Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALíTICAS Y BIOANALíTICAS

Trabajo Fin de Máster

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS CON NUEVOS MARCAJES ELEMENTALES PARA SU FUTURA APLICACIÓN EN LA DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN Y ARN

ROBERTO ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ GARCÍA

Julio 2015, Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Centro Internacional de Postgrado

Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

Jörg Bettmer, Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado "SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS CON NUEVOS MARCAJES ELEMENTALES PARA SU FUTURA APLICACIÓN EN LA DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN Y ARN"

ha sido realizado por el alumno **Roberto Álvarez-Fernández García** bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 13 de Julio de 2015

Fdo: Jörg Bettmer

Índice

1. Introducción 2
   1.1. Antecedentes históricos 2
   1.2. Composición y estructura de los ácidos nucleicos 4
      1.2.1. Estructura del ADN 5
      1.2.2. Estructura del ARN 8
   1.3. Función de los ácidos nucleicos 8
   1.4. MicroARNs 10
   1.5. Estrategias analíticas para el estudio de los ácidos nucleicos 11
      1.5.1. Métodos de determinación de ácidos nucleicos totales 15
      1.5.2. Métodos de determinación de ácidos nucleicos de secuencia específica 16
   1.6. Espectrometría de masas en el estudio de ácidos nucleicos 17
      1.6.1. Espectrometría de masas molecular 18
      1.6.2. Espectrometría de masas elemental 19
2. Objetivos 24
3. Experimental 26
   3.1. Instrumentación 26
   3.2. Material y Reactivos 32
4. Resultados y discusión 35
   4.1. Síntesis de las sondas de hibridación. 35
      4.1.1. Reducción de los oligonucleótidos 35
      4.1.2. Síntesis de los complejos DOTA-Mal-Ln^{3+} 36
      4.1.3. Marcaje oligonucleótidos. 36
   4.2. Purificación de las sondas de hibridación 38
   4.3. Caracterización de las sondas de hibridación 40
   4.4. Estudio de hibridación 42
   4.5. Características analíticas del método 45
5. Conclusiones 49
6. Bibliografía 51

1.INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Antecedentes históricos

La historia de los ácidos nucleicos se remonta a 1866 cuando Gregor Mendel publicó sus trabajos sobre la herencia, la base sobre la que se asienta la genética como se conoce en la actualidad [1,2]. Mendel mencionaba la existencia de unos pares de "factores específicos" de los cuales la descendencia recibía uno de cada progenitor [3]. Posteriormente, en 1909, Wilhem L. Johannsen, llamó genes a estos factores y, gracias a los avances en microscopía, se encontraron filamentos en el interior de las células vegetales que recibieron el nombre de cromosoma y cromatina. No obstante, hasta el siglo XX no se consiguió relacionar estos conceptos.

Tras las publicaciones de Mendel sobre la herencia, el suizo Friedich Miescher tratando de aislar leucocitos centró su atención en una sustancia precipitada rica en fósforo. Tras diferentes estudios descubrió que esta provenía del núcleo de los leucocitos y la llamó nucleína [4,5]. Este hallazgo atrajo a numerosos investigadores que intentaron explicar la estructura y función biológica de esta nucleína [6].

El término ácido nucleico fue empleado por primera vez en 1889 por el médico alemán Richard Altman tras comprobar el carácter ácido de la nucleína. Paralelamente, Albrecht Kossel descubrió moléculas de naturaleza proteica asociadas a los ácidos nucleicos. Estas eran las que ahora conocemos como histonas que junto con el ADN forman la cromatina tal y como se conoce en la actualidad. Además de esto, consiguió aislar los ácidos nucleicos de la cromatina estableciendo la estructura de estos: azúcar, fosfato y bases nitrogenadas, siendo estas últimas adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T).

Comenzando el siglo XX se propusieron diferentes modelos o posibilidades de la forma en la que se enlazan los azúcares que contienen los ácidos nucleicos y en el año 1909 Phoebus Levene introdujo el concepto de nucleótido refiriéndose al conjunto azúcar, base nitrogenada y fosfato. Además de esto, se percató de la existencia de dos tipos de azúcares en la estructura de los ácidos nucleicos dividiéndolos en dos grupos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) compuesto por desoxirribosa, y el ácido ribonucleico (ARN), formado por ribosa. Posteriormente se descubría que la diferencia entre ambos tipos de ácidos nucleicos residía, además de en el azúcar, en las bases nitrogenadas. De esta manera, las bases A, C y G son comunes a ambos tipos mientras que la T solo aparece en el ADN y el U solo en ARN.

Se pensó que una molécula compuesta por subunidades idénticas no tendría un papel biológico muy relevante adquiriendo mucha mayor atención las proteínas, compuestas por diferentes combinaciones de 20 aminoácidos distintos. Estas se postulaban como las biomoléculas responsables de la herencia.

Sin embargo, en 1928 el médico Frederick Griffith descubrió el papel del ADN en la herencia mediante el conocido como experimento de Griffith. Este infectaba ratones con diferentes cepas

de neumococos (*Streptococcus pneumoniae*). Una de las cepas era inocua y la otra virulenta, provocando neumonía. Griffith observó que había un “principio transformador”, capaz de transformar las inocuas en virulentas y ese cambio era permanente y nuevamente heredable [7]. En 1944, Owald Avery, Colin McLeod y Macyln McCarty, aprovecharon este hallazgo para realizar una serie de trabajos [8] en los que se identifica el ADN como el “principio transformador” al que Griffith se refería. En este momento se descubría que el ADN era la biomolécula portadora de la información genética.

A partir de los años 50 se fueron sucediendo diferentes descubrimientos acerca de la composición y estructura de la molécula de ADN lo que asentó las bases para el desarrollo de la biología molecular como ciencia [9,10]. Erwing Chargaff comprobó que para cualquier molécula de ADN independientemente de su origen, la proporción de nucleótidos de adenina y timina eran prácticamente iguales, y lo mismo pasaba entre los nucleótidos de citosina y guanina. Por otro lado, gracias al desarrollo instrumental, Rosalin Franklin utilizó la difracción de rayos X para estudiar la molécula de ADN descubriendo así la unión de dos cadenas de nucleótidos que se envolvían sobre si mismas dando lugar a una hélice orientando los grupos fosfatos hacia el exterior de esta.

Por último, en 1953 los conocidos James D. Watson y Francis Crick interpretaron las investigaciones previas y descubrieron la estructura de doble hélice de ADN conocida en la actualidad [11]. Este modelo consiste en dos cadenas de ADN que forman dos hélices congruentes con un mismo eje, difiriendo por una traslación a lo largo de este.

Con este descubrimiento empezó un periodo de trabajos que intentaban descubrir el funcionamiento de esta doble hebra y la interpretación de su mensaje, así como el desarrollo de nuevas tecnologías para su estudio y cuantificación [12,13]. Así, en el año 2000 sucedió un hecho muy importante, se publicó el primer borrador del Proyecto Genoma Humano [14]. Este Proyecto permitió determinar la secuencia completa de pares de bases que componen el ADN humano y cartografiar la posición de todos sus genes.

Además de su gran aportación a la estructura del ADN, Watson y Crick también postularon que dicha molécula era efectivamente la portadora de nuestra carga genética hereditaria introduciendo el concepto de que una de las hebras procedía de una célula progenitora sirviendo como molde de la síntesis de la otra hebra, complementaria de la anterior. Esta hipótesis fue confirmada posteriormente por Matthew Meselson y Franklin Stahl en 1958 [15].

Estos trabajos tuvieron como consecuencia el postulado del “Dogma Central de la Biología Molecular” que interpreta el papel de las moléculas de ADN y ARN en el mecanismo de la transmisión de la información genética [16, 17]. Este Dogma asentado aún en la actualidad propone que el ADN es transcrito a ARN y este, traducido a proteína que es la que realiza la función final. Además, esto devuelve el interés por el segundo tipo de ácido nucleico, el ARN. Durante las siguientes décadas se realizan diversas investigaciones sobre esta molécula y se

descubren sus diferentes formas moleculares y la función de estas [18-22]. Se descubren tres tipos de ARN: ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr). El ARNm consiste en una secuencia de nucleótidos que se forma por transcripción de un fragmento de ADN correspondiente a un gen. Este tipo de ARN lleva el código genético del ADN al citoplasma donde es traducido a una proteína de una secuencia de aminoácidos específica y dependiente de la secuencia nucleotídica del ARNm.

El ARNt tiene una estructura cruciforme y su papel se lleva a cabo en los ribosomas en el proceso de traducción del ARNm a proteína. Son los encargados de sintetizar la cadena proteica incorporando el aminoácido adecuado.

Por último, el ARNr se encuentra asociado a proteínas en los ribosomas y facilita la interacción ente el ARNm y los ribosomas y también las demás moléculas que intervienen en la síntesis de proteínas como el ARNt. Facilita, por tanto, el proceso de traducción.

Más tarde, durante los años 80, Thomas Cech y Sidney Altman descubrieron la actividad enzimática de determinados ARN. A estos los denominaron ribozimas y son capaces de catalizar diferentes reacciones químicas que ocurren en el interior de las células [23-25]. En la siguiente década, se observó la existencia de otras especies de ARN no codificante además del ribosómico y de transferencia [26] y en la actualidad se están llevando a cabo numerosos trabajos bioanalíticos relacionados con las moléculas de ácidos nucleicos.

1.2. Composición y estructura de los ácidos nucleicos

Químicamente, los ácidos nucleicos son moléculas poliméricas formadas por unidades repetitivas, los nucleótidos. Una sola molécula de ácido nucleico puede contener millones de nucleótidos. Un nucleótido (nt) está constituido a su vez por la unión de tres moléculas: un grupo fosfato, un azúcar de tipo pentosa y una base nitrogenada, como se puede ver en la Figura 1. A la unión entre la base nitrogenada y el azúcar se le denomina nucleósido [27].

Según el azúcar que contenga se puede distinguir entre ADN y ARN, de gran similitud química. El ADN o ácido desoxirribonucleico contiene en sus nucleótidos 2’-desoxi-D-ribosa mientras que el ARN o ácido ribonucleico contiene D-ribosa.

Dentro de cada tipo de ácido nucleico se pueden distinguir nucleótidos con distintas bases nitrogenadas. Estas pueden derivar de las pirimidinas como es el caso de la citosina (C), timina (T) y uracilo (U) o de las purinas como la adenina (A) y la guanina (G). Hay que destacar que la timina solo está presente en el ADN mientras que el uracilo solo en el ARN. Esta es la segunda y última diferencia en la composición de ambos tipos de ácidos nucleicos.

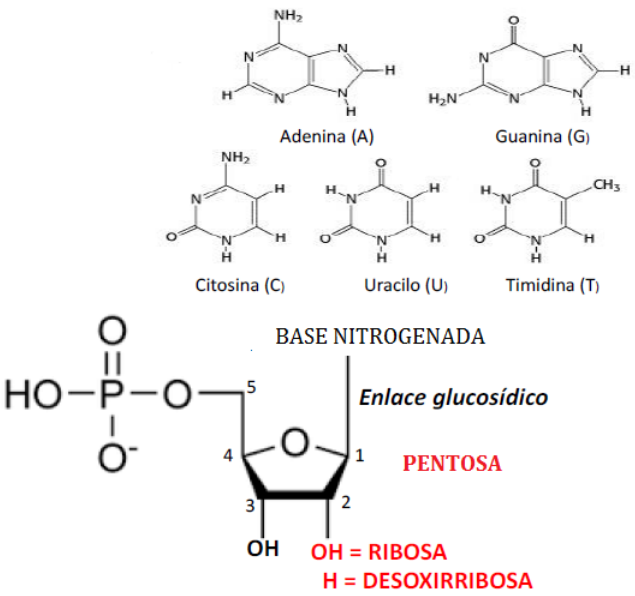


Figura 1. *Estructura de un nucleótido, monómero de las moléculas de ADN y ARN.*

Ambos tipos de ácidos nucleicos se ordenan tridimensionalmente en diferentes niveles estructurales.

1.2.1. Estructura del ADN

El ADN es una molécula bicatenaria, es decir, está formada por dos cadenas que son antiparalelas entre sí y con las bases nitrogenadas enfrentadas. Las purinas y pirimidinas presentan complementariedad y esto hace que, como ya observó Chargaff [9], la adenina y timina se enlazan entre sí, uniéndose mediante dos puentes de hidrógeno. Lo mismo hacen citosina y guanina, pero mediante tres. Esta complementariedad de bases es la clave de la estructura del ADN. Se distinguen distintos niveles:

Estructura primaria

Consiste en la cadena lineal de nucleótidos enlazados entre sí. Estos se enlazan por enlaces fosfodiéster que se producen entre el grupo fosfato de un nucleótido y el grupo hidroxilo del carbono 3' de la desoxirribosa del siguiente nucleótido (ver Figura 2). Esta es la parte fija de cualquier hebra de ADN, el esqueleto azúcar-fosfato. La parte variable corresponde a las bases nitrogenadas que se unen al carbono 1' de la desoxirribosa. La diferencia en la información genética radica en la secuencia de bases en los nucleótidos.

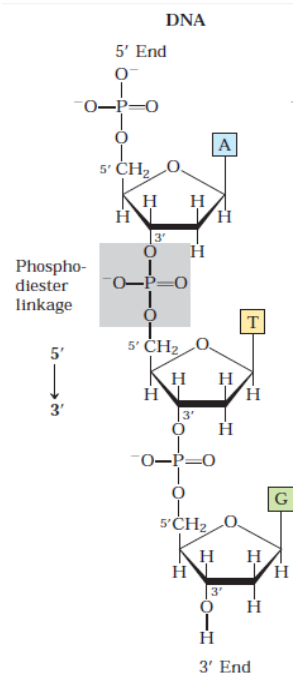


Figura 2. *Enlaces fosfodiéster entre nucleótidos en el ADN.*

Las hebras de ADN tienen dos extremos libres. Por un lado, el grupo fosfato del carbono 5’ del azúcar y, por el otro, el grupo hidroxilo del carbono 3’ del azúcar. Esto hace que las cadenas de ADN adquieran direccionalidad o polaridad y que, por convenio, la estructura primaria se escriba con el extremo 5’ fosfato a la izquierda y abreviando cada nucleótido con la inicial de la base nitrogenada que contiene.

Estructura secundaria

Es el resultado de la unión entre dos cadenas lineales de nucleótidos mediante puentes de hidrógeno entre bases complementarias. La A siempre enlaza con la T a través de dos puentes de hidrógeno y la C con la G mediante tres (A=T, C≡G). Se distinguen tres variantes estructurales que son las formas A, B y Z representadas en la Figura 3. La más común es la forma B que es la postulada por Watson y Crick en 1953 y es la más estable en condiciones fisiológicas. Se trata de una doble hélice dextrógira que posee 10,5 pares de bases (pb) en cada vuelta de hélice. Las bases quedan orientadas hacia el interior y los grupos fosfato cargados negativamente hacia el exterior de la doble hélice. Dependiendo de la secuencia y otros factores como las condiciones del medio o modificaciones en las bases, el ADN puede adoptar también las formas A y Z. La conformación A es también una doble hélice dextrógira en este caso con aproximadamente 11 pb por vuelta, por lo tanto, más ancha y corta que la conformación B. La conformación Z es más larga y estrecha debido a que posee 12 pb por vuelta, y es de carácter levógiro. No se han encontrado moléculas de ADN en conformación A en células en condiciones fisiológicas, sin embargo, se han encontrado pequeños fragmentos de la conformación Z tanto en procariotas como en eucariotas y parece tener relación con procesos de recombinación y de regulación de la expresión genética. [27].

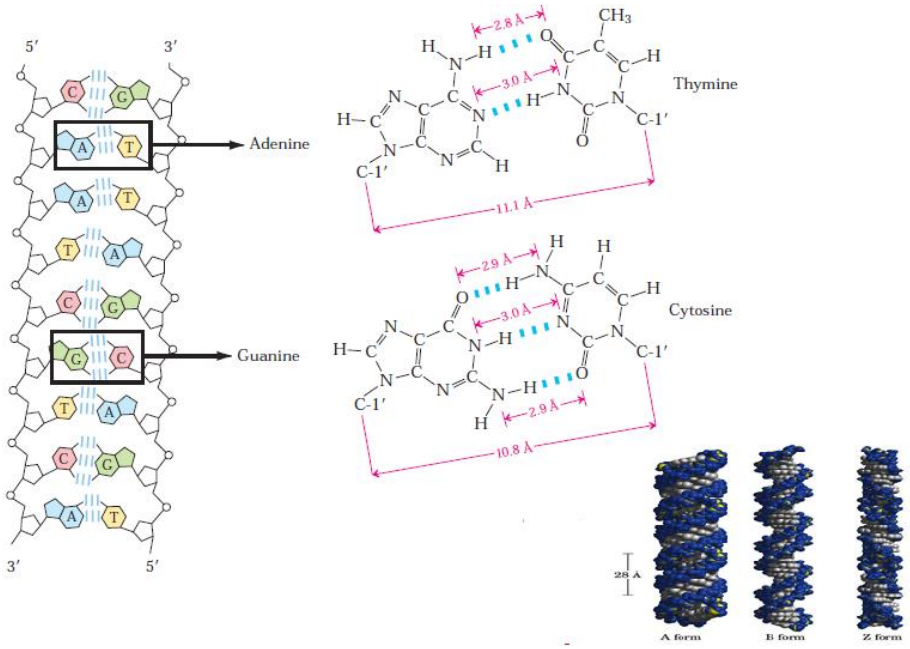


Figura 3. *Puentes de hidrógeno entre bases nitrogenadas complementarias y detalle de las conformaciones A, B y Z del ADN [27].*

Estructura terciaria

Se refiere a distintas formas de plegarse la doble hélice de ADN sobre sí misma para compactarse ocupando un volumen mucho menor al de la estructura secundaria. En las células eucariotas la cantidad de ADN es muy elevada por lo que se requiere un alto grado de empaquetamiento. Para ello, el ADN se asocia a proteínas, principalmente histonas. Estas hacen que la doble hélice se enrolle alrededor de la propia proteína formando bucles superhelicoidales, que adoptan unas estructuras cilíndricas denominadas nucleosomas. Cada nucleosoma está formado por un núcleo proteico consistente en un octámero de histonas asociado a unos 200 pares de bases de ADN, que suponen un par de vueltas de la doble hélice alrededor del núcleo de histonas. Esto crea una estructura que asemeja a un collar de perlas que recibe el nombre de cromatina.

Estructuras de orden superior

La cromatina necesita otro grado de empaquetamiento para almacenarse en el núcleo celular. Esta se enrolla sobre sí misma helicoidalmente adoptando una estructura de solenoide que constituye la estructura cuaternaria del ADN. En cada vuelta de solenoide hay 6 nucleosomas. Esta nueva estructura sufre nuevos plegamientos dando lugar a bucles que se montan sobre andamiaje proteico no histónico.

Por último, cuando la célula va a dividirse, los bucles se compactan con nuevos superenrollamientos dando lugar a fibras que forman los cromosomas (Figura 4). Por lo tanto, los cromosomas son unas estructuras altamente organizadas compuestas por ADN y proteínas que contienen la información genética de un individuo.

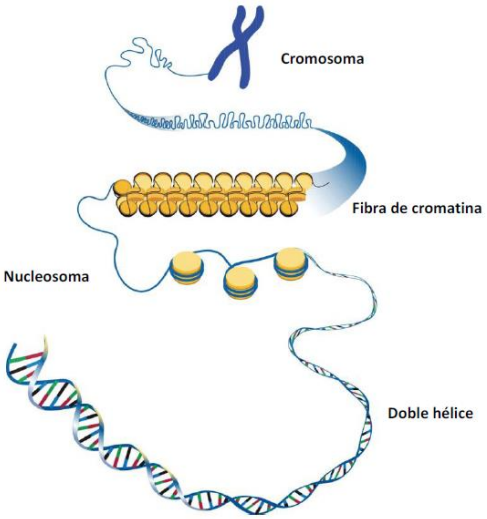


Figura 4. *Representación de las diferentes estructuras que adopta el ADN para su empaquetamiento*

1.2.2. Estructura del ARN

El ácido ribonucleico está formado solamente por una cadena de ribonucleótidos, a excepción de algunos virus. Por lo tanto, se trata de una molécula de ácido nucleico lineal y de hebra sencilla. Al igual que el ADN posee diferentes estructuras, en orden creciente de complejidad:

Estructura primaria

La cadena de nucleótidos se une, como en el ADN, por enlaces fosfodiéster, aunque en este caso, como se ha mencionado, el azúcar es la ribosa que posee un grupo hidroxilo en su carbono C2 que lo diferencia de la 2-desoxirribosa. Este enlace se forma entre el grupo hidroxilo en 3' de la ribosa de un nucleótido y el fosfato en 5' del siguiente. En este caso, en lugar de timina se encuentra la base nitrogenada uracilo.

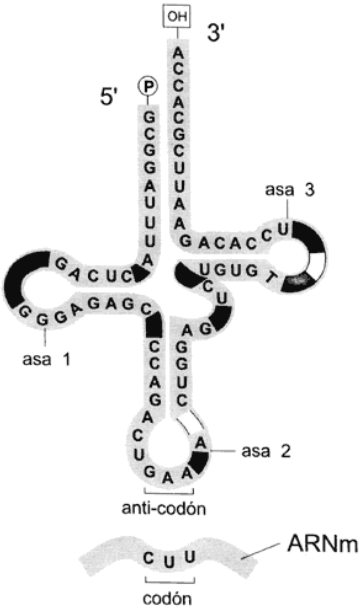


Figura 5. *Ejemplo de ARNt y su estructura terciaria.*

Estructura secundaria

Como se trata de un ácido nucleico de hebra sencilla no adquieren la conformación de doble hélice que presenta el ADN a lo largo de toda la molécula, sin embargo, se puede plegar sobre sí misma por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre bases complementarias de la misma molécula dando lugar a zonas de doble hélice que hace que el ARN adopte diferentes estructuras secundarias (horquilla, asa, bucle múltiple…).

Estructura terciaria

Este tipo de estructura más compleja surge cuando un ARN con estructura secundaria interacciona de nuevo intramolecularmente formando puentes de hidrógeno o mediante fuerzas de Van der Waals. En las estructuras terciarias son frecuentes los apareamientos no convencionales entre bases no complementarias o entre más de dos nucleótidos (por ejemplo U-A-U). Esto es importante, por ejemplo, en el ARN de transferencia (ARNt) para descifrar el código genético del ARN mensajero (ARNm). En la Figura 5 se pueden ver este tipo de estructuras.

1.3. Función de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos almacenan la información genética en los organismos vivos, tanto eucariotas como procariotas, y se encargan de su transmisión y expresión y de la regulación de estos procesos [28]. En la secuencia nucleotídica del ADN está contenida la información genética

hereditaria organizándose en fragmentos funcionales o genes que son necesarios para la síntesis de proteínas o de ARNs no codificantes.

Durante el proceso de la expresión de un gen se cumple el “Dogma Central de la Biología Molecular” mencionado anteriormente. La información contenida en el ADN se transcribe a ARN, y éste, a su vez, se traduce a proteínas con una determinada estructura y función celular (Figura 6).

La transcripción es un proceso catalizado por la enzima ARN polimerasa y se produce una cadena de ARN sencilla complementaria a una de las hebras de ADN que se utiliza como molde. La doble hélice de ADN sufre un desenrollamiento para mayor accesibilidad de las diferentes enzimas implicadas en el proceso. La síntesis de ARN se produce con direccionalidad 5’ a 3’ y la ARN polimerasa añade cada ribonucleótido al extremo 3’ de la nueva cadena. En el caso de los organismos eucariotas esta cadena de ARN sufre diferentes modificaciones para su maduración que lo convierte en un ARNm funcional. La más habitual es la eliminación de secuencias que corresponden a regiones del ADN no codificantes de proteínas que reciben el nombre de intrones y constituyen cada gen con los exones o regiones codificantes. El ARN maduro sale al citoplasma a través de la membrana nuclear.

En el citosol, el ARNm se une a los ribosomas donde tiene lugar la traducción o síntesis de proteínas. El sentido de lectura de la secuencia de ARN es también de 5’ a 3’. La secuencia del ARNm está organizada en tripletes de bases llamados codones y cada uno de ellos se traduce en un aminoácido concreto. Un ARN no codificante, el ARN de transferencia contiene una secuencia complementaria o anticodón de manera que reconoce el codón correcto sobre el mensajero y actúan como adaptadores de cada aminoácido concreto. Otra enzima, la aminoacil ARNt sintentasa, cataliza la formación de enlaces peptídicos entre aminoácidos.

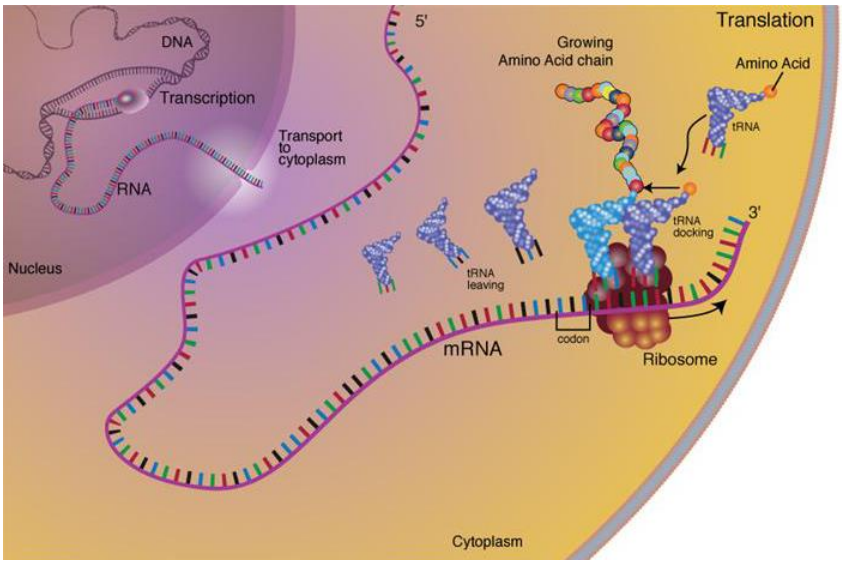


Figura 6. *Procesos que sufre el ADN en el proceso de expresión génica.*

Todas las células de un organismo contienen el mismo material genético. Sin embargo, pueden diferenciarse en el nivel de expresión de ese material dando lugar a las diferencias funcionales entre células o, incluso, entre la misma célula en función de sus condiciones. Esto depende de un proceso de regulación en el que también intervienen los ácidos nucleicos modulando principalmente el ARNm. Los encargados de la regulación son típicamente ARNs no codificantes destacando los microARNs.

1.4. MicroARNs

Los microARNs (miARNs) son moléculas de ARN endógenas y reguladoras, capaces de modular la expresión genética en las células. Poseen una corta cadena sencilla de entre 21 y 23 ribonucleótidos. Han sido identificados en organismos eucariotas desde nematodos hasta humanos [29]. De hecho, el primer miARN fue descubierto en el nematodo *Caenorhabditis elegans* por Victor Ambors y col en 1993. Estos descubrieron que el gen Lin-4 no codificaba para ninguna proteína sino que se transcribía a un pequeño ARN de 22 nt que tenía la capacidad de unirse a una región del ARNm de la proteína LIN-14 reprimiendo su expresión [30].

Todos los cromosomas humanos menos el cromosoma Y contienen genes que codifican miARNs [31]. Los genes se transcriben por la ARN polimerasa II en moléculas de ARN largas con varias regiones en forma de horquilla llamadas pri-miARN. Estas se procesan dentro del núcleo por la ARNsa Drosha quedando una horquilla más corta llamada pre-miARN que se exporta al citoplasma donde termina su procesamiento mediante la acción del complejo proteico Dicer. Este convierte el pre-miARN en pequeños dúplex de miARN de alrededor de 22 nt que contienen el miARN maduro y una hebra que es degradada. Finalmente, como se ve en la Figura 7, el miARN maduro forma un complejo proteico llamado miARN-microribonucleoproteico (RISC) y se vuelve activo reconociendo secuencias específicas de ARNm, generalmente de la región 3' UTR (*untranslated-region*). Si la unión con estas secuencias es total, se induce la degradación del ARNm, si no es perfecta, se reprime su traducción a proteína. Además de la propia regulación que desempeñan los miARNs, su síntesis también puede ser regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional [32,33].

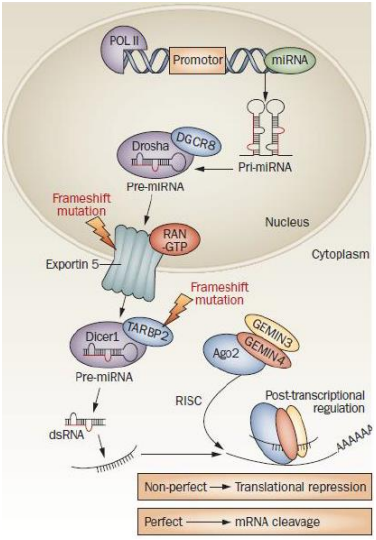


Figura 7. *Biogénesis celular del miARN maduro [32].*

En la actualidad se han identificado más de 1500 miARNs humanos con capacidad de regular la expresión génica a través de interacciones con el ARNm [34,35]. Estos se han ido nombrando con el prefijo miR seguido de un número que indica el orden cronológico de identificación. Además, se está investigando sobre el potencial de estas moléculas de ARN como biomarcadores de diferentes enfermedades y como fármacos y dianas terapéuticas.

La labor de los miARNs en la regulación de los genes inhibiendo la traducción o degradando el ARNm hace que tengan un papel relevante en la regulación de las funciones celulares. La diferente expresión de determinados miARNs en condiciones fisiológicas y patológicas hace que puedan ser utilizados como biomarcadores, es decir, indicador de una determinada patología. Así, se descubrió su implicación en el cáncer en el 2002 [36]. En el 50 % de los casos, en pacientes con leucemia linfocítica crónica, se encontraron deleciones en una región del cromosoma 13 en la que están situados el miR15 y el miR16. Estos tienen la capacidad de inhibir la expresión de la proteína Bcl2 que es una inhibidora de la apoptosis o muerte celular. Por tanto, la pérdida de estos miARNs provoca una sobreexpresión de esta proteína que impide la apoptosis dando lugar al proceso cancerígeno. Actualmente se sabe que muchos de los genes que codifican miARNs se encuentran en regiones cromosómicas que presentan alteraciones en procesos cancerígenos.

También se ha descubierto la relación entre alteraciones en la transcripción de miARNs y patologías neurológicas como la enfermedad de Parkinson [37], diabetes, colesterol o patologías cardiacas como el síndrome coronario agudo [38,39].

Estas moléculas se pueden detectar tanto en tejidos como en diversos fluidos corporales como en la sangre [40] haciendo que sean buenos candidatos como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y pronóstico del cáncer y otras enfermedades.

Asimismo, si se determinan los genes diana de cada miARN y el mecanismo de su regulación se podrían utilizar miARNs sintéticos como agentes terapéuticos, aunque aún no existen demasiadas pruebas clínicas en la actualidad.

1.5. Estrategias analíticas para el estudio de los ácidos nucleicos

La evolución y desarrollo de las técnicas analíticas junto con la aplicación de enzimas involucrados en el procesamiento del ADN como las ligasas, la ADN polimerasa o las enzimas de restricción supusieron un avance muy grande en el estudio del ADN y ARN centrado en su detección y cuantificación.

Sea cual sea el objetivo del estudio de los ácidos nucleicos siempre será necesaria una etapa previa de extracción y purificación ya que estos se encuentran siempre formando parte de matrices complejas compuestas por otras biomoléculas en las muestras reales como cultivos celulares, tejidos, fluidos biológicos, etc.

En la célula, el ADN se encuentra principalmente en el núcleo asociado a proteínas y el ARN repartido entre el núcleo y el citoplasma, como se ha comentado. Existen muchos métodos para aislar ácidos nucleicos en cualquier tipo de matriz biológica. Todos comienzan por la lisis de la célula seguida por la inactivación de las nucleasas celulares que son enzimas capaces de degradar los ácidos nucleicos. La última etapa consiste en la separación del ácido nucleico del resto de componentes celulares como proteínas, lípidos o hidratos de carbono.

Para la purificación y separación de ácidos nucleicos las dos técnicas más empleadas son la cromatografía y la electroforesis. La posibilidad de acoplamiento de estas a la mayoría de sistemas de detección rutinarios de ácidos nucleicos como la espectrofotometría las hace aún más interesantes.

En cuanto a las técnicas cromatográficas, la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica de separación más utilizada actualmente en el análisis de ácidos nucleicos. Estos son moléculas orgánicas polianiónicas por lo que se pueden llevar a cabo diferentes modos de cromatografía para su separación: fase reversa (*Reversed Phase*, RP-HPLC), fase reversa de pares iónicos (*Ion Pair*, IP-RP-HPLC), intercambio aniónico (*Anion Exchange*, AE-HPLC) y exclusión por tamaños (*Size Exclusion Chromatography*, SEC-HPLC). Las cromatografías de fase reversa e intercambio aniónico proporcionan una mayor eficacia en la separación mientras que la exclusión por tamaños se utiliza principalmente para prefraccionar, desalinizar y cambiar el disolvente de las muestras [41].

La **cromatografía en fase reversa** es una cromatografía de reparto en la que los analitos se distribuyen entre la fase móvil y estacionaria. Esta última consiste en un gel de sílice químicamente modificado con cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud (por ejemplo las columnas C18 poseen un grupo alquilo de 18 átomos de carbono). Esto hace que la fase estacionaria sea apolar utilizando fases móviles de mayor polaridad, típicamente agua con cantidades variables de metanol o acetonitrilo como disolvente orgánico para modificar la polaridad. Los analitos más apolares se retienen más en la fase estacionaria y eluyen más tarde. Además, al aumentar el contenido de disolvente orgánico en la fase móvil se aumenta el poder de elución de esta y es así como se realiza la elución en gradiente en esta modalidad de cromatografía. La RP-HPLC se suele emplear para el análisis de nucleótidos individuales debido a la diferente polaridad de las bases nitrogenadas y de la 2-desoxirribosa y ribosa del ADN y ARN, respectivamente [42].

La **cromatografía en fase reversa de pares iónicos** utiliza la misma fase estacionaria que la RP-HPLC pero a la fase móvil se añade un compuesto iónico que aporta un contraión de carga opuesta al analito formando una especie neutra. En este caso, se une a la carga negativa de los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos formando un par iónico neutro y apolar que se retiene en la fase estacionaria. Los formadores de pares iónicos más utilizados en la separación de los ácidos nucleicos son el bicarbonato de trietilamonio (TEAB), acetato de tiretilamonio (TEAA) y trietilamina (TEA). Es una técnica de las más empleadas para el estudio de los ácidos nucleicos proporcionando excelentes resultados para la separación de moléculas de pequeño tamaño pudiendo separar incluso aptámeros de ARN con una diferencia de longitud de tan solo un nucleótido [43]. Se han obtenido mayores resoluciones a las obtenidas mediante fase reversa e intercambio aniónico y debido a la fácil volatilización de los modificadores añadidos presenta un mejor acoplamiento con detectores de MS molecular.

La **cromatografía de intercambio aniónico** utiliza una fase estacionaria compuesta por un material polimérico modificado con grupos funcionales cargados positivamente. Esto hace que los ácidos nucleicos se separen en función de su carga negativa mediante interacciones electrostáticas con estos grupos, reteniéndose más en la columna los que posean mayor carga negativa neta. La fase móvil consiste en una disolución tampón con una sal que aporta aniones que compiten con las ácidos nucleicos por los grupos funcionales de la fase estacionaria. Por ello, al aumentar la fuerza iónica de la fase móvil, se aumenta el poder de elución con la posibilidad de hacer gradientes. Es una técnica muy indicada para la purificación de oligonucleótidos con estructura secundaria ya que permite el uso de altas temperaturas y pH alcalinos en la fase móvil que se utilizan para la desnaturalización de estos sin comprometer la estabilidad de la columna. La utilización de sales en la fase móvil hace que el acoplamiento con técnicas de detección como MS molecular sea limitado.

Por último, la **cromatografía de exclusión por tamaños**, SEC-HPLC, hace que los analitos se separen en función de su tamaño y forma molecular. Esto se consigue utilizando una fase estacionaria consistente en un empaquetado de polímeros porosos que permiten entrar a las moléculas pequeñas y no a las grandes. Por lo tanto, las moléculas de mayor tamaño no se retienen y eluyen antes de la columna (ver Figura 8). Esto hace que no se puedan separar entre sí, sin embargo, las moléculas de menor tamaño penetran en los poros y quedan retenidas, más o menos tiempo, según su tamaño. En la fase estacionaria y fase móvil no se produce, por tanto, ninguna interacción de tipo física o química con los analitos por lo que la elución se realiza siempre en régimen isocrático, es decir, utilizando una composición constante en la fase móvil que es típicamente una disolución reguladora de pH.

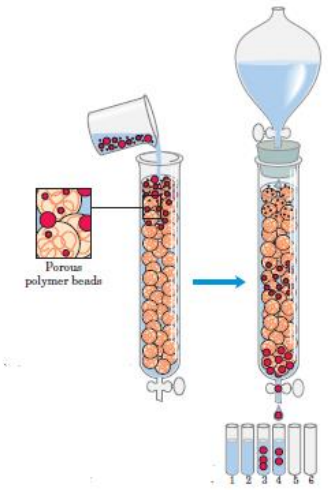


Figura 8. *Representación del proceso de exclusión por tamaños [27].*

Por su sencillez, la técnica SEC-HPLC, es la más aplicada en la modalidad de cromatografía preparativa convencional [44] con diversos objetivos como la eliminación de sales en el medio, intercambio de disolventes o eliminación de reactivos no incorporados en procesos de fabricación de oligonucleótidos sintéticos. Sin embargo, hay ejemplos en los que se pone de

manifiesto el potencial analítico de la técnica. Fujii y col [45] llevaron a cabo la determinación de fragmentos de ARN mediante esta técnica utilizando como sistema de detección la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) monitorizando el fósforo proveniente de los grupos fosfato de los nucleótidos.

La otra técnica de separación ampliamente utilizada en el estudio de ácidos nucleicos es la **electroforesis** que se basa en la diferente movilidad o velocidad de migración de moléculas cargadas en un medio conductor debido a la aplicación de un campo eléctrico. Normalmente, se utiliza la electroforesis en gel disponiendo la muestra de ácidos nucleicos sobre un gel de agarosa o acrilamida empapado de un tampón. Los ácidos nucleicos están cargados negativamente por lo que al aplicar el campo eléctrico migran hacia el polo positivo. La velocidad de esta migración es proporcional a la carga e inversamente proporcional al tamaño de la molécula.

La electroforesis en gel de agarosa tiene un poder de resolución menor que en gel de acrilamida, sin embargo, este es más restrictivo en cuanto al tamaño de los fragmentos a separar. Por lo tanto, los geles de poliacrilamida se utilizan para separar pequeños fragmentos de ADN y ARN de entre 5-100 pb mientras que los de agarosa se utilizan para fragmentos grandes (100 pb-50 kpb). En los ácidos nucleicos, la relación carga/masa es igual para todas las moléculas independientemente del tamaño por lo que es necesario que los poros del gel utilizado ejerzan de tamiz molecular, dificultando la migración de los analitos en mayor o menor grado en función de su tamaño.

Después de la separación electroforética, los ácidos nucleicos se detectan típicamente utilizando tinciones que pueden llevarse a cabo con sales de plata o colorantes fluorescentes como el bromuro de etidio que se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos. Este es un compuesto orgánico muy utilizado que es capaz de absorber radiación a 480 nm y emitir fluorescencia a 590 nm lo que hace que al ser expuesto a luz ultravioleta, emita una intensa luz anaranjada que se puede detectar.

A partir de los años 80, el desarrollo de la **electroforesis capilar** (CE) la convirtió en una buena alternativa a la electroforesis en gel. Esta técnica utiliza finos capilares de 10-100 µm de diámetro interno de sílice fundida para la separación de los analitos que tiene lugar en el seno de una disolución tampón que llena el capilar al aplicar un intenso campo eléctrico. Frente a la electroforesis en gel, esta disipa mejor el calor y permite la aplicación de voltajes mayores (decenas de kV) con pequeña variación de la temperatura dando lugar a mejores separaciones. Además, los tiempos de análisis y volúmenes de muestra requeridos son menores. La detección puede ser realizada en continuo utilizando detectores VIS-UV o de fluorescencia en un punto del final del capilar lo que hace que se pueda utilizar la técnica tanto con fines preparativos como analíticos [46].

1.5.1. Métodos de determinación de ácidos nucleicos totales

Una vez extraídos y purificados los ácidos nucleicos, se pueden cuantificar de varias maneras. Los **métodos espectrofotométricos** son muy utilizados y se basan en la capacidad de las bases nitrogenadas de absorber la radiación UV con un máximo de absorción a 260 nm [28].

Para un paso óptico de 1 cm, el valor de absorbancia a 260 nm es de 1,0 para una disolución de ADN genómico de 50 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ o 33 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ si se trata de ADN desnaturalizado. En el caso del ARN, un valor de absorbancia de 1,0 corresponde a una concentración de 40 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$. Sabido esto, se puede estimar de manera sencilla la concentración de ácidos nucleicos en una muestra.

Además, mediante estos métodos se puede evaluar el grado de pureza de la muestra comprobando la posible presencia de proteínas en estas. Para ello, se mide la absorbancia a 260 nm (máximo de absorción de los ácidos nucleicos) y a 280 nm que es el máximo de absorción de las proteínas por la presencia de aminoácidos aromáticos. Para el ADN, si la relación A_{260}/A_{280} es menor a 1,8 se puede considerar que la muestra está contaminada con proteínas o con sustancias aromáticas como el fenol que puede ser utilizado para la extracción. Un valor mayor de 2,0 indica una posible contaminación por ARN. En el caso del ARN, el valor óptimo de la relación de absorbancias es cercano a 2,0 [47].

La ventaja de estos métodos es su sencillez, bajo coste y facilidad de acoplamiento con los sistemas típicos de purificación, cromatografía HPLC y electroforesis capilar. Sin embargo, los límites de detección que se obtienen ($\mu g \cdot mL^{-1}$) no son adecuados para la determinación de ácidos nucleicos que se encuentren en bajas concentración como los microARNs [48].

También se pueden utilizar **métodos espectrofluorimétricos** para la determinación de ácidos nucleicos usando para ello compuestos como el bromuro de etidio (EtBr), mencionado anteriormente. La estructura de doble hebra del ADN permite que este último se intercale entre sus pares de bases lo que hace que la señal de fluorescencia obtenida sea proporcional a la cantidad de ADN presente. Además, la unión al ADN hace que el rendimiento cuántico de fluorescencia del EtBr aumente. Mediante un calibrado con patrones externos se puede llevar a cabo una cuantificación sensible y con límites de detección del orden de los $ng \cdot mL^{-1}$. No obsante, el EtBr no es selectivo ya que se intercala en cualquier secuencia de ADN y ARN y, además, es tóxico y mutagénico por su capacidad intercalante por lo que su utilización tiende a ser sustituida por otros compuestos fluorescentes como PicoGReen, RiboGReen y SYBR Green o colorantes como Hoechst 33258 y 33342 que son bisbenzimidas que poseen mayor afinidad por el ADN que por el ARN y las proteínas. Estos últimos son muy empleados en microscopía de fluorescencia.

Estos métodos son más sensibles y selectivos que los espectrofotométricos y su acoplamiento con HPLC y CE es también sencillo por lo que existen ejemplos actuales de detección fluorescente de ácidos nucleicos en cantidades del orden de picomolar [49].

1.5.2. Métodos de determinación de ácidos nucleicos de secuencia específica

Los métodos espectrofotométricos y espectrofluorimétricos no permiten diferenciar entre ácidos nucleicos de diferente secuencia. Con este objetivo, se puede distinguir entre métodos basados en técnicas de hibridación y métodos basados en técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos. En estas también está presente el proceso de hibridación y la técnica más utilizada es la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) que permite la amplificación del número de copias de un fragmento específico de ADN o ARN utilizando unos fragmentos cortos que hibridan con los extremos del analito y sirven de cebadores para que la ADN polimerasa sintetice la cadena complementaria añadiendo nucleótidos complementarios a la cadena de analito utilizada como molde. Mediante la PCR cuantitativa o a tiempo real (*Real Time quantitative* PCR, RT-qPCR) se pueden cuantificar dichos fragmentos. Para ello se utiliza un fluoróforo que genera una señal de fluorescencia en cada ciclo de amplificación.

Las **técnicas de hibridación** se basan en la unión de dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas con una secuencia de bases complementarias mediante la formación de puentes de hidrógeno y dando lugar a una única molécula de doble cadena. Se sabe que cuando una disolución de ADN se somete a valores extremos de pH o temperatura (por encima de su temperatura de fusión), este sufre el proceso de desnaturalización que conlleva la rotura de los enlaces entre bases apareadas. Como resultado, se obtienen dos hebras simples completamente separadas. Sin embargo, cuando la temperatura regresa lentamente a valores situados dentro del margen biológico las dos hebras vuelven a hibridarse para dar lugar al dúplex intacto.

Este concepto se ha utilizado para el desarrollo de metodologías analíticas para la detección de secuencias específicas de ADN y ARN como el *Southern Blot*, *Northern Blot*, *Microarrays* de ADN o Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH). La base de todas estas es la utilización de una sonda que consiste en una cadena sencilla de ácido nucleico de secuencia complementaria al analito o diana que se desea detectar. Esta sonda se marca con una especie química que permita su detección. Idealmente y bajo las condiciones adecuadas la sonda hibrida con aquellas secuencias totalmente complementarias que son detectadas mediante la medida de la sonda marcada [50].

Las sondas utilizadas pueden tener un origen natural y sintético. Las sintéticas suelen ser de menor tamaño que las naturales (10-50 nt) y su síntesis consiste en la formación del enlace fosfodiéster entre el 3’ fosfato de un nucleótido y el 5’ hidroxilo del siguiente. Su principal ventaja reside en que este proceso está automatizado y es barato y eficiente pudiendo obtener una elevada selectividad [51] y por su pequeño tamaño son las más utilizadas para el análisis de oligonucleótidos y ARNs pequeños como los microARNs.

Independientemente del tipo de sonda, el marcaje químico debe ser estable y no afectar a la hibridación de sonda y analito. Las especies químicas más utilizadas son los isótopos radiactivos, las enzimas y los compuestos fluoróforos.

El marcaje radiactivo se suele realizar utilizando los isótopos radiactivos ^{32}P, ^{35}S, ^{3}H, ^{125}I llevando a cabo la detección por autorradiografía y presentando límites de detección bajos. Sin embargo, la radiactividad puede ser perjudicial por lo que con frecuencia se sustituye su uso por otros marcadores más baratos y menos peligrosos. En cuanto a las marcas no radiactivas, las enzimas típicamente utilizadas son la fosfatasa alcalina (PA) y la peroxidasa del rábano (HRP). Ambas catalizan una reacción en la que se produce un producto quimioluminiscente o absorbente que se puede monitorizar. Estas se unen a las sondas y, después de la hibridación con el analito, se añade el sustrato para detectar la señal del producto formado. Finalmente, con las marcas fluorescentes, se pueden obtener sensibilidades muy buenas (cercanas al marcaje radiactivo) y se pueden hacer análisis multianalito debido a la posibilidad de medir varios fluoróforos simultáneamente mientras que no se solapen las longitudes de emisión de estos.

La hibridación puede ser llevada a cabo de diferentes maneras. Una de ellas es la hibridación en fase líquida en la que esta sucede en disolución. Su principal ventaja es que la hibridación sucede de manera rápida y efectiva, sin embargo, son necesarias técnicas de fraccionamiento como la electroforesis convencional o capilar o HPLC, que permitan separar el exceso de sonda sin reaccionar antes de la detección.

Por otro lado, también se puede realizar una hibridación en fase sólida en la que la sonda o analito involucrados se inmovilizan en un soporto sólido. Este es el fundamento de técnicas como el *Southern Blot* que permite identificar regiones específicas de ADN dentro de fragmentos de mayor tamaño transferidos a una membrana de nitrocelulosa tras ser separados mediante electroforesis en gel [52]. De forma muy similar se utiliza el *Northern Blot* para la determinación de moléculas de ARNm. Los *microarrays* de ADN también emplean este fundamento pero se utilizan para detectar multitud de secuencias de ácidos nucleicos fijando un conjunto de sondas de manera ordenada sobre un soporte sólido de vidrio o cuarzo. La detección se realiza mediante marcaje radiactivo o mediante la utilización de fluoróforos generando una imagen que tras ser tratada proporciona las intensidades correspondientes a cada secuencia incluida en el *microarray* [53].

La última posibilidad es la hibridación *in situ* que se produce en la ubicación natural del analito como en células o tejidos utilizando sondas marcadas con fluoróforos y observando la señal emitida por la sonda mediante un microscopio de fluorescencia [54].

1.6. Espectrometría de masas en el estudio de ácidos nucleicos

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se fundamenta en la formación de iones gaseosos tanto elementales como moleculares a partir del analito y la posterior separación de estos en función de su relación m/z. Finalmente, estos iones se miden en un detector. Permite

obtener información cualitativa y cuantitativa de moléculas biológicas con gran sensibilidad y selectividad.

1.6.1. Espectrometría de masas molecular

Esta aproximación ha tenido un gran desarrollo en la proteómica en las últimas décadas pero su utilización no es tan destacada en el estudio de los ácidos nucleicos. Sin embargo, la aparición de fuentes de ionización suaves desde los 80 capaces de formar iones moleculares gaseosos de macromoléculas biológicas como los ácidos nucleicos la ha convertido en una alternativa ventajosa. Las dos fuentes más importantes son la ionización por electrospray (ESI) y la ionización/desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI).

En cuanto a la espectrometría de masas con fuente de MALDI, la ionización se realiza co-cristalizando el analito con un exceso de una matriz que puede ser de diferente naturaleza. Este cristal resultante se somete a pulsos de un haz láser con una longitud de onda adecuada para que la radiación sea absorbida por la matriz que sublima llevando las moléculas de analito también a fase gas donde se ionizan por transferencia de carga desde las moléculas de matriz. Los iones generados son moleculares y normalmente solo poseen una carga, bien sea positiva o negativa. Estos son acelerados por un campo eléctrico hacia el analizador de masas, generalmente un tiempo de vuelo (*Time of flight,* TOF) que los separa en función de su m/z para su posterior detección.

Mediante la utilización de este tipo de fuente de ionización pueden surgir diversos problemas como la formación de aductos con iones alcalinos que interaccionan con los fosfatos de los ácidos nucleicos [55] e interfieren en la ionización disminuyendo la resolución e intensidad de la señal. Otro problema se debe a la naturaleza de los ácidos nucleicos, que son inestables en fase gas, sobre todo si son muy grandes. Esto hace que se puedan fragmentar [56]. A pesar de ello tienen importantes aplicaciones bioanalíticas debido a su precisión en estudios de identificación molecular [56].

En la espectrometría de masas con fuente de ESI el analito fluye en disolución a través de un tubo capilar cuya punta está a presión atmosférica y sometida a un elevado potencial (3-6 kV) con respecto a un contra-electrodo situado antes de la interfase entre la fuente y el analizador de masas. El potencial hace que la disolución que contiene el analito se convierta en un aerosol de finas gotas altamente cargadas que decrecen su tamaño al evaporarse el disolvente. Así, aumenta su densidad de carga hasta que se produce la denominada explosión de Coulomb producida porque la repulsión de cargas supera la tensión superficial de la gota. Este proceso se repite hasta que los iones quedan libres de disolvente y pasan a fase gas. Al igual que en MALDI, estos iones moleculares son acelerados hacia el analizador de masas que en este caso suele ser de tipo cuadrupolo, trampa de iones o TOF.

Los espectros de ESI son más complejos que los de MALDI debido a que se producen iones moleculares múltiplemente cargados. En este caso, también se forman aductos con cationes

como Na^+ o K^+ y, además, la eficiencia de la ionización del analito es muy dependiente de la matriz en la que se encuentre. Sin embargo, una de las mayores ventajas de ESI es su posible acoplamiento con técnicas de separación como electroforesis capilar o HPLC, lo que proporciona información estructural de los analitos en estudio. Esto hace que en la actualidad sea una técnica importante en el estudio de los ácidos nucleicos, no obstante, debido a los cambios en la eficiencia de la ionización con pequeñas variaciones experimentales como la composición de fase móvil su empleo para la cuantificación es aun limitado.

1.6.2. Espectrometría de masas elemental

La espectrometría de masas elemental con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (*Inductively Coupled Plasma,* ICP-MS) es una técnica elemental altamente sensible y capaz de determinar de forma cuantitativa casi todos los elementos presentes en la tabla periódica. Además de su alta sensibilidad, posee otras características como una gran selectividad elemental e isotópica, amplios intervalos lineales y capacidad multi-elemental y multi-isotópica [57].

En esta técnica normalmente se trabaja con muestras líquidas que se transportan al nebulizador mediante una bomba peristáltica a un flujo constante. En el nebulizador se forma un aerosol que es transportado por un flujo de gas argón al interior de un plasma del mismo gas que se genera en una antorcha de cuarzo sometida a un potencial de radiofrecuencias.

El plasma puede llegar a alcanzar una temperatura de hasta 10000 K. Por lo tanto, cuando el aerosol de la muestra llega al plasma este posee energía suficiente para provocar la casi total destrucción de la matriz de la muestra y la desolvatación, vaporización, atomización e ionización de sus componentes. A continuación los iones formados, monoatómicos y monopositivos principalmente, son conducidos hacia el analizador de masas a través de una interfase de extacción formada por dos conos metálicos (sampler y skimmer). Estos sirven como interfase entre la presión atmosférica en la formación de iones y el alto vacío del analizador de masas y permite que los iones lleguen al analizador de forma eficaz.

Por último, el equipo dispone de un sistema de lentes iónicas que son cilindros metálicos sometidos a voltajes variables que enfocan todos los iones independientemente de su m/z en un haz estrecho hacia el analizador de masas. Una vez en el analizador, generalmente de tipo cuadrupolo, los iones se separan en base a su relación m/z y, finalmente, los iones son detectados mediante un multiplicador de electrones secundarios.

En contraposición con la espectrometría de masas molecular, los espectros de masas de ICP son sencillos y reflejan la abundancia isotópica de cada elemento presente en la muestra. Además, la cuantificación es más exacta y precisa ya que la señal obtenida es directamente proporcional al elemento ionizado en la fuente de manera virtualmente independiente de la matriz. El principal inconveniente viene dado por la presencia de interferencias espectrales, siendo las más importantes las poliatómicas correspondientes a iones moleculares que tienen el

mismo valor de m/z que el ión del isótopo medido. Para evitarlas se recurre a equipos de alta resolución que utilizan un analizador de masas de doble sector, magnético y electrostático, que permite distinguir entre la masa del analito y de la interferencia o bien a equipos provistos de celda de reacción/colisión que utilizan un gas como He o H_2 para eliminar las interferencias.

Las características que ofrece esta técnica analítica han extendido su utilización al estudio de biomoléculas que contengan uno o varios heteroátomos, siendo estos cualquier elemento medible distinto de C, H, O y N. Se ha incrementado notablemente la utilización de ICP-MS en proteómica en la última década monitorizando, por ejemplo, el azufre presente en proteínas [58]. En cuanto a los ácidos nucleicos, su uso aún no está muy extendido a pesar de que estos contienen un heteroátomo, el fósforo y en estequiometría fija en cualquier tipo de ácido nucleico (un átomo de fosforo por cada nucleótido). Esto se debe a que el ^{31}P posee un primer potencial de ionización de 10,484 eV que hace que se ionice mal en el plasma y, además, está afectado por diversas interferencias poliatómicas como $^{14}N^{17}O^{+}$, $^{15}N^{16}O^{+}$, $^{14}N^{16}O^{1}H^{+}$ [59].

Aun así, el ICP-MS se ha convertido en una buena herramienta para la cuantificación de ácidos nucleicos totales a través de la medida de fósforo presente en la misma, utilizando equipos de alta resolución y superando la sensibilidad y selectividad de los métodos espectrofotométricos mencionados anteriormente. Pero este tipo de cuantificación no permite la determinación de un tipo o secuencia de ácido nucleico de manera específica y, además, se debe eliminar cualquier traza de fósforo no procedente del analito por lo que se debe tener en cuenta el método de extracción de ácidos nucleicos elegido [60]. Esto se puede solucionar debido a que el ICP-MS se puede utilizar como detector para su acoplamiento con técnicas de separación como las ya comentadas HPLC o CE.

Se han desarrollado diversas metodologías híbridas de HPLC-ICP-MS para la cuantificación de diferentes moléculas de ADN midiendo el fósforo debido a que el acoplamiento entre ambas es muy sencillo ya que las velocidades de flujo utilizadas concuerdan con la velocidad de aspiración de las muestras al plasma [61]. Las fases móviles utilizadas no deben tener un alto contenido en sales o disolventes orgánicos.

Actualmente, surgen nuevas estrategias en las que se incorporan elementos metálicos a los ácidos nucleicos que no están presentes de forma natural en estos. Una estrategia innovadora consiste en utilizar técnicas de hibridación, comentadas anteriormente, marcando con el metal los oligonucleótidos utilizados como sondas. La detección del elemento metálico con ICP-MS se realiza con excelente sensibilidad y se evita los problemas del potencial de ionización e interferencias espectrales que presenta el fósforo. Asimismo, esta metodología permite la detección simultánea de gran número de analitos debido a la posible utilización de diferentes métales e isótopos con un rango lineal muy amplio y sin problemas de solapamiento de la señal [62].

Las sondas marcadas con metales hibridan con sus secuencias complementarias de ADN o ARN que son el analito, y la marca se detecta posteriormente por ICP-MS. Normalmente se

utilizan como marcas nanopartículas de Au, Ag o Pt y complejos con iones lantánidos. Todos ellos se pueden detectar con bajos límites de detección, con pocas interferencias y no suelen estar presentes en las matrices biológicas típicas.

El quelante DOTA-Maleimida con iones lantánidos ha sido utilizado para realizar este tipo de marcaje con la estrategia esquematizada en la Figura 9. El marcaje tiene capacidad de análisis multianalito y se realizó una cuantificación absoluta basada en la dilución isotópica a través de la utilización de isótopos enriquecidos [63].

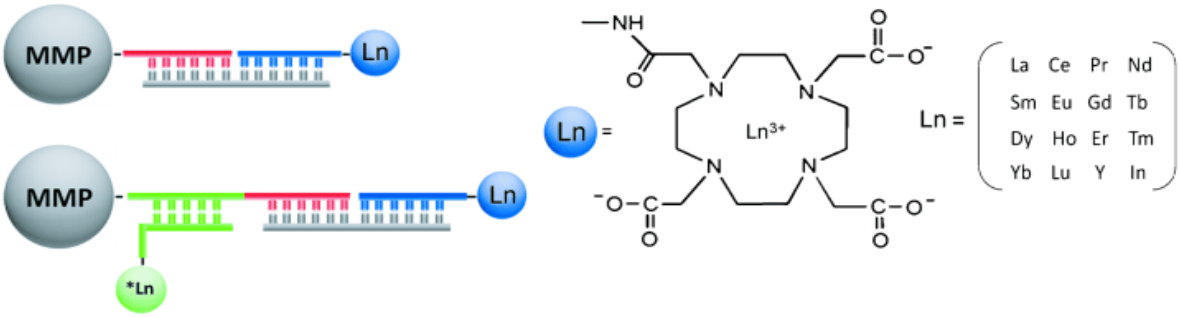


***Figura 9**. Marcaje de sondas de ADN utilizando DOTA con iones lantánidos y partículas magnéticas [63].*

El DOTA o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético es un compuesto macrocíclico capaz de formar complejos de inclusión metálicos muy estables con los iones trivalentes de los lantánidos. Además, se puede modificar con un grupo maleimida que forma enlaces covalentes con grupos tiol por lo que se puede utilizar para marcar oligonucleótidos que incorporen dicho grupo en sus extremos (ver Figura 10). De esta manera, se puede realizar un marcaje de las sondas de hibridación con elevada reproducibilidad y rapidez y sin interferir en el proceso de hibridación de la sonda con el analito.

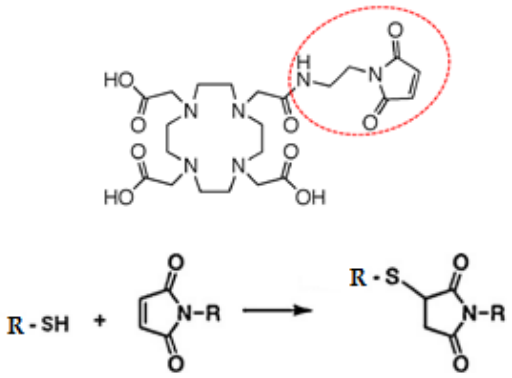


***Figura 10.** Quelante DOTA modificado con grupo maleimida señalado en rojo y reacción de este con los tioles.*

Además, las características de los lantánidos presentes en el complejo los hace ideales para su detección por ICP-MS y convierte este marcaje en una poderosa estrategia. Existen 15 lantánidos, todos ellos con bajos potenciales de ionización lo que hace que se puedan sintetizar

hasta 15 marcas diferentes. Los lantánidos poseen pesos atómicos elevados lo que reduce las posibles interferencias en el plasma y no están presentes en las matrices biológicas, lo que hace que se puedan medir con límites de detección bajos, del orden de las ppt. Por último, el ICP permite la cuantificación de estos a través de una calibración externa con sales de lantánidos y en aquellos que presenten isótopos, como el Eu, puede emplearse también la dilución isotópica.

2.OBJETIVOS

2. Objetivos

En la introducción se ha expuesto el creciente interés en el estudio de los ácidos nucleicos debido al descubrimiento de moléculas de estos con funciones reguladoras como los microARNs o su potencial como biomarcadores y su potencial actividad terapéutica. Las metodologías analíticas clásicas con detección radiactiva, enzimática o fluorescente para el estudio de ácidos nucleicos han sido una buena herramienta para el conocimiento de estas biomoléculas pero sus limitaciones hacen necesaria la búsqueda de nuevas metodologías con nuevos sistemas de detección que proporcionen resultados más exactos y precisos. En este Trabajo Fin de Máster se pretende la síntesis de oligonucleótidos marcados y la evaluación de su aplicación como sondas de hibridación en análisis de ADN y ARN de secuencia específica mediante la metodología híbrida HPLC-ICP-MS. Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Utilizar el compuesto quelante DOTA-Maleimida (DOTA-Mal) para crear un complejo con diferentes iones lantánidos (Ln^{3+}) con la finalidad de marcar un oligonucleótido de secuencia conocida.

2. Utilizar estos oligonucleótidos marcados para detectar las secuencias específicas de ADN o ARN de interés, es decir, la utilización de estos oligonucleótidos como sondas de detección. Esta detección se lleva a cabo mediante la reacción de hibridación de secuencias complementarias. Se utilizan para ello secuencias análogas a microARNs conocidos.

3. Caracterización de las sondas de hibridación sintetizadas mediante la monitorización simultánea del ^{31}P de cada grupo fosfato del oligonucleótido y del lantánido del complejo utilizado como marca.

4. Desarrollo de una metodología que permita la monitorización de la hibridación entre sondas y analitos o dianas mediante HPLC-ICP-MS.

5. Evaluación de las características analíticas del método desarrollado.

3.EXPERIMENTAL

3. Experimental

3.1. Instrumentación

Espectrómetros de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

El ICP-MS es una de las técnicas más versátiles y con mejores resultados en la determinación de elementos en diferentes matrices, como las biológicas. En este tipo de espectrómetros de masas, los iones se forman en un plasma de Ar que se constituye en una antorcha de cuarzo a presión atmosférica mediante la aplicación de radiofrecuencias (RF). La antorcha está formada por tres canales concéntricos. Por el canal central fluye el gas portador o '*carrier'* que consiste en un flujo de Ar que contiene el aerosol de la muestra formado en el nebulizador a un flujo de alrededor de 1 $L \cdot min^{-1}$. Por el canal exterior pasa un flujo mucho mayor de Ar (12-20 $L \cdot min^{-1}$) y sirve para refrigerar la antorcha y suministrar Ar para la formación del plasma (gas plasmógeno). Finalmente, por el canal intermedio pasa un flujo de Ar auxiliar de unos 0-2 $L \cdot min^{-1}$ que centra el plasma.

La antorcha está rodeada por una bobina de inducción sobre la que se aplica una potencia de RF creando una corriente alterna que oscila y origina un fuerte campo electromagnético en el interior de la antorcha. El plasma se forma al sembrar electrones con un Tesla que se aceleran en dicho campo y, al chocar con los átomos de Ar, los ionizan formando Ar^+ y más electrones que dan lugar a una reacción en cadena que genera el plasma.

El plasma puede llegar a alcanzar los 5000-10000 K. La muestra en forma de un fino aerosol líquido se introduce a través del canal central de la antorcha al plasma y se provoca entonces la desolvatación, vaporización, atomización e ionización de sus componentes. Los diferentes elementos se ionizan en mayor o menor grado en función de la densidad electrónica del plasma, la temperatura y sus potenciales de ionización. La mayoría de los elementos de la tabla periódica, como los lantánidos, tienen un primer potencial de ionización menor de 9 eV y su grado de ionización en el plasma supera el 90 %.

Los iones formados, que son idealmente monopositivos, deben ser introducidos al analizador de masas. Para ello, se necesita de una interfase que permita el paso de las condiciones de alta temperatura y presión atmosférica en el plasma al ultra-alto vacío y baja temperatura del interior del analizador. Esta interfase consiste en dos conos metálicos de Ni o Pt, el *sampler* y el *skimmer* separados por una cámara de expansión de una presión intermedia. Cuando los iones pasan el *skimmer,* la presión es de 10^{-5} Torr proporcionada por una bomba turbo-molecular. Una vez en el analizador de masas, que puede ser de diferentes tipos, los iones se separan, como se ha mencionado, en función de su relación m/z. Finalmente, los iones son detectados generalmente en un multiplicador de electrones secundarios (SEM).

En este Trabajo Fin de Máster se han utilizado dos equipos de ICP-MS: ICP-MS de tipo cuadrupolo Agilent 7700 Series y un ICP-MS de doble enfoque (DF) Thermo Element 2.

ICP-MS con analizador tipo cuadrupolo Agilent 7700 Series

Se empleó el modelo 7700 Series con analizador de masas cuadrupolo de Agilent Technologies (Tokio, Japón). Un cuadrupolo está formado por cuatro rodillos cilíndricos o hiperbólicos de igual longitud y diámetro, normalmente de acero inoxidable. Mediante la aplicación de una determinada corriente continua entre dos de estos y un campo de RF en el otro par, los iones de una m/z seleccionada consiguen atravesar los rodillos siguiendo una trayectoria estable y llegar al detector mientras que los restantes son expulsados del cuadrupolo.

Este equipo posee también un sistema de octapolo de reacción para la eliminación de interferencias espectrales situado entre el sistema de lentes iónicas y el cuadrupolo analizador. Aunque no se ha presurizado esta celda de reacción con ningún gas, se utiliza como guía de iones y ayuda a obtener mayor sensibilidad. Se ha utilizado el equipo como detector acoplado a cromatografía HPLC formando el sistema SEC-ICP-MS. Los parámetros de operación utilizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. *Parámetros de medida SEC-ICP-MS en Agilent 7700 Series*

Potencia de radiofrecuencia	1550 W
Flujo plasmógeno	15 L·min^{-1}
Flujo auxiliar	1 L·min^{-1}
Flujo portador	1,11 L·min^{-1}
Conos	Ni
Nebulizador	MicroMist (neumático concéntrico)
Cámara de nebulización	Scott
Isótopos monitorizados	^{159}Tb
Columna	Superdex Peptide 10/30 GL
Volumen de inyección	20 µL
Fase móvil	Acetato de amonio 50 mmol·L^{-1}, pH 6,5
Flujo fase móvil	600 µL·min^{-1}

El cuadrupolo no ofrece una resolución suficiente para que la determinación de fósforo no se vea afectada por sus interferentes poliatómicos, sin embargo, es perfectamente válido para la medida de lantánidos que al presentar un peso atómico elevado no están interferidos.

ICP-MS con analizador de doble enfoque Thermo Element 2

Los componentes de este equipo se esquematizan en la Figura 11. El equipo Thermo Element 2 de Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania) está provisto de un nebulizador concéntrico convencional, una cámara de nebulización de doble paso sin refrigeración y una antorcha de cuarzo tipo Fassel. Los conos *sampler* y *skimmer* son de Ni, con un diámetro interno de 1 mm y 0,5 mm, respectivamente. El detector de masas es de tipo doble enfoque y el detector tipo SEM.

El analizador de doble enfoque consta de un sector magnético (MSA) y un sector electrostático (ESA). En el MSA los iones se separan en función de su m/z según el campo magnético aplicado y en el ESA se focalizan los iones en función de su energía cinética aplicando un potencial de corriente continua. De esta manera, se estrechan los haces de iones ya separados en el MSA. En este caso, el enfoque magnético se realiza previamente al electrostático. Este tipo de geometría recibe el nombre de Nier-Johnson inversa.

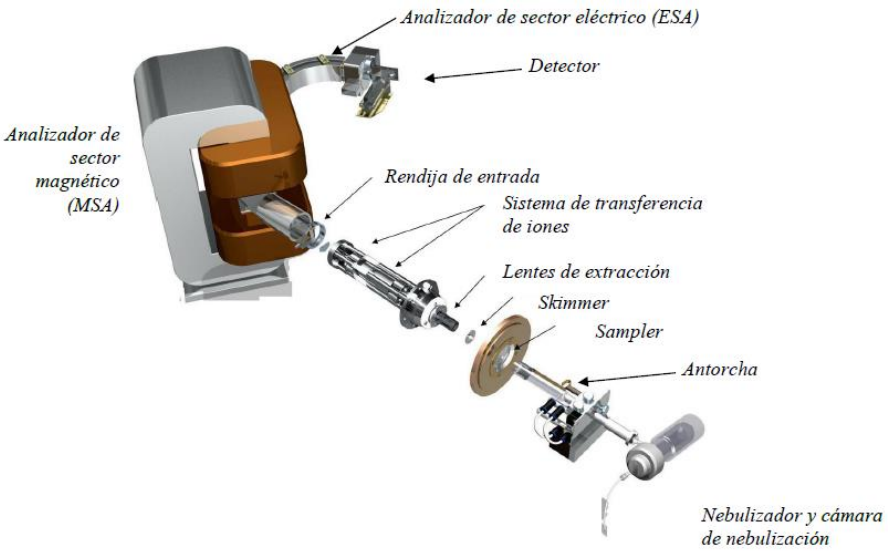


***Figura 11**. Componentes del ICP-MS Element 2.*

El poder de resolución que este equipo ofrece se puede ajustar cambiando la apertura de la rendija de entrada en el analizador, pudiendo trabajar en tres modos: resolución baja (R_s=300), media (R_s=4000) y alta (R_s=10000). La ganancia en resolución implica también una pérdida de sensibilidad ya que la rendija de entrada permite el paso de menos iones.

Aunque el ICP genera iones monopositivos, también se pueden generar especies poliatómicas que solapen la m/z del ión a medir, es decir, den lugar a interferencias poliatómicas. Esto ocurre para la medida del ^{31}P con especies como $^{14}N^{17}O^{+}$, $^{15}N^{16}O^{+}$, $^{14}N^{16}O^{1}H^{+}$. Por ello, este equipo se ha utilizado para le medida del fósforo realizada para caracterizar las sondas de hibridación sintetizadas ya que su utilización en el modo de media resolución permite la separación de la señal correspondiente al ^{31}P de la señal de sus principales interferencias como se puede ver en la Figura 12.

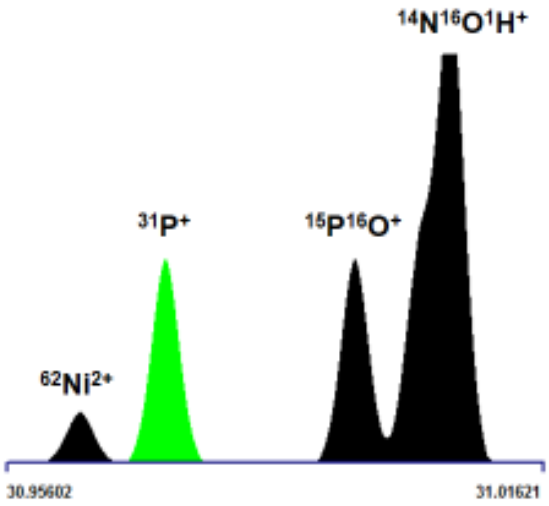


***Figura 12**. Espectro de masas en Element 2 en media resolución, $^{31}P^{+}$ separado de sus interferencias.*

Los parámetros de medida utilizados en el ICP-MS Thermo Element 2 se pueden ver en la Tabla 2.

***Tabla 2.** Parámetros de medida del ICP-DF-MS (Thermo Element 2)*

Potencia de radiofrecuencia	1350 W
Flujo plasmógeno	15,50 L·min^{-1}
Flujo auxiliar	0.90 L·min^{-1}
Flujo portador	0,90 L·min^{-1}
Conos	Ni
Nebulizador	Meinhard
Cámara de nebulización	Scott
Isótopos monitorizados	^{31}P, ^{159}Tb, ^{103}Rh
Resolución	Media (R_s=4000)

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida HPLC en columna es una técnica de separación en la que la muestra se disuelve en una fase móvil líquida que se hace pasar a través de una fase estacionaria inmiscible que se mantiene fija en una columna. Las fases se eligen de manera que los componentes de la muestra se distribuyan de manera distinta entre ambas y se separen.

El equipo de HPLC es el Agilent modelo 1100 series convencional (Agilent, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba cuaternaria, desgasificador en línea mediante ultrasonidos, sistema de termostatización de columnas, automuestreador con inyección automática y un detector de *Diode Array* UV-VIS con lámparas de Deuterio y Wolframio (190-950 nm). En este caso se emplearon 260 nm como longitud de onda.

Para las separaciones cromatográficas se utilizó la columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia). Es una columna de 30 cm de largo y 10 mm de diámetro interno cuyo mecanismo de separación es la exclusión por tamaños, explicada en la introducción. A modo de recordatorio, decir que es un mecanismo en el que los componentes de la muestra se separan en función de su tamaño molecular sin interacción física o química con la fase estacionaria. En la Tabla 3 se reflejan los parámetros utilizados para las separaciones cromatográficas en este equipo.

Tabla 3. *Condiciones de HPLC-SEC*

Columna	Superdex Peptide 10/300 GL
Volumen de inyección	20 µL
Fase móvil	Acetato de amonio, 50 mM, pH 6,5
Flujo	600 $\mu L.min^{-1}$
Detección	UV: 260 nm

Puesto que en la actualidad el acoplamiento HPLC-ICP-MS es la técnica híbrida más poderosa y versátil para la determinación de biomoléculas que contengan o tengan asociados heteroátomos, también se utilizó un equipo de HPLC convencional acoplado a ambos espectrómetros ICP-MS comentados. Este está compuesto por una bomba de alta presión de doble pistón Shimazdu LC-20 AD (Shimazdu Corporation, Kyoto, Japón) y una válvula de inyección Rheodyne modelo 7125 con bucle de inyección de PEEK® de 20 µL. El acoplamiento al detector ICP-MS es sencillo debido a que el flujo de fase móvil utilizado, 0,6 $mL \cdot min^{-1}$, es

compatible con el empleo de nebulizadores convencionales. Este acoplamiento se realiza mediante un tubo de PEEK® que conecta la salida de la columna cromatográfica con la entrada del nebulizador.

Otra instrumentación

- Balanza analítica de precisión XB220 A de Precisa Instrument Ltd. (Suiza).
- pH-metro modelo micropH2000 de Crison Instruments, S.A. (Barcelona, España).
- Baño de agua termostatizado de control digital modelo Digiterm 100 de J.P. Selecta (Barelona, España).
- Agitador magnético Vortex VelP (Scientifica, España).

3.2. Material y Reactivos

Los oligonucleótidos de ADN diana o analitos fueron sintetizados por Life Technologies-Thermo Scientific (MA, USA) y los oligonucleótidos modificados con un grupo tiol para su posterior marcaje y utilización como sonda, por Thermo Fisher Scientific. Para la reducción de grupos disulfuro de estos se utilizó una disolución de ditiotreitol o DTT de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Con el objetivo de purificar los oligonucleótidos reducidos de excesos de DTT se utilizaron columnas Illustra NAP™-10 Columns Sephadex, DNA Grade (GE Healthcare, Madrid, España).

Para el marcaje de las sondas se utilizó el compuesto 2,2',2''-(10-(2-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl) de CheMatec Macrocycle design Technologies (Dijon, Francia) que es el quelante DOTA, mencionado en la introducción, modificado con el grupo maleimida para la unión a los oligonucleótidos tiolados. Los complejos fueron constituidos con sales de lantánidos hexahidratadas, cloruro de terbio ($TbCl_3 \cdot 6\ H_2O$) y de europio ($EuCl_3 \cdot 6\ H_2O$), de Sigma-Aldrich.

Las disoluciones tampón y fases móviles necesitadas en las distintas etapas de este Trabajo Fin de Máster fueron realizadas utilizando acetato de amonio (Sigma Aldrich), fosfato de sodio monobásico monohidratado y fosfato de sodio dibásico monohidratado (PanReac AppliChem, España). Además, se realizó una fase móvil de limpieza de la columna añadiendo pentaacetato de dietilentriamina o DTPA (Sigma-Aldrich) al acetato de amonio. Las fases móviles fueron desgasificadas con He de 99,999 % de pureza (Air Liquide, Madrid, España). El gas Ar para los equipos de ICP-MS, de la misma pureza, fue suministrado también por Air Liquide.

También se utilizaron patrones de fósforo, terbio y rodio a una concentración de 1000 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de Merck (Darmstadt, Alemania) para ICP.

Todas las disoluciones fueron preparadas mediante agua ultrapura (resistividad 18,2 MΩxcm) obtenida a partir de agua destilada utilizando un sistema Milli-Q (Millipore Co, Bedford, MA, EEUU).

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis de las sondas de hibridación.

La síntesis de las sondas de hibridación que son los oligonucleótidos complementarios a las secuencias de los analitos se realiza mediante cuatro etapas que se explican a continuación.

4.1.1. Reducción de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados como sonda de detección son de cadena sencilla y presentan una modificación en uno de sus extremos (3' o 5') consistente en un grupo alquilo-tiol protegido por un grupo R consistente en una cadena hidrocarbonada constituida por 6 grupos metileno, $(CH_2)_6$. La estructura de estos sería la siguiente:

R-S-S-$(CH_2)_6$-5´-OLIGONUCLEÓTIDO-3´

El grupo tiol está protegido en su forma oxidada de manera que no es reactivo. Para activar la reactividad de este, se necesita su reducción y, para ello, se utilizó ditiotreitol (DTT). La estructura del DTT y su mecanismo de acción se pueden ver en la Figura 13. Es una molécula que se utiliza típicamente como agente reductor ya que para la reducción de grupos tiol, se oxida formando un anillo de 6 miembros muy estable que posee un enlace disulfuro intramolecular.

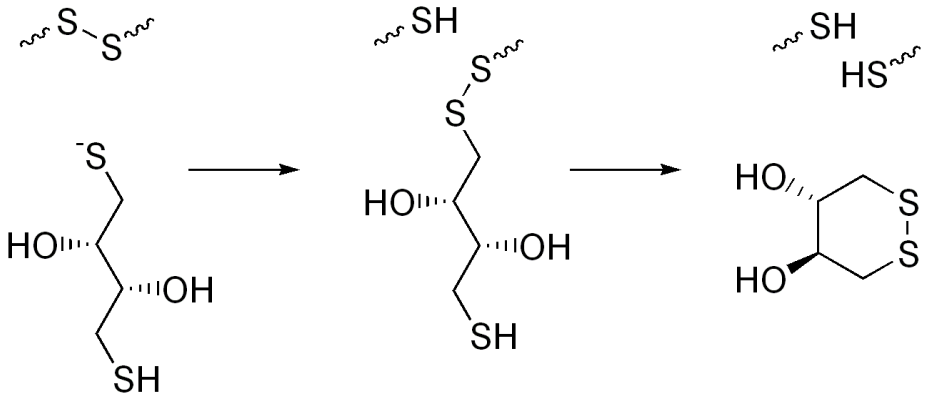


Figura 13. *Estructura DTT y mecanismo de acción.*

Los oligonucleótidos sonda, suministrados por la respectiva casa comercial en estado liofilizado, se resuspenden en una disolución reguladora de fosfatos 50 mM, pH 8,5 a una concentración teórica de aproximadamente 100 pmol·µL^{-1}. Estos oligonucleótidos se mezclan con la cantidad necesaria de una disolución inicial de DTT 0,1 mol·L^{-1} de manera que siempre se encuentre el agente reductor en un exceso molar de 1:100. La mezcla se deja reaccionar durante 1 hora a 37ºC. El tampón de fosfatos se utiliza para controlar el pH y mantenerlo en un valor superior a 7,5, de lo contrario, se puede comprometer el efecto reductor del DTT.

Una vez producida la reacción, se deben purificar los oligonucleótidos y eliminar el exceso de DTT utilizado. Esto se lleva a cabo utilizando las columnas illustra NAP™ Sephadex™ G-25 DNA Grade (GE Healthcare). Estas son unas columnas de flujo por gravedad que se utilizan para la purificación de oligonucleótidos y pequeños fragmentos de ADN, así como para el cambio del tampón en el que están disueltos o su desalado. En este caso, se utilizan tanto para desalar como para cambiar el tampón utilizado. Estas columnas preparativas están rellenas de un gel de dextrano y su mecanismo de separación es una filtración en gel.

En primer lugar se acondiciona la columna con 15 mL del tampón que se va a utilizar para eluir el oligonucleótido, en este caso, acetato de amonio 50 mM pH 6,5. A continuación se añade un volumen apropiado del oligonucleótido que en este caso está disuelto en un tampón de fosfatos y queda embebido en la columna. Por último, se añade el volumen deseado del tampón de elución. El fragmento de ADN, por su mayor tamaño, eluye con este tampón si retenerse en la columna. Sin embargo, el exceso de DTT queda retenido en la resina de dextrano.

Los oligonucleótidos purificados se conservan en el congelador a -20ºC hasta su utilización.

4.1.2. Síntesis de los complejos DOTA-Mal-Ln^{3+}

Los complejos que se utilizaron para marcar la sonda se realizaron con un quelante debido a su capacidad para formar complejos estables con iones de metales pesados. En este caso, se han utilizado lantánidos que puedan ser medidos de forma sensible por ICP-MS y por las ventajas que ofrecen, expuestas en la introducción. El quelante empleado es el *2,2',2''-(10-(2-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)* que es el DOTA modificado con el grupo maleimida (ver Figura 10). Los lantánidos (Ln) fueron aplicados en forma de sales hidratadas, en este caso, $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ y $TbCl_3 \cdot 6H_2O$.

Para la formación del complejo se utiliza un exceso 1:4 de lantánido. Se prepararon disoluciones acuosas a una concentración de 40 $mmol \cdot L^{-1}$ de las sales de lantánido y 10 $mmol \cdot L^{-1}$ de DOTA-Mal en una disolución reguladora de acetato de amonio 20 $mmol \cdot L^{-1}$, pH 6,2. Volúmenes iguales de ambas se mezclaron y se llevaron a un volumen final de 400 µL con tampón de acetato de amonio 20 $mmol \cdot L^{-1}$, pH 6,2. Es importante que el pH en esta reacción sea inferior a 7 para no comprometer la estabilidad del grupo maleimida que será el utilizado para reaccionar con el oligonucleótido sonda de secuencia complementaria al analito.

Esta mezcla se deja reaccionar a 37ºC durante 2 horas.

4.1.3. Marcaje oligonucleótidos.

Una vez obtenidos los oligonucleótidos reducidos y purificados que se quieren marcar y sintetizado el complejo DOTA-Mal-Ln^{3+}, se puede llevar a cabo el marcaje, que es el último paso para la síntesis de estas sondas de hibridación.

La reacción consiste en la formación de un enlace covalente entre el tiol reducido de los oligonucleótidos con el grupo maleimida presente en los complejos metálicos DOTA-Mal-Ln^{3+}. En la Figura 10 se esquematiza la reacción típica entre el grupo maleimida y un tiol genérico y se ve que la reacción sucede a través del carbono 3.

La reacción de marcaje se llevó a cabo en un tampón de acetato de amonio 20 mmol·L^{-1}, pH 6.2 y con un exceso molar del complejo metálico de 1:4 con respecto al oligonucleótido. Se dejó reaccionar durante 2 horas a 37ºC. Se puede ver un esquema de todas las etapas del proceso de síntesis de las sondas de hibridación en la Figura 14.

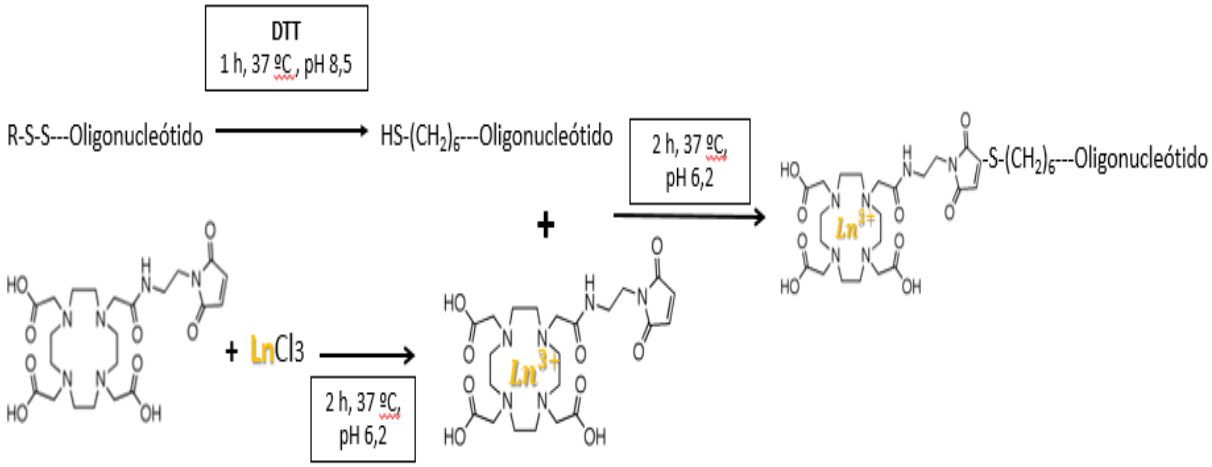


Figura 14. *Etapas de la síntesis de las sondas de hibridación.*

Estas tres etapas se han aplicado para sintetizar dos sondas de hibridación de 11 nucleótidos las dos. Una de ellas se marcó en el extremo 3' y la otra en el extremo 5', ambas utilizando Terbio como lantánido. Su secuencia se puede ver en la Figura 15.

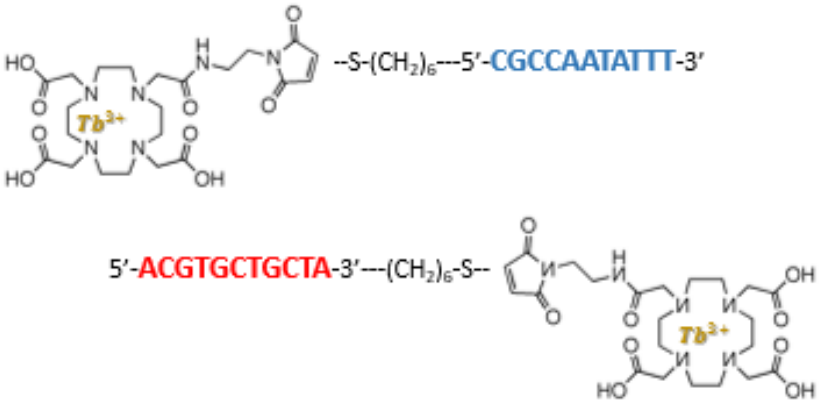


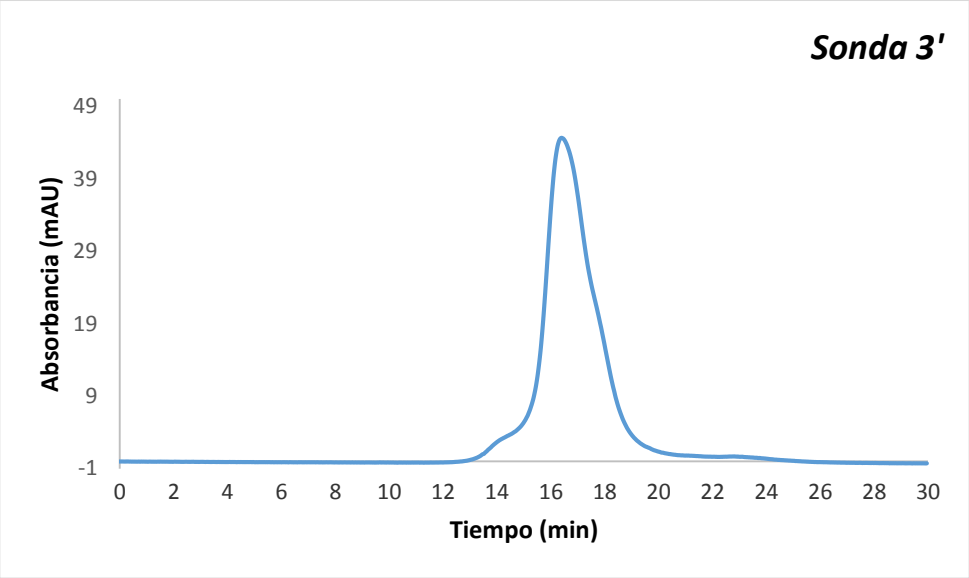
Figura 15. *Sondas de hibridación sintetizadas.*

4.2. Purificación de las sondas de hibridación

Una vez sintetizadas las sondas de hibridación se deben someter a un proceso de purificación para eliminar todos los posibles excesos de los reactivos utilizados en su síntesis, sobre todo, separarlas del exceso de complejo de la última etapa ya que este contiene lantánido que interfiere en la detección por ICP-MS.

Este proceso se realizó mediante cromatografía HPLC por exclusión por tamaños utilizando la columna Superdex Peptide 10/30 y el equipo Agilent 1100 series. Como fase móvil se utilizó acetato de amonio 50 mmol·L^{-1} ajustando el pH a 6,5 y utilizando un flujo de 0,6 mL·min^{-1}. El volumen de inyección fue de 20 µL. Se aprovechó la capacidad de las bases nitrogenadas del ADN para absorber la radiación UV, presentando un máximo de absorción a 260 nm. Por lo tanto, la purificación consistió en una recogida de la fracción correspondiente a las sondas de hibridación. Para ello, se colocó una conexión de tubo de PEEK® a la salida del detector del equipo para poder visualizar la señal correspondiente simultáneamente a la purificación.

Los cromatogramas de las sondas marcadas en 3' y en 5' (sonda 3' y sonda 5', respectivamente) se representan en la Figura 16.



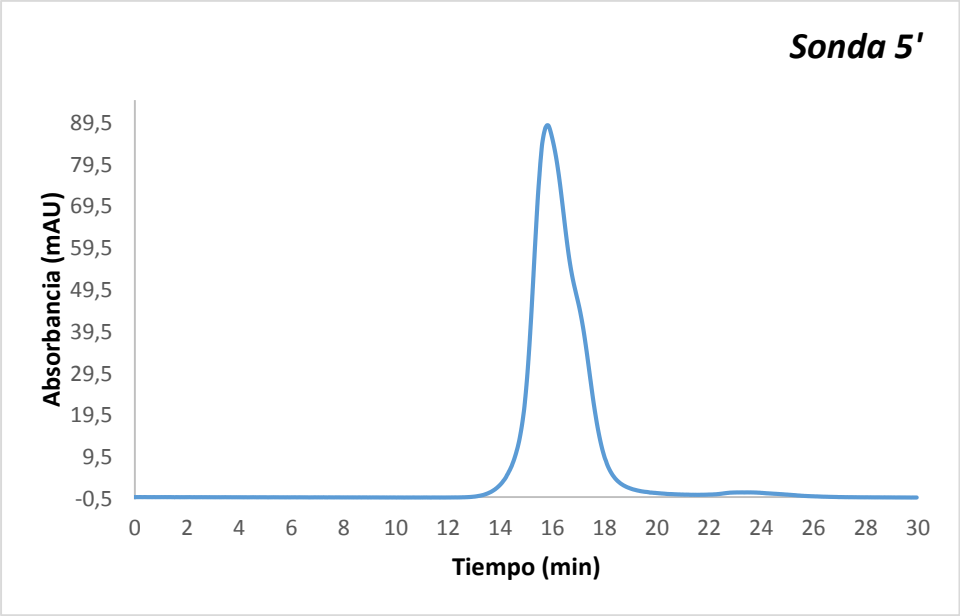


Figura 16. *Cromatogramas obtenidos mediantes HPLC-SEC-UV siguiendo la absorbancia a 260 nm para las sondas de hibridación marcadas.*

Como se puede observar en los cromatogramas la recogida de fracción se realizó entre los 14 y los 20 min aproximadamente. No obstante, para asegurar de que este modo se consigue separar las sondas del DOTA-Mal-Tb^{3+} utilizado para su síntesis se inyectó dicho complejo en el sistema SEC-ICP-MS utilizando el acoplamiento mencionado en la instrumentación. La fase móvil, el flujo utilizado y el volumen de inyección son iguales que en el caso anterior y son las utilizadas a lo largo de todas las medidas de este trabajo. En la Figura 17 se recoge el cromatograma obtenido.

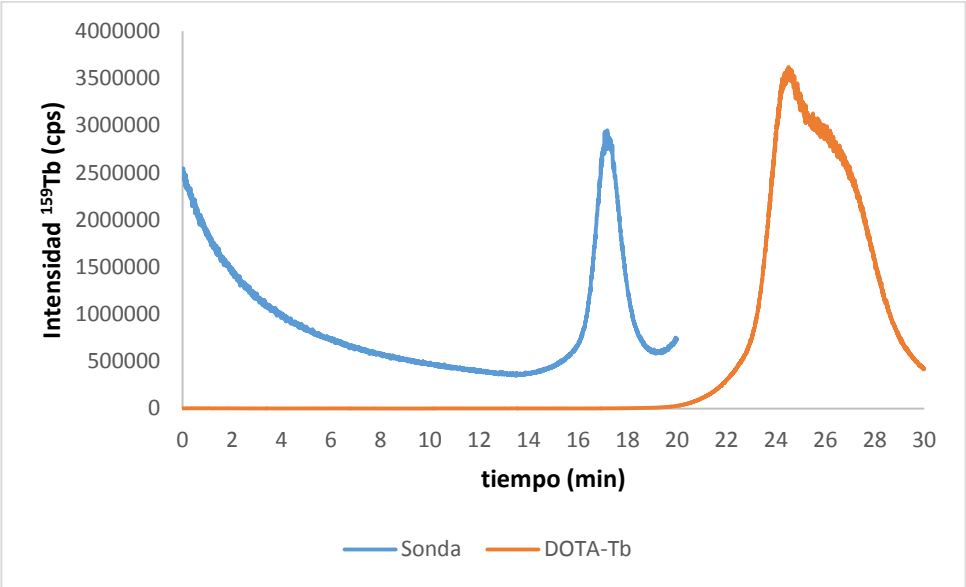


Figura 17. *Cromatograma obtenido en SEC-ICP-MS monitorizando el ^{159}Tb para la sonda de hibridación y el complejo DOTA-Mal-Tb^{3+}.*

Mientras que las sondas 3' y 5' presentan un tiempo de retención de 16,4 y 15,8 min, respectivamente, se puede ver que el complejo DOTA-Mal-Tb^{3+} eluye más tarde de la columna de SEC debido a su menor tamaño, a tiempos de retención cercanos a los 25 min, por lo que se consigue la purificación de las sondas.

4.3. Caracterización de las sondas de hibridación

Por último, se procedió a la caracterización de las sondas de hibridación sintetizadas. Dicha caracterización consiste en la determinación de la relación estequiométrica entre el ^{31}P y el ^{159}Tb.

Ambas sondas de hibridación utilizadas, aunque de diferente secuencia, están constituidas por 11 nucleótidos. Se sabe que cada nucleótido contiene un grupo fosfato y, por lo tanto, un átomo de fósforo. Por otro lado, cada sonda de hibridación está marcada en un extremo por un complejo en el que está implicado un ión de lantánido, en este caso, Tb^{3+}. Entonces, para una sonda perfectamente marcada se espera una relación molar teórica Tb:P de 1:11.

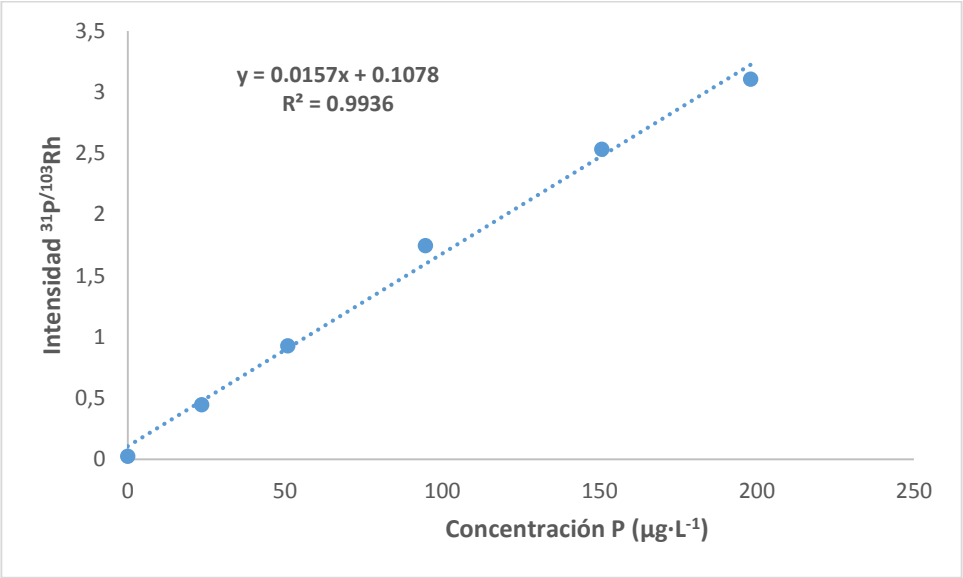
El producto de la síntesis de las sondas se inyectó en SEC-ICP-MS y se recogió la fracción correspondiente a las sondas monitorizando la señal del ^{159}Tb. Esto se realizó para evitar posibles impurezas de la síntesis que puedan aumentar la señal del lantánido y no correspondan a la sonda de hibridación, interfiriendo en la relación calculada.

La recogida de fracción en esta ocasión se hace desconectando la conexión entre la salida de la columna y el nebulizador del ICP-MS y recogiendo directamente la muestra a medida que eluye de la columna al tiempo de retención característico de las sondas.

Para la determinación de ambos elementos, se realizó un calibrado de totales de ^{31}P y ^{159}Tb utilizando una calibración con patrón interno, en este caso, ^{103}Rh. Para ello se utilizó el equipo de ICP-MS Thermo Element 2 con analizador de masas de doble enfoque (DF) en modo de media resolución.

Se estableció un rango dinámico lineal diferente para ambos isótopos, manteniendo constante la concentración del patrón interno en todos los patrones de calibrado. Esto se debe a que la sensibilidad del equipo es mucho mayor para la medida de los lantánidos que para el fósforo. Por tanto, para las muestras, tras estimar la concentración de las sondas de hibridación después de todas las etapas de síntesis y de purificación, se realizó una dilución diferente de cada una de ellas para la determinación del fósforo y el terbio, este último, con un mayor factor de dilución. Además, a las muestras se añadió también ^{103}Rh a la misma concentración que los patrones de calibración, 2 $\mu g \cdot L^{-1}$. Todos los patrones y muestras fueron preparados en HNO_3 al 2 %. En la Figura 18 se pueden observar las relaciones de calibración para ambos isótopos.

(a)



(b)

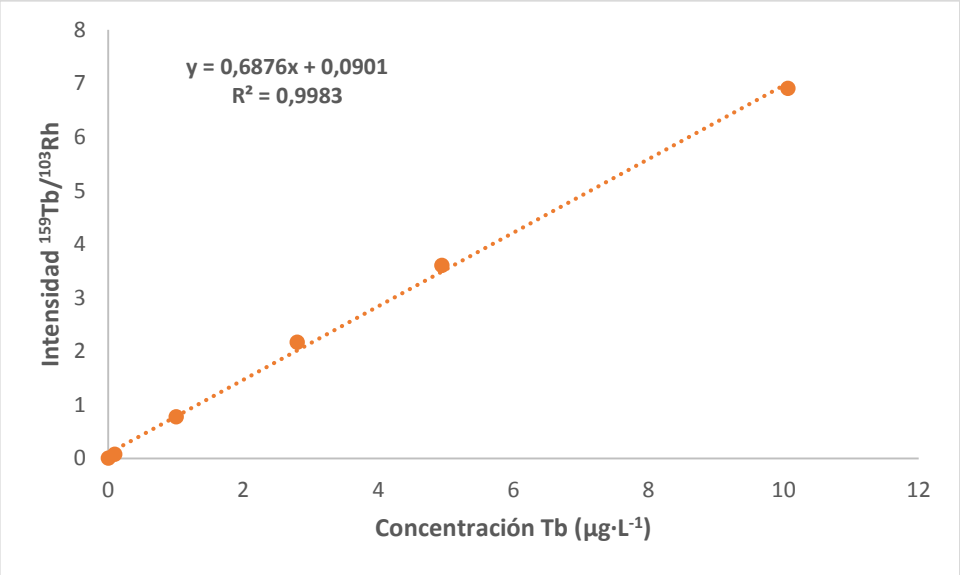


Figura 18. *Calibrado de totales de (a) ^{31}P y (b) ^{159}Tb en ICP-DF-MS utilizando ^{103}Rh como patrón interno.*

Tras la medida de totales en las muestras preparadas de las sondas, se obtuvieron los resultados de la Tabla 4. Una vez hallada la concentración en las sondas de partida, se puede hallar la relación estequiométrica entre el fósforo y el terbio teniendo en cuenta la masa atómica de ambos.

Tabla 4. *Resultados de la medida de las sondas de hibridación en ICP-DF-MS.*

	Sonda 3'		**Sonda 5'**	
	^{31}P	**^{159}Tb**	**^{31}P**	**^{159}Tb**
Concentración/µg·L^{-1}	38,2	11,8	78,7	34,9
Relación	**16,70**	**1**	**11,56**	**1**

Para la sonda marcada en el extremo 5' se obtiene una relación estequiométrica Tb:P de 1:11,56 que es un valor muy cercano y concordante al teórico por lo que se puede decir que se ha llevado a cabo la síntesis de esta sonda de hibridación con alto rendimiento y, además, la purificación y separación de la sonda del exceso del complejo de marcaje ha sido efectiva.

Sin embargo, para la sonda marcada en el extremo 3' la relación Tb:P es de 1:16,70. Esto quiere decir que hay más de 11 nucleótidos por cada marca y, por tanto, más de un oligonucleótido por cada complejo de marcaje. Una posible explicación a esto es que no todos los oligonucleótidos utilizados para la síntesis de la sonda han sido marcados correctamente, es decir, una parte de las sondas no está marcada, probablemente debido a algún problema en las etapas de su síntesis, anteriormente explicada.

4.4. Estudio de hibridación

A lo largo de este Trabajo Fin de Máster se ha utilizado como analito una secuencia de ADN análoga al microARN conocido como miR16, es decir, su misma secuencia de bases nitrogenadas sustituyendo uracilo por timina y la ribosa por desoxirribosa. El hecho de utilizar un oligonucleótido de ADN en lugar de ARN se debe a que el grupo OH adicional en el C2 de la ribosa en el ARN hace que su reactividad sea más alta y se requiera de mayor precaución para su manipulación. Así, existen enzimas ribonucleasas capaces de digerir el ARN que se encuentran ampliamente en piel, cabello y saliva.

La relación de este miARN con la leucemia linfocítica crónica se ha expuesto en la introducción. Se trata de un ARN de cadena sencilla de 22 ribonucleótidos cuya secuencia es la siguiente:

ARN: 5'-**UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG**-3'

ADN: 5'-**TAGCAGCACGTAAATATTGGCG**-3'

Para la detección de estas secuencias se podría pensar en la hibridación con una sonda complementaria en su totalidad modificada y marcada en uno de sus extremos. Sin embargo, se han aplicado las dos sondas de menor tamaño mencionadas, cada una de ellas complementaria a una mitad de la secuencia del analito y ambas marcadas en extremos opuestos. Con esto se consigue aumentar la resolución de la separación cromatográfica entre el híbrido y el exceso de sonda en SEC, ya que aunque el híbrido es del mismo tamaño, el tamaño de las sondas se reduce a la mitad y se retienen más en la columna. Además, la utilización de dos marcas en lugar de una, debería producir un aumento de hasta un 100 % en la sensibilidad de la detección. Los híbridos resultantes se pueden ver en la Figura 19.

Figura 19. *Hibridación entre sondas y analito o diana (negro).*

Como se ha mencionado, la reacción de hibridación consiste en la formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias, en este caso, de sondas y analito. La hibridación se realizó en disolución en un tampón de acetato de amonio 20 mmol·L^{-1}, pH 6,5. Para ello, se añadió un exceso de ambas sondas respecto al oligonucleótido analito cuya concentración fue de 0,1 pmol·µL^{-1}. Utilizando un baño de agua termostatizado se sometió esta mezcla a un programa de temperaturas. La primera etapa consistió en 5 min a 95ºC con el objetivo de evitar la formación de estructuras secundarias inespecíficas. Posteriormente, se realizó un descenso lento y progresivo de la temperatura hasta 37ºC. Una vez alcanzada esta temperatura, se mantuvo durante 2 horas para la correcta formación del híbrido.

Después de producirse la hibridación, se inyectó una alícuota de la mezcla resultante en SEC-ICP-MS monitorizando la señal del isótopo ^{159}Tb, así como alícuotas de ambas sondas de hibridación empleadas.

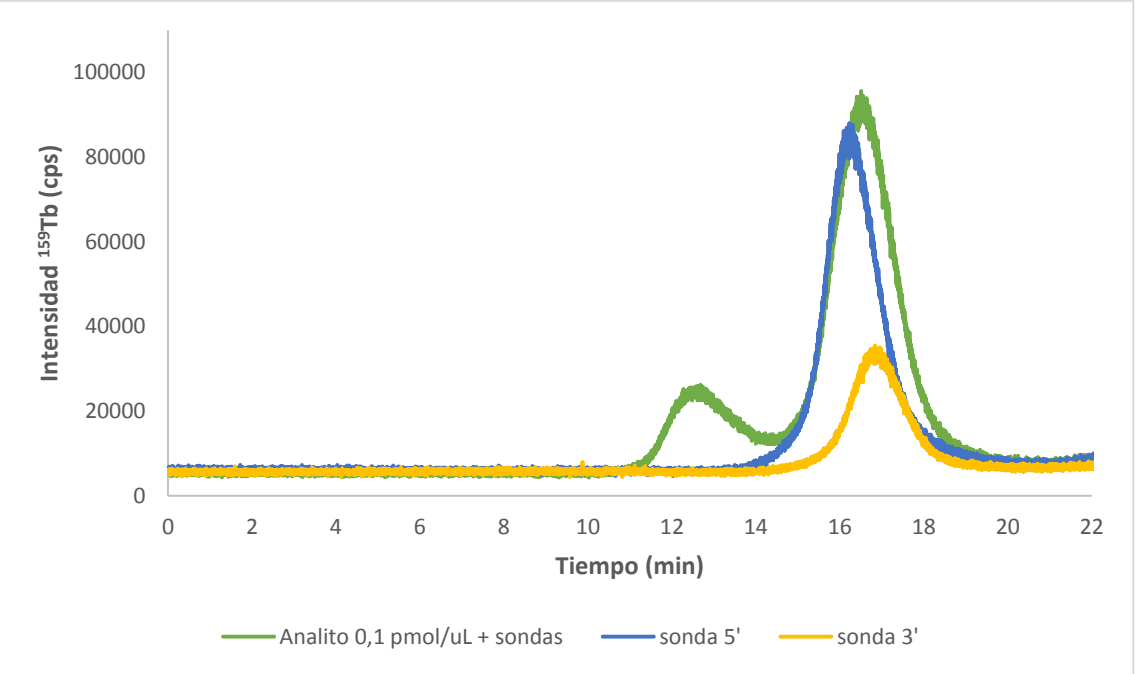


Figura 20. *Cromatogramas obtenidos mediante SEC-ICP-MS monitorizando el ^{159}Tb para las sondas libres y tras el proceso de hibridación.*

En la Figura 20 se representan los cromatogramas obtenidos. Se puede observar en esta que el tiempo de retención de las sondas se mantiene prácticamente respecto al que se obtuvo en la purificación de estas siguiendo la absorbancia a 260 nm. Sin embargo, en este caso aparece un pico en el cromatograma a un tiempo de retención menor. Este pico corresponde al híbrido formado y su tiempo es de 12,8 min, aproximadamente 3 min menor al de las sondas lo que permite su distinción de estas.

Además, se realizó el mismo proceso de hibridación aumentando la concentración del analito a 1 pmol·µL^{-1} y manteniendo la cantidad de sondas de hibridación añadidas. Esta mezcla se analizó también por SEC-ICP-MS. Como se puede ver en la Figura 21, el área del pico correspondiente al híbrido aumenta muy notablemente mientras que el exceso de sonda de hibridación disminuye. Esto confirma la naturaleza de ambos picos del cromatograma.

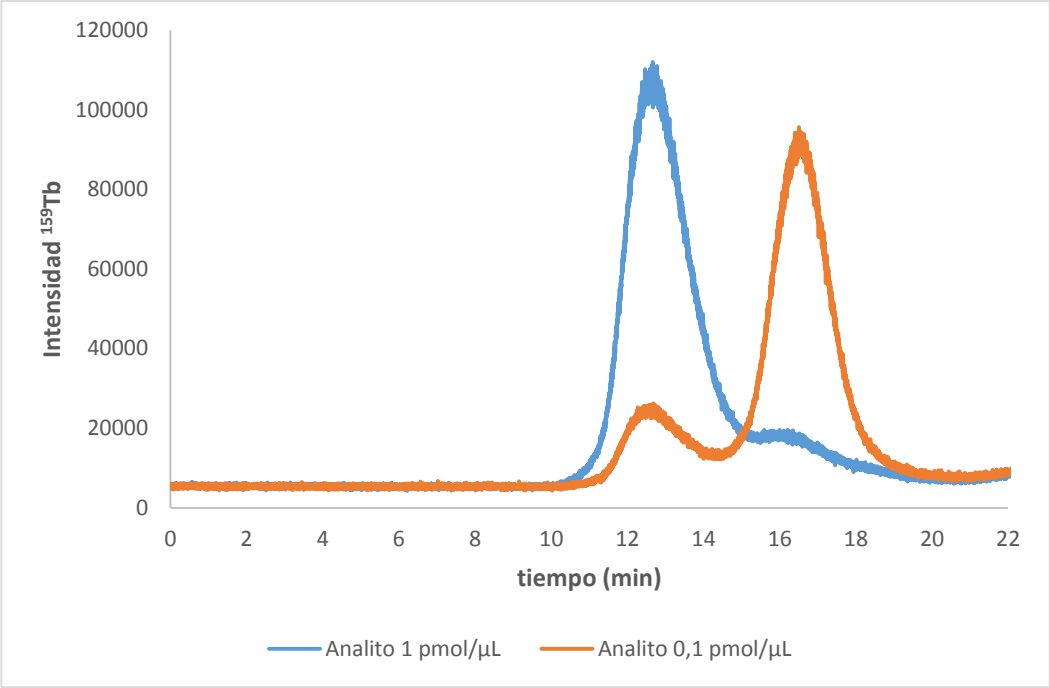


Figura 21. *Cromatogramas obtenidos mediante SEC-ICP-MS monitorizando el ^{159}Tb para dos concentraciones diferentes de analito.*

De ambas figuras se concluye que la metodología con detección mediante el sistema SEC-ICP-MS propuesta es válida para el seguimiento de la hibridación entre sondas de hibridación y analitos, que permite la determinación de oligonucleótidos de secuencia específica.

4.5. Características analíticas del método

Una vez comprobada la validez de la metodología desarrollada se determinaron las características analíticas de esta. Para ello se realizó la hibridación en disolución, según el procedimiento descrito anteriormente, utilizando concentraciones variables y crecientes del analito y siempre un exceso de las sondas de hibridación.

Los productos de la reacción de hibridación fueron analizados por SEC-ICP-MS obteniendo los cromatogramas de la Figura 22.

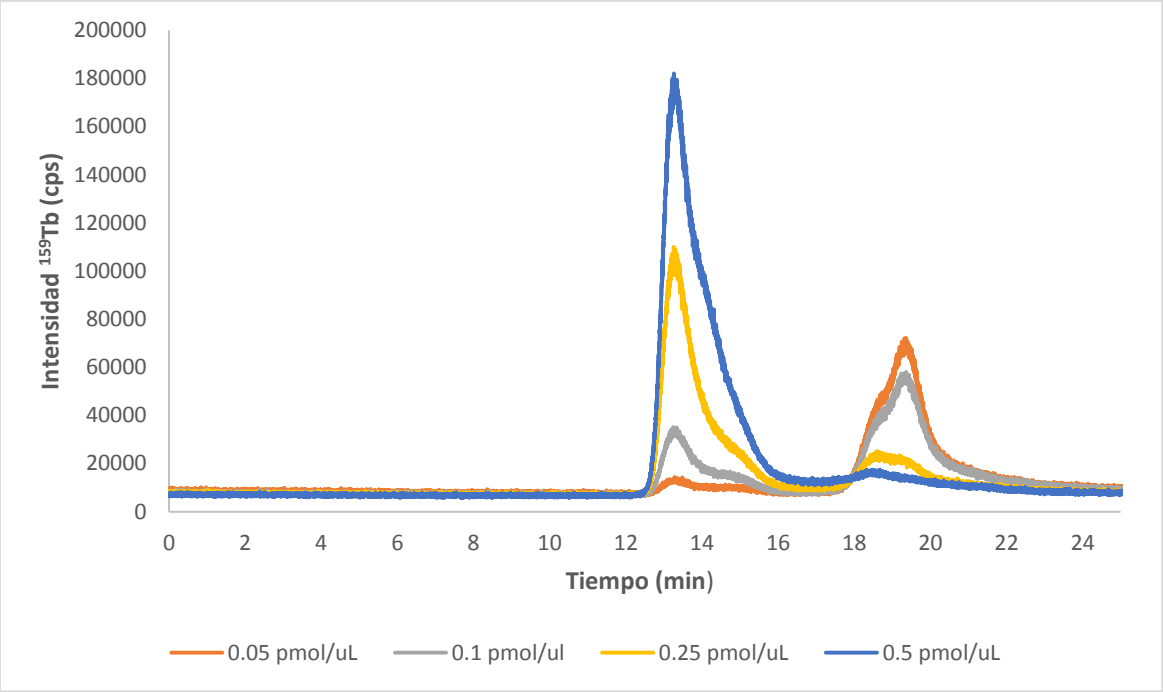


Figura 22. *Cromatograma obtenido mediante SEC-ICP-MS monitorizando el ^{159}Tb para concentraciones crecientes de analito.*

Se comprueba de nuevo como el área del primer pico, correspondiente al híbrido, aumenta a medida que se eleva la concentración del oligonucleótido analito o diana a la vez que disminuye el exceso de sonda. Para evaluar el rango dinámico lineal del método se midieron estas áreas, integrando los picos con el software de tratamiento de datos Origin 8, y se representaron frente a la concentración de analito.

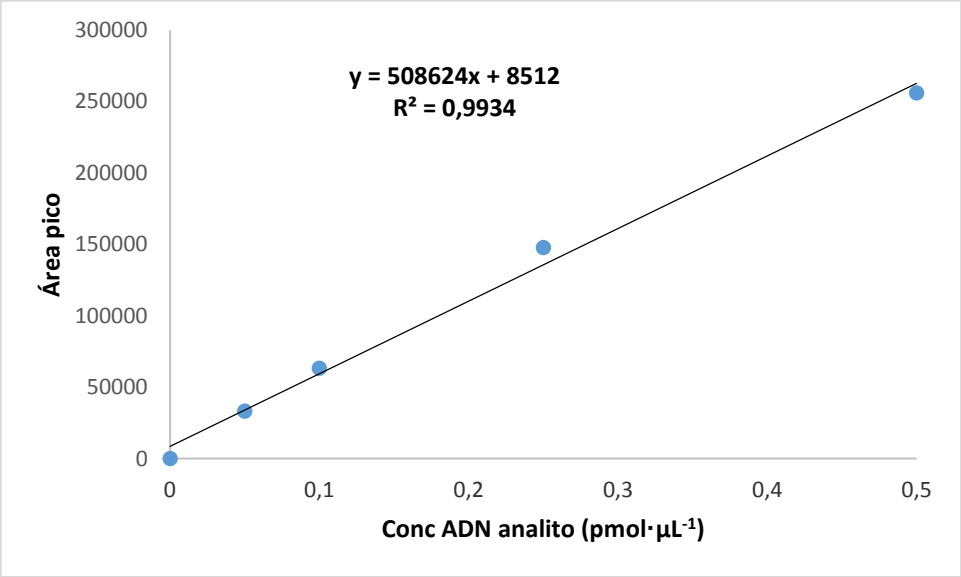


Figura 23. *Relación lineal entre el área de pico del híbrido y la concentración de analito.*

En la Figura 22, se representan los resultados obtenidos. Se aprecia un buen rango dinámico lineal desde 0,05 a 0,5 pmol·µL^{-1} (1-10 pmol de analito inyectado en el sistema SEC-ICP-MS) presentando un coeficiente de determinación, R^2, superior a 0,99.

Además, se calculó el límite de detección (LOD) que se define como la cantidad de analito más pequeña que se puede determinar dando una señal en el sistema de medida que se puede diferenciar de forma fiable del ruido de fondo. Se ha calculado como tres veces la desviación estándar del blanco dividida entre la pendiente de la recta de calibrado de la Figura 22. El valor obtenido fue de 22 fmol·µL^{-1} de analito que se corresponde con una inyección de 440 fmol de dicho oligonucleótido en el sistema de SEC-ICP-MS.

Se estima que para individuos sanos hay una concentración de miR-16 de 10^5 copias·µL^{-1} en sangre. Esto equivale a una concentración de 0,7 fg·µL^{-1} de este analito [40]. Teniendo en cuenta que se está trabajando con un analito de cadena sencilla de 11 pb y para un volumen de inyección de 20 µL, dicho valor de concentración equivale a 0,004 fmol de miR-16 que se encuentra por debajo del límite de detección del método propuesto. Por lo tanto, este analito no podría ser detectado mediante esta metodología en sangre sin la utilización de métodos de amplificación de los ácidos nucleicos.

5.CONCLUSIONES

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos a lo largo de este Trabajo Fin de Máster se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado una metodología basada en un proceso de hibridación que ha permitido la detección de un oligonucleótido de secuencia específica a través de la aplicación de sondas de hibridación marcadas con complejos DOTA-Mal-Lantánido. Dicha hibridación se ha podido seguir utilizando la técnica híbrida SEC-ICP-MS.

2. La estrategia propuesta presenta un amplio rango dinámico lineal y una buena sensibilidad con un límite de detección de 22 $fmol \cdot \mu L^{-1}$ del oligonucleótido diana o analito, en este caso, una secuencia análoga al microARN conocido como miR16.

3. La metodología SEC-ICP-MS ha permitido también la purificación de las sondas de hibridación para su posterior caracterización por ICP-DF-MS mediante la medida simultánea de la señal del fósforo y el lantánido. De esta forma, se ha podido hallar la relación estequiométrica entre ambos elementos y comprobar el rendimiento de la síntesis de las sondas de hibridación.

Tras las conclusiones establecidas en este Trabajo Fin de Máster se sugieren los siguientes trabajos futuros:

Primeramente, sería interesante evaluar la selectividad del método desarrollado sometiendo al proceso de hibridación las sondas sintetizadas con un oligonucleótido no completamente complementario en su secuencia. El ensayo más riguroso en este sentido consistiría en evaluar la capacidad de identificar un cambio producido en un solo nucleótido, lo que recibe el nombre de *single nucleotide polimorfism* (SNP) haciendo la hibridación de las sondas con un oligonucleótido que difiera del analito en tan solo un nucleótido y con el propio analito en la misma concentración y evaluando el área de pico de los híbridos correspondientes.

Tras la evaluación de las características del método, se podría estimar su aplicabilidad en la detección/determinación de secuencias específicas de microARNs en muestras reales. Para ello, sería necesaria la familiarización con las técnicas de extracción y manipulación de ARN de pequeño tamaño y la optimización de los procesos implicados.

También se propone la realización de estudios de recuperación en las etapas de síntesis de sondas de hibridación y su purificación ya que como se pudo ver en la caracterización de las

sondas, no se puede separar los oligonucleótidos marcados de los no marcados mediante SEC-ICP-MS. Esto sería también interesante para evaluar la recuperación del oligonucleótido en las columnas NAP utilizadas para eliminar el exceso del DTT. Estos estudios podrían ser realizados mediante la utilización de espectrometría de masas molecular.

Por último, para que no fuera necesaria la realización de amplificaciones del ADN, se propone el desarrollo de nuevos marcajes con moléculas capaces de unir mayor número de lantánidos como compuestos quelantes poliméricos para aumentar la sensibilidad y reducir los límites de detección.

6. Bibliografía

[1] Hübscher, U., Spadari, S., Villani, G. and Maga, G. DNA Polymerases: Discovery, Characterization, and Functions in Cellular DNA Transactions. Singapore, World Scientific Publishing (2010).

[2] Watson, J. D. and Berry, A. DNA: The Secret of Life. New York, Alfred A. Knopf (2003).

[3] Mendel, G. Experiments in Plant Hybridization. Actas de la Sociedad para el Estudio de las Ciencias Naturales de Brünn. 1-7 (1901).

[4] Miescher F. Letter I to Wilhelm His; Tübingen, February 26th, 1869. His W et al (eds) Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher - Aus dem wissenschaftlichen Briefwechsel von F. Miescher, vol 1. F. C. W. Vogel, Leipzig, pp33-38.

[5] Miescher F. Letter V to Wilhelm His; Leipzig, December 20th 1869. His W et al (eds) Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher - Aus dem wissenschaftlichen Briefwechsel von F. Miescher, vol 1. F. C. W. Vogel, Leipzig, pp39-41.

[6] Dahm, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. Human Genetics. 122, 565–81 (2008).

[7] Griffith, F. The significance of pneumococcal types. Journal of Hygiene. (Lond). 27, 113–59 (1928).

[8] Avery, OT., MacLeod, CM., and McCarty, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. Journal of Experimental Medicine. 79, 137–58 (1944).

[9] Chargaff, E., Zamenhof, S. and Green, C. Composition of human desoxypentose nucleic acid. Nature 165, 756–7 (1950).

[10] Franklin, RE. and Gosling, RG. Evidence for 2-Chain Helix in Crystalline Structure of Sodium Deoxyribonucleate. Nature 172, 156–157 (1953).

[11] Watson, JD. and Crick, FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 171, 737–738 (1953).

[12] López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L. and Serrano, M. and Kroemer, G. The hallmarks of aging. Cell 153, 1194–217 (2013).

[13] Collins, FS., Green, ED., Guttmacher, AE. and Guyer, MS. A vision for the future of genomics research. Nature 422, 835–47 (2003).

[14] http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/redirect.shtml.

[15] Meselson, M. and Stahl, FW. The Replication of DNA in Escherichia Coli. Proceedings of the National Academy of Sciencies of the United States of America. 44, 7, 671-682 (1958).

[16] Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology. Nature Methods 227, 561–563 (1970).

[17] Crick, F. On Protein Synthesis. XII Symposia of the Society of Experimental Biology. 12, 139–163 (1958).

[18] Ochoa, S. A Pursuit of a Hobby. Annual Review of Biochemistry. 49, 1–31 (1980).

[19] Holley, RW. Alanine transfer RNA. Nobel Lectures. (1968).

[20] Geiduschek, EP. and Haselkorn, R. Messenger RNA. Annual Review of Biochemistry. 38, 647–676 (1969).

[21] Burgess, RR. Rna Polymerase. Annual Review of Biochemistry. 40, 711–740 (1971).

[22] Schweet, R., Heintz, R. Protein Synthesis. Annual Review of Biochemistry. 35, 723-758 (1966).

[23] Cech, TR. Self-Splicing of Group I Introns. Annual Review of Biochemistry. 59, 543–568 (1990).

[24] Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Mardh, T., Pace, N. and Altman, S. The RNA Moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. Cell 35, 849–857 (1983).

[25] Robertson, HD., Altman, S. and Smith, J. Purification and properties of a specific Escherichia coli ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid presursor. Journal of Biological Chemistry 247, 5243–5251 (1972).

[26] Costa, FF. Non-coding RNAs: lost in translation?. Gene 386, 1–10 (2007).

[27] L. Nelson, David, M. Cox, Michael. Principles of Biochemistry. Lehninger. 4 Edición. Editorial OMEGA (2005).

[28] Watson, J. et al. Biología Molecular del Gen. Editorial Médica Panamericana (2006).

[29] Lee, RC., Feinbaum, RL., and Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75, 843–54. (1993).

[30] Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. Elegans. Cell 75, 855–862 (1993).

[31] Bartel, DP, Lee, R, and Feinbaum, R. MicroARNs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. 116, 281–297 (2004).

[32] Cortez, MA., Bueso-Ramos, C., Jana Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, AK. and Calin, GA. MicroARNs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. Nature Reviews. Clin. Oncol. 8, 467–77 (2011).

[33] Kim, VN. and Nam, JW. Genomics of microARN. Trends in Genetics. 22, 165–73 (2006).

[34]Baek, D., Villén, J., Shin, c., Camargo, FD., Gygi, SP and Bartel DP. The impact of microARNs on protein output. Nature 455, 64–71 (2008).

[35] http://www.mirbase.org/.

[36] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A. 101, 2999–3004 (2004).

[37] De Mena L, Coto E, Cardo LF, Díaz M, Blázquez M, Ribacoba R, Salvador C, Pastor P, Samaranch L, Moris G, Menéndez M, Corao AI, A. V. Analysis of the Micro RNA-133 and PITX3 genes in Parkinson's disease. American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics. 153, 1234–9 (2010).

[38] Boon, RA and Dimmeler, S. MicroRNAs in myocardial infarction. Nature Reviews. Cardiol. 12, 135–142 (2015).

[39] Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, R. R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? Translational Research. 157, 253–64 (2011).

[40] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A. 105, 10513–8 (2008).

[41] Huber, CG. Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. Journal of Chromatography A. 806, 3–30 (1998).

[42] Ranogajec, A., Beluhan, S. and Šmit, Z. Analysis of nucleosides and monophosphate nucleotides from mushrooms with reversed-phase HPLC. Journal of Separation Science. 33, 1024–1033 (2010).

[43] Huang, Z., Jayaseelan, S., Hebert, J., Seo, H. and Niu, L. Single-nucleotide resolution of RNAs up to 59 nucleotides by high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry. 435, 35–43 (2013).

[44] Green, MR. and Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol 1. CSH Press (2012).

[45] Fujii, S., Inagaki, K., Miyashita, S., Groombridge, AS., Nagasawa, K., Chiba, K., Takatsu, A. Separation and quantification of RNA molecules using size-exclusion chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry. Electrophoresis 35, 1315–8 (2014).

[46] Slater, GW., Kenward, M., McCormick, LC. and Gauthier, MG. The theory of DNA separation by capillary electrophoresis. Current Opinion in Biotechnology. 14, 58–64 (2003).

[47] Roche. Lab FAQs, Find a quick solution. 3rd edition.

[48] Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstätter H, Parson W, Morling N. Comparison of five DNA quantification methods. Forensic Science International: Genetics. 2, 226–30 (2008).

[49] Ban, E. and Song, E. J. Capillary electrophoresis methods for microARNs assays: a review. Analytica Chimica Acta. 852, 1–7 (2014).

[50] Herráez, Á. Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética “Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.”. Elsevier (2012).

[51] Vester, B. and Wengel, J. Current Topics LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary. Biochemistry 43, 13233-13241 (2004).

[52] Southern, E. Southern blotting. Nature Protocols. 1, 518 – 525 (2006).

[53] Pirrung, MC. How to Make a DNA Chip. Angewandte Chemie International Edition. 41, 1276–1289 (2002).

[54] O’Connor, C. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Nature Education. 1, 171 (2008).

[55] Sauer, S. The essence of DNA sample preparation for MALDI mass spectrometry. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 70, 2, 311–8 (2007).

[56] Thomas, B. and Akoulitchev, AV. Mass spectrometry of RNA. Trends in Biochemical Sciences. 31, 173–81 (2006).

[57] Thomas, R. A Beginner ’ s Guide to ICP-MS. Spectroscopy. 17, (2002).

[58] Baranov, VI, Quinn, Z. , Bandura, DR. and Tanner, SD. The potential for elemental analysis in biotechnology. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 17, 1148–1152 (2002).

[59] Wind M, Edler M, Jakubowski N, Linscheid M, Wesch H and D. Lehmann W. Analysis of Protein Phosphorylation by capillary Liquid Chromatography coupled to Element Mass Spectrometry with ^{31}P Detection and to Electrospray Mass Spectrometry. Analytical Chemistry. 73, 29-35 (2001).

[60] Yang HJ, Yang I, Choi JH, Kang D, Han MS, Kim SK. Determination of phosphorus impurity that directly affects quantification of microbial genomic DNA using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Analytical Biochemistry. 450, 49–51 (2014).

[61] Shah, M., Caruso. J. Inductively coupled plasma mass spectrometry in separation techniques: recent trends in phosphorus speciation. Journal of Separation Science. 28, 15, 1969–84 (2005).

[62] Kretschy, D., Koellensperger, G. and Hann, S. Elemental labelling combined with liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for quantification of biomolecules: A review. Analytica Chimica Acta. 750, 98–110 (2012).

[63] Han, G., Zhang, S., Xing, Z. and Zhang, X. Absolute and relative quantification of multiplex DNA assays based on an elemental labeling strategy. Angewandte Chemie International Edition. Engl. 52, 5, 1466–71 (2013).