas es difusa, lo que dificulta la separación y ocasiona bajos porcentajes de recuperación. Para romper la emulsión formada, se optó por modificar la constante dieléctrica de la disolución variando la proporción de detergente en el buffer de homogenización para lo cual se redujo la concentración de sarcosil en un 50% y se incrementó en 100% el volumen de la mezcla de solventes cloroformo-alcohol *iso*-amílico.

Tabla 1. Comparación de los métodos de extracción de ARN total de hipófisis de rata.

	Ultracentrifugación ¹	Un Solo Paso ¹
Peso Muestra (mg)	256,00	81,20
Tiempo Proceso (h)	15,00	3,00
A 260/280	2,00	1,96
ARN total (µg)	133,9 ± 10,1	42,4 ± 5,3
ARN/g Tejido(µg/g)	523,00	522,00

¹Los valores son el promedio de 3 determinaciones.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos finalmente en el aislamiento del ARN total a partir de hipófisis de rata, usando el método de ultracentrifugación y el de "un solo paso" con las modificaciones discutidas. Como se observa, las recuperaciones conseguidas (ARN/g de tejido) y la pureza del producto final (A 260/280) son comparativamente iguales lo que indica la reproducibilidad del método y que el ARN aislado está libre de ADN, de ribonucleasas activas y de otras proteínas. Adicionalmente, el método descrito requiere de menos cantidad de muestra y menor tiempo de ejecución, siendo por ello muy útil cuando hay múltiples muestras o cuando la cantidad disponible de la misma es un factor limitante, como se puede constatar con los resultados de los experimentos realizados con los tejidos y cultivos de linfocitos en presencia de fitohemaglutinina como agente mitogénico (ver tabla 2).

Obtención de ácido ribonucleico mensajero.

En la figura 1 se muestra un cromatograma típico de la separación de ARN mensajero por medio de cromatografía de afinidad con oligo(dT)celulosa. La elución de la fracción retenida se logró disminuyendo la fuerza iónica del buffer (de 0,5 M a 0 M de NaCl). En la tabla 2 se indican los resultados encontrados para los tejidos y las células cultivadas.

Como se puede deducir de la tabla 2, los valores de poli (A)⁺ obtenidos son comparativamente altos, si se tiene en cuenta que normalmente las recuperaciones esperadas son del 1% (3). Lo anterior confirma que las condiciones aquí empleadas permitieron obtener un ácido ribonucleico libre de ribonucleasas. Por otro lado, el método modificado de "un solo paso" resultó adecuado en la definición de las mejores condiciones para estimular la síntesis *in vitro* de hormona de crecimiento (rGH) por los

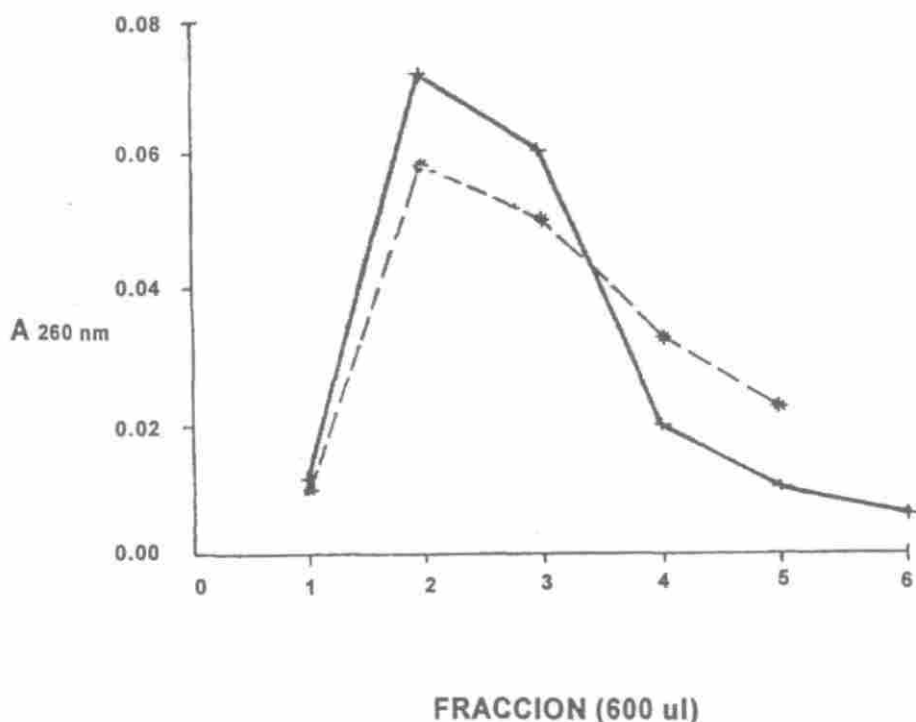


Figura 1. Cromatografía de afinidad sobre oligo(dT)celulosa para separar el ARN mensajero: De hipófisis humana (trazado discontinuo) y de rata (trazado continuo). Se muestra la separación de la fracción retenida que corresponde a la forma Poli(A)⁺.

Tabla 2. Recuperación de ARN total y mensajero en tejidos y células animales por el método modificado de "Un solo Paso".

MATERIAL	ARN Total (μg)	ARN mensajero (μg)	(%)	r G H (ng)
1. Tejido				
Hipófisis humana ¹	91,2 \pm 3,7	4,0 \pm 0,2	4,4	
Hipófisis de rata ²	42,4 \pm 5,3	3,7 \pm 0,5	8,7	
2. Células animales ³				
Linfocitos (t=0 h)	37,2 \pm 1,5	1,4 \pm 0,1	3,8	
Linfocitos (t=144 h.)	297,3 \pm 10,1	9,5 \pm 1,7	3,2	67,8 \pm 3,7

¹ Promedio de 10 determinaciones \pm Desviación estándar

² Promedio de 3 determinaciones \pm Desviación estándar.

³ Promedio de 10 determinaciones \pm Desviación estándar.

10⁷ células iniciales con 5,0 μg PHA.

cultivos linfocitarios de rata estimulados con cantidades variables del mitógeno fitohemaglutinina, lográndose procesar varias muestras en un período de tiempo relativamente corto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al International Program in the Chemical Sciences, Uppsala University (IPICS) Suecia; a COLCIENCIAS y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por la ayuda económica recibida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chirwing, J.; Przybyla, A.; McDonald, H.; Rutter W. *Biochemistry* 1979, 18, 5274.
2. Chomczynski, P.; Sacchi, N. *Anal. Biochem.*, 1987, 162, 156.
3. Maniatis, T.; Fritsch, F.; Sambrook, J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2nd.Ed., 1989, pags.

4. Sánchez de Gómez, M.; López de Sambuccetti, N.; del Real, O; Bermúdez, A. *Rev. Col. Quim.* 1993, 22 (2), 63.
5. Klauss, G. G., *Lymphocytes. A practical approach*. IRL PRESS, Oxford, 1987, pags. 1-54.
6. Duica, L. E., *Obtención del RNA Mensajero de Hormona de Crecimiento a partir de hipófisis de rata*. Tesis de Grado. Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. 1992
7. Weigent, D; Blalock, E. *Cell. Immunol.*, 1991, 135, 55.
8. Gantiva, M., *Obtención del RNA a partir de Linfocitos de timo de Rata, Evaluación de cultivos linfocitarios y detección de rGH*. Tesis de Grado. Farmacia. Universidad Nacional de Colombia, 1994.
9. Mejía, W. *Cambios bioquímicos en el receptor de hormona de crecimiento de rata en condiciones de restricción proteica-calórica*. Tesis de Magister en Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia, 1994.