

USO ALTERNATIVO DEL COLORANTE GELRED EN LA TINCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PAULA TATIANA URIBE ECHEVERRY, MSc*, JHON CAMILO HERRERA CAÑÓN**,
NÉSTOR JAVIER OROZCO CLAVIJO**, JHON FREDY BETANCUR PÉREZ, PhD***

Recibido para publicación: 19-02-2013 - Versión corregida: 23-09-2013 - Aprobado para publicación: 14-11-2013

Resumen

Objetivo: Determinar la reproducibilidad en la tinción del ADN en geles de agarosa mediante el colorante GelRed™ con el fin de reemplazar el uso del bromuro de etidio en la tinción de ácidos nucleicos. **Materiales y Métodos:** Se realizó extracción de ADN total de sangre periférica a nueve muestras de pacientes con cáncer colorrectal, posteriormente se amplificó un fragmento de ADN de 494 pb asociado al exón 15 del gen APC y de seis fragmentos entre 150 pb y 350 pb asociados a los genes hMLH-1 y MSH-2; ambas preparaciones, ADN total y ADN amplificado fueron visualizadas mediante el uso del colorante GelRed y Bromuro de Etidio. **Resultados:** El uso del colorante GelRed para la tinción de ácidos nucleicos (ADN) permitió visualizarlos de forma eficiente. **Conclusión:** El reactivo GelRed es altamente reproducible y se recomienda usarlo incluido en las muestras de ADN, para disminuir la contaminación en los laboratorios de biología molecular.

Palabras Clave: Electroforesis en gel de agarosa, Bromuro de Etidio, colorante

Alternative use of Gelred dye in the staining nucleic acids

Summary

Objetive: Determine the reproducibility of DNA staining in agarose gels using the dye GelRed™ in order to replace ethidium bromide in the use of nucleic acids staining. **Materials and Methods:** The extraction of the total DNA from nine samples and the amplified DNA fragment of 494 pb of exon 15 associated with the APC gene from six

Referencia Vancouver:

Uribe-Echeverry PT, Herrera-Cañón JC, Orozco-Clavijo NJ, Betancur-Pérez JF. Uso alternativo del colorante Gelred en la tinción de ácidos nucleicos. Arch Med (Manizales) 2013; 13(2):160-66.

Referencia Redalyc:

Paula Tatiana Uribe Echeverry, Jhon Camilo Herrera Cañón, Néstor Javier Orozco Clavijo, Jhon Fredy Betancur Pérez. Archivos de Medicina (Manizales). Volumen 13 N° 2. Julio-Diciembre 2013. ISSN versión impresa 1657-320X. ISSN versión en línea 2339-3874. Universidad de Manizales. Manizales (Colombia).

* Profesor Asistente. Facultad de ciencias de la salud. Universidad de Manizales. Correo: puribe@umanizales.edu.co

** Estudiante Sexto Semestre. Programa de medicina. Universidad de Manizales.

*** Docente Facultad Ciencias de la Salud. Universidad de Manizales. Correo: jbetancur@umanizales.edu.co

fragments between 150 pb – 350 pb associated with the hMLH-1 and MSH-2 genes was performed. Both preparations, total DNA and amplified DNA were visualized using GelRed and Ethidium bromide dye. Results: Both systems of coloration gave very similar results; the DNA can be visualized correctly without any difficulty. Conclusion: The GelRed dye is highly reproducible and its use is recommended including in DNA samples, thus reducing the contamination with dyes such as ethidium bromide.

Keywords: Electrophoresis agarose gel, bromide ethidium, dyes.

Introducción

Para hablar de los comienzos del trabajo en el laboratorio nos tendríamos que remitir casi que inmediatamente a los tiempos de la alquimia, en los cuales los alquimistas eran considerados popularmente como una clase de charlatanes que intentaban convertir plomo en oro, pero que la mayor parte de su tiempo lo invertían en la elaboración de “remedios milagrosos, pociones mágicas y venenos”^{1,2}. Sin embargo lo que nos importa traer a la memoria es que las normas de bioseguridad eran mínimas en esta época y que, seguramente causaron muchas muertes aún no documentadas. Ya remontándonos a una época más reciente, existe un evento como respaldo a la falta de cuidado en los laboratorios relacionado con la prematura muerte de Marie Curie, debido a una anemia aplásica generada por la radiactividad permanente en su lugar de trabajo^{3,4}. Hoy en día el avance en bioseguridad es importante, aunque todavía falta bastante ya que cada día la normativa con relación a la bioseguridad se hace más exigente debido a la protección de la salud y el medio ambiente.

Por otro lado, durante los últimos años el avance tecnológico que se ha realizado en el campo de la biología molecular es más que sorprendente y seguramente el análisis del ADN es el que más resultados y conclusiones ha generado, una de las técnicas empleadas que más ha contribuido en estos estudios es la electroforesis, cuya función es que las moléculas cargadas como los ácidos nucleicos migren cuando se colocan en un campo eléctrico⁵ y con la ayuda de un marcador molecular se pueda medir el tamaño del fragmento; para esto es indispensable

la tinción del ADN a través de compuestos que se utilizan para tal fin, uno de ellos y el de más amplio uso a nivel mundial por la calidad en la visualización es el Bromuro de Etidio (EtBr)⁵. Sin embargo este colorante presenta desventajas debido a que su efecto mutagénico complica el manejo y disposición de los residuos contaminantes, representando así un alto riesgo para las personas que están expuestas diariamente en los laboratorios de biología molecular⁶. Sin embargo, hace poco tiempo se ha extendido el uso del reactivo GelRedTM para la visualización de ácidos nucleicos en electroforesis en geles de agarosa, el cual de acuerdo a las pruebas realizadas en líneas celulares por el fabricante no posee actividad mutagénica ni riesgo de contaminación ambiental.

Es por lo anterior que el objetivo de este trabajo fue determinar la reproducibilidad en la tinción del ADN en geles de agarosa con el colorante GelRedTM con el fin de reemplazar el uso del bromuro de etidio en la tinción de ácidos nucleicos y así disminuir los niveles de contaminación generados en los laboratorios de biología molecular.

Materiales y métodos

Recolección de muestras: Se tomaron muestras de sangre a nueve pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal (CCR), previo consentimiento informado.

Extracción de ADN: Para la extracción de ADN se tomaron 100 µl de sangre y se empleó el kit UltraClean® Blood DNA Isolation (MO BIO laboratories, Inc), siguiendo la

metodología descrita por el fabricante. Para determinar la calidad y concentración del ADN total se corrieron dos geles de agarosa al 1% p/v teñidos con bromuro de etidio y GelRed™ respectivamente. Una vez determinada la concentración y calidad del material genético se almacenó a -20°C.

Ensayo de amplificación del ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):

Para verificar la eficiencia de tinción del reactivo GelRed en productos de PCR, se realizó la amplificación de un fragmento de 494 pb (pares de bases) del exón 15 del gen APC (Adenomatous Polyposis Coli), la amplificación de cinco fragmentos entre 150 pb y 350 pb correspondientes a los exones 8, 9, 13, 16 y 19 del gen hMLH1 y un fragmento de 300 pb correspondiente al exón 3 del gen MSH-2 a muestras seleccionadas al azar de pacientes diagnosticados con CCR. La reacción de amplificación se realizó en el termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cycler (Labnet), empleando condiciones previamente reportadas por Wang *et al.* 2004 y Weber *et al.* 1997^{7,8}. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó en dos geles de agarosa al 1% p/v teñidos con bromuro de etidio y GelRed™ respectivamente.

Preparación del reactivo GelRed y visualización de muestras de ADN: Para la preparación se adicionaron 3 µl de GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X; Biotium) a 997 µl de buffer de carga (60% glicerol, 0,05% de azul de bromofenol) obteniéndose un concentración final de 30X de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Una vez preparado el buffer de carga con el reactivo GelRed se prepararon dos geles de agarosa al 1% (p/v), teñidos con bromuro de etidio (5ng/ul)⁵ y con el reactivo GelRed™ respectivamente, este último se adicionó a cada muestra de ADN total y a cada producto de PCR en una proporción 1:1 v/v (GelRed buffer de carga: ADN); finalmente, los geles fueron visualizados en el transiluminador de luz ultravioleta High Performance Ultraviolet Transilluminator (UVP).

Resultados

El ADN fue extraído a nueve muestras de sangre periférica obtenida de pacientes diagnosticados con CCR; para conocer la calidad y concentración del material genético extraído se realizaron dos electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v. Primero se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio a una concentración de 5ng/ul (Figura 1A), pues, de acuerdo a un estudio realizado por Chirsten *et al* en 1989 donde evaluaron las concentraciones mínimas de visualización de ácidos nucleicos con bromuro de etidio demostraron que este colorante permite una detección cuantitativa de ADN a concentraciones muy bajas (0,015-0,3 ng)⁹.

Posteriormente se realizó la tinción del gel con GelRed™ (Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X; Biotium) (Figura 1B) a una concentración de 30X de acuerdo a lo reportado por el fabricante. Se observó que los dos colorantes empleados para la tinción de ácidos nucleicos en geles de agarosa permitieron una adecuada visualización del ADN total para verificar su concentración.

Posteriormente, se realizó una amplificación por PCR de un fragmento 494pb asociado al gen APC (Figura 2A Y 2B) y seis fragmentos entre 150 pb y 300 pb asociados a los genes reparadores del ADN hMLH1 y MSH2 (Figura 3A y 3B) para confirmar la eficiencia del colorante GelRed™ en la visualización de fragmentos de ADN de diferente tamaño. Los productos amplificados se corrieron en electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos con EtBr y GelRed™ en las mismas condiciones empleadas para la visualización del ADN total.

Al observar los geles de agarosa de las figuras 2A y 2B se confirmó que el método de tinción con el colorante GelRed™ es eficiente además de no observarse diferencias significativas en la visualización de los fragmentos de 494pb asociado al exón 15

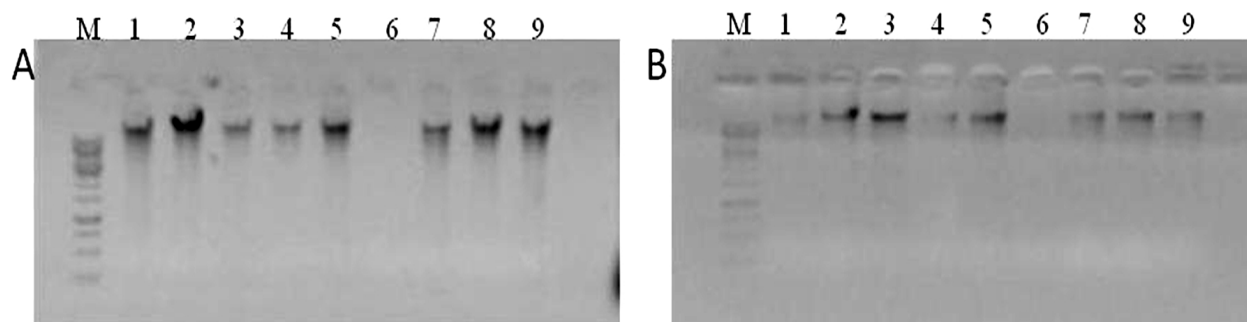


Figura 1. Gel de agarosa al 1% A. Teñido con el colorante Bromuro de Etidio. B. Teñido con el colorante GelRed™, M. Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas). 1-9 muestras de ADN total.

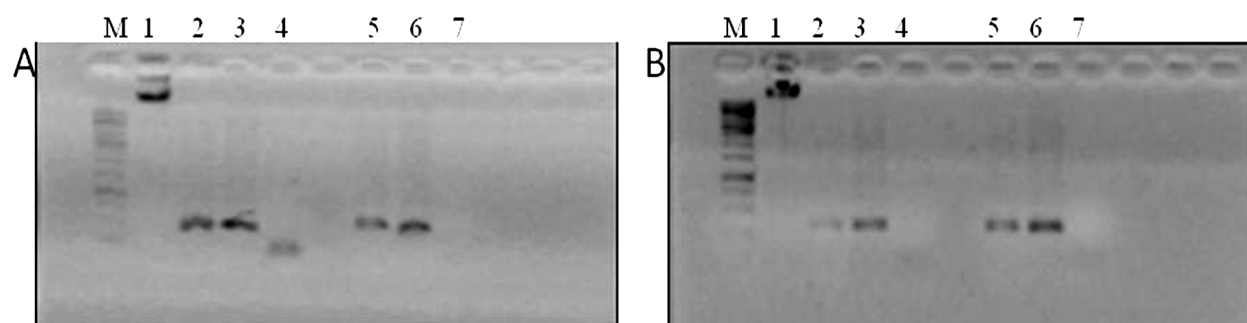


Figura 2. Gel de agarosa al 1% A. teñido con el colorante GelRed B. teñido con el colorante Bromuro de Etidio, M. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Fermentas), 1. ADN Total. 2-3, 5-6. Fragmento amplificado de ADN de 494pb asociado al gen APC exón 15. 4,7. Control de reacción del producto de PCR.

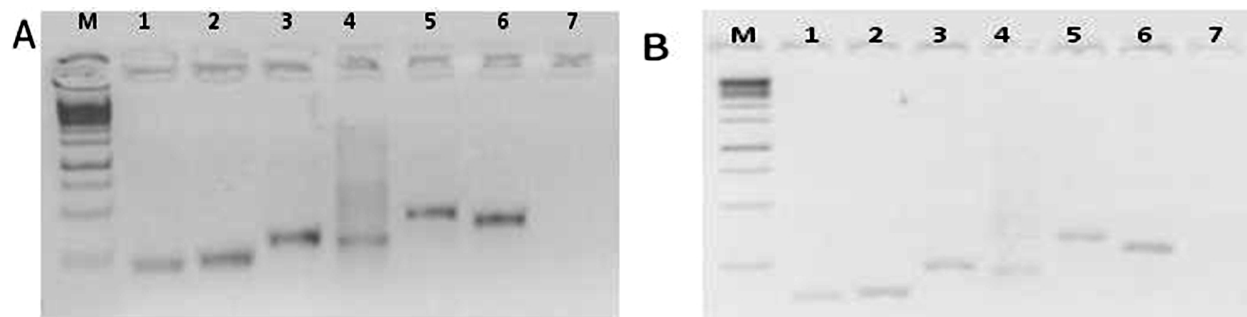


Figura 3. Gel de agarosa al 1% A. Teñido con el colorante GelRed™ B. Teñido con el colorante bromuro de etidio. M. Marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder (Fermentas) 1-2 Fragmentos de 150 pb aprox. asociados al gen hMLH, 3,4 Fragmento de 250 pb aprox. asociado al gen hMLH1 5. Fragmento de 300 pb aprox asociado al gen MSH2, 6. Fragmento de 250 pb aprox. del gen asociado a MSH2 7. Control de reacción del producto de PCR.

del gen APC en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Finalmente, se pudo determinar que al realizar una electroforesis en geles de agarosa para fragmentos de diferente tamaño asociados a los genes

reparadores del ADN ambas técnicas de tinción permitieron visualizar y diferenciar correctamente el tamaño de cada uno de los fragmentos (Figura 3A y 3B)

Discusión

La electroforesis en gel (agarosa o poliacrilamida) es un método de rutina empleado en los laboratorios de biología molecular que permite separar biomoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica bajo la influencia de un campo eléctrico. Actualmente, existe una amplia variedad de moléculas que se unen a los ácidos nucleicos corridos en un gel de agarosa o poliacrilamida que permiten su visualización^{10,11}. El bromuro de etidio (EtBr) es una molécula que se intercala en la doble hélice del ADN cambiando su conformación, es la más empleada para la visualización de material genético ya que al incidir luz ultravioleta sobre el gel las moléculas de EtBr emiten fluorescencia^{5, 12-14}. A pesar de ser el método más eficiente en la visualización de ácidos nucleicos, el EtBr genera efectos adversos para la salud ante la exposición así: al ser inhalado puede irritar las vías respiratorias; al ser ingerido generar alta toxicidad en el organismo; en contacto con la piel, puede irritarla provocando inflamaciones e incluso despigmentación del tejido; en contacto con los globos oculares los puede irritar, generando dolor y enrojecimiento. Varios autores han reportado los efectos tóxicos del bromuro de etidio en diferentes tipos de células demostrando que, al ser un agente intercalante tiene propiedades mutagénicas a concentraciones muy bajas (hasta 0.01 µg/ml) por lo que se deben extremar las precauciones en su manipulación y realizar una gestión adecuada de los residuos generados^{9, 12,15-17}. Debido a estos reportes de genotoxicidad, se han desarrollado varios colorantes que permiten visualizar ácidos nucleicos en geles de agarosa, entre los que se encuentran SYBR Green I y SYBR Gold para ADN y para SYBRGreen II para ARN, y cuyos efectos genotóxicos han sido evaluados realizando ensayos de mutaciones en bacterias y posteriormente comparando los resultados con la toxicidad generada por el bromuro de etidio, demostrando que, SYBR

Green I presenta bajo nivel de mutagenicidad y toxicidad en comparación con el bromuro de etidio, SYBR Green II y SYBR Gold no presentan efecto mutagénico pero poseen un bajo nivel de toxicidad¹⁸⁻²⁰, a pesar de las ventajas ofrecidas por estos reactivos, las pruebas demostraron que no pueden ser adicionados directamente al gel y al visualizar con luz ultra violeta se observan las bandas distorsionadas⁷.

En este trabajo se evaluó la eficiencia del colorante GelRed™ para visualizar ácidos nucleicos en electroforesis en geles de agarosa ya que su uso se ha venido reportando en diferentes estudios a nivel mundial como un reemplazo del bromuro de etidio²¹⁻²⁴, ya que el GelRed™ no genera alteraciones en la salud de las personas que lo manipulan a la vez que reduce la contaminación en el laboratorio y en consecuencia en el ambiente, ya que los análisis de toxicidad y mutagénesis realizados en líneas celulares por el fabricante del reactivo permitieron establecer que GelRed™ es incapaz de atravesar estructuras celulares lo que permite la reducción de genotoxicidad mientras que el bromuro de etidio se intercala en el ADN y penetra la célula. Además se demostró que el colorante GelRed™ es muy estable en agua a temperatura ambiente para almacenamiento a largo plazo y frente a las condiciones del entorno, es resistente a altas temperaturas, características de gran interés en el proceso de calentamiento de la agarosa para la elaboración de geles^{25,26}.

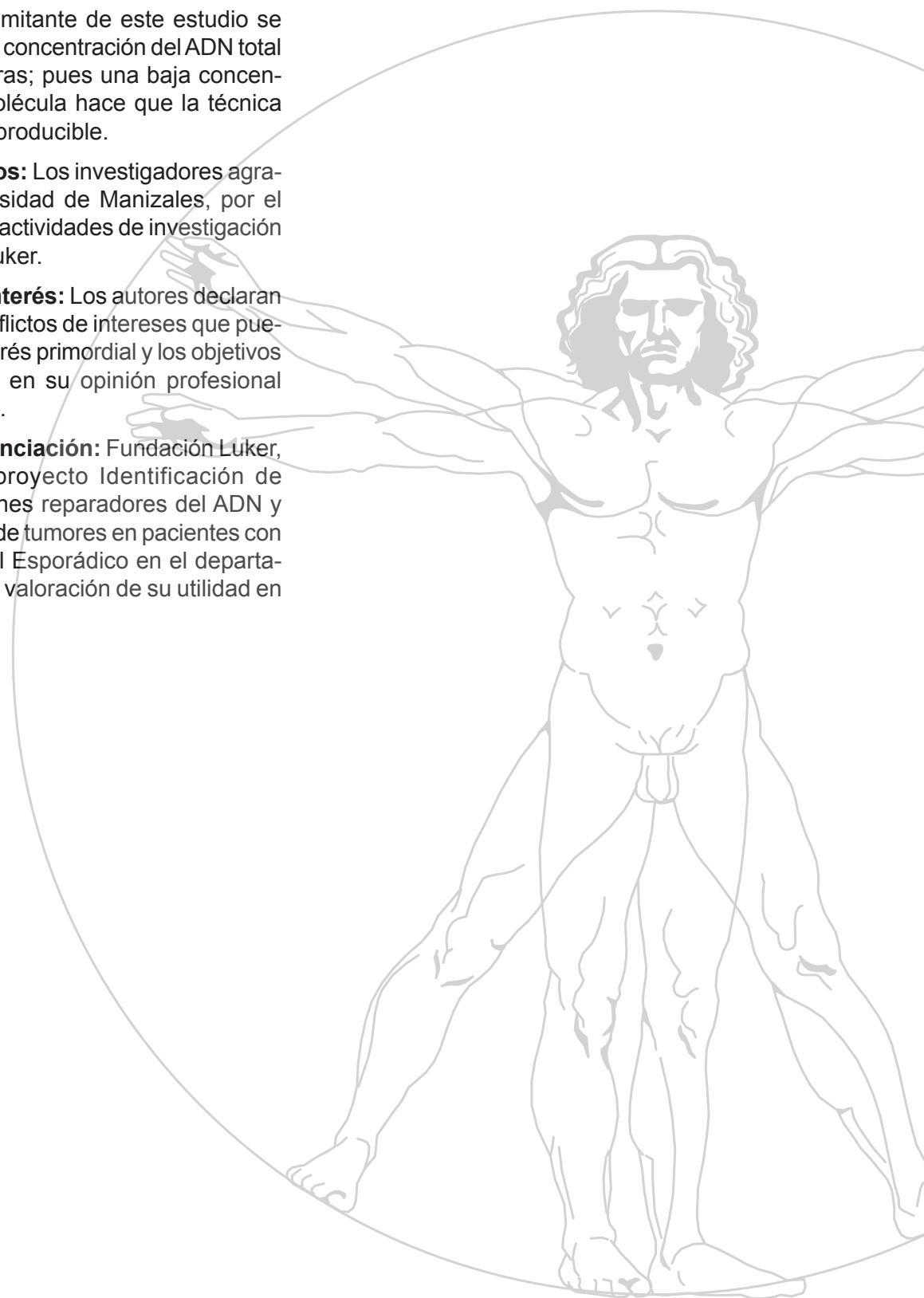
Al analizar la reproducibilidad y la eficiencia de tinción en electroforesis en geles de agarosa para la visualización de ADN del colorante GelRed™ y al compararla con el bromuro de etidio cuya eficiencia ha sido reportada previamente, los resultados demostraron que la tinción con GelRed™ es altamente eficiente y permite visualizar ADN total y diferentes fragmentos de ADN previamente amplificado por PCR, razón por la cual se recomienda su uso para la visualización de ácidos nucleicos.

Finalmente, la limitante de este estudio se presentó en la baja concentración del ADN total de algunas muestras; pues una baja concentración de esta molécula hace que la técnica de PCR no sea reproducible.

Agradecimientos: Los investigadores agradecen a la Universidad de Manizales, por el apoyo continuo en actividades de investigación y a la fundación Luker.

Conflictos de interés: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que puedan influir en el interés primordial y los objetivos de este artículo o en su opinión profesional respecto al asunto.

Fuentes de financiación: Fundación Luker, financiación del proyecto Identificación de mutaciones en genes reparadores del ADN y genes supresores de tumores en pacientes con Cáncer Colorrectal Esporádico en el departamento de Caldas y valoración de su utilidad en la tamización.



Literatura citada

1. López M. **La influencia de la alquimia medieval hispana en la Europa moderna.** *Asclepio* 2002; 54(2):211-230.
2. Binda MC. **Marie Curie, una mujer pionera en su tiempo: Segunda parte.** *RAR* 2009; 73(4):409-416.
3. Kirkham G. **Is biotechnology the new alchemy?** *Stud His Philos Sci* 2009; 40:70-80.
4. Rafalska-Łasocha A. Marie Skłodowska-Curie as a role model for scientists. *Catal Tod* 2012; 191:1-5.
5. Sambrook J, Russell D. **Molecular Cloning. A laboratory Manual.** 3° ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
6. El-Shishtawy RM, Santos C, Goncalves I, Marcelino H, Almeida P. **New amino and acetamido monomethine cyanine dyes for the detection of DNA in agarose gels.** *Bioorg Med Chem* 2007; 15:5537-5542.
7. Weber TK, Conlon W, Petrelli NJ, Rodríguez-Bigas M, Keitz B, Pazik J, et al. **Genomic DNA-based hMSH2 and hMLH1 mutation screening in 32 Eastern United States hereditary nonpolyposis colorectal cancer pedigrees.** *Cancer Res* 1997; 57:3798-3803.
8. Wang JY, Hsieh JS, Chen CC, Tzou WS, Cheng TL, Chen FM, et al. **Alterations of APC, c-met, and p53 Genes in Tumor Tissue and Serum of Patients with Gastric Cancers.** *J Surg Res* 2004; 120:242-248.
9. Chirsten A, Montalbano B. **An Ethidium Bromide-Agarose Plate Assay for the Nonradioactive Detection of cDNA Synthesis.** *Anal Biochem* 1989; 178(2):269-272.
10. Farrell RE. **RNA Methodologies. A laboratory Guide for Isolation and Characterization.** 4° ed. San Diego, California. Elsevier Inc; 2010.
11. Soto AM, Draper D. **White gels: An easy way to preserve methylene blue stained gels.** *Anal Biochem* 2012; 421:345-346.
12. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. **Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.** *Biotechnol* 1992; 10(4):413-7.
13. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. **Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis.** *Biochemistry* 1973; 12:3055-3063.
14. Ioannou AK, Alexiadou DK, Kouidou SA, Voulgaropoulos AN, Grousi STh. **Electroanalytical study of SYBR Green I and ethidium bromide intercalation in methylated and unmethylated amplicons.** *Anal Chim Acta* 2010; 657:163-168.
15. Morel F, Debise R, Renoux M, Touraille S, Ragno M, Alziari S. **Biochemical and molecular consequences of ethidium bromide treatment on Drosophila cells.** *Insect Biochem Molec* 1999; 29:835-843.
16. Ohta T, Tokishita S, Yamagata H. **Ethidium bromide and SYBR Green I enhance the genotoxicity of UV-irradiation and chemical mutagens in E. coli.** *Mut Res* 2001; 492:91-97.
17. Ouchi RY, Manzato AJ, Ceron CR, Bonilla-Rodríguez GO. Evaluation of a single Exposure to Ethidium bromide in *Drosophila melanogaster* (Diptera- Drosophilidae). *Bull Environ Contam Toxicol* 2007; 78:489-493.
18. Singer VL, Lawlor TE, Yue S. **Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test).** *Mutat Res* 1999; 439:37-47.
19. Kirsanov KI, Lesovaya EA, Yakubovskaya MG, Belitsky GA. **SYBR Gold and SYBR Green II are not mutagenic in the Ames Test.** *Mutat Res.* 2010; 699:1-4.
20. El-Shishtawy RM, Santos C, Goncalves I, Marcelino H, Almeida P. **New amino and acetamido monomethine cyanine dyes for the detection of DNA in agarose gels.** *Bioorgan Med Chem* 2007; 15:5537-5542.
21. Fránová j, Ludvíková H, Paprštejn F, Bertaccini A. **Genetic diversity of Czech 'Candidatus Phytoplasma mali' strains based on multilocus gene analyses.** *Eur J Plant Pathol* 2013.
22. Dowling APG, Ochoa R, Beard JJ, Welbourn WC, Ueckermann EA. **Phylogenetic investigation of the genus Raoiella (Prostigmata: Tenuipalpidae): diversity, distribution, and world invasions.** *Exp Appl Acar* 2012; 57:257-269.
23. Lok KS, Lee P, Kwok Y, Nguyen NT. **Nested PCR in magnetically actuated circular closed-loop PCR microchip system.** *Microchim Act* 2012; 177:111-117.
24. Botella L, Diez JJ. **Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of Pinus halepensis.** *Fungal Divers* 2011; 47:9-18.
25. FluoProbes. **GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain.** FluoProbes®. Montluçon FRANCE. [Consultado 2013 enero 16]. [5 p.]. Disponible en: <http://www.interchim.fr/ft/B/BQ0420.pdf>.
26. Biotium. **Safety Report of GelRed and GelGreen. Nucleic Acid Detection Technologies.** Biotium. San Francisco. U.S. [Consultado 2013 enero 16]. [11 p.]. Disponible en: http://www.biotium.com/product/product_info/Safety_Report/GR%20&%20GG%20safety.pdf.

