

# Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos *kits* comerciales y empleando la qPCR. Efecto de las sustancias inhibidoras

HUGO R. POMA<sup>1</sup>, CAROLINA DAVIES<sup>2</sup>, DOLORES GUTIÉRREZ CACCIABUE<sup>1</sup>, MARÍA C. MORA<sup>2</sup>, MIGUEL Á. BASOMBRÍO<sup>2</sup>, VERÓNICA B. RAJAL<sup>1, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones para la Industria Química - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INIQUI - CONICET), Universidad Nacional de Salta (UNSa); <sup>2</sup>Instituto de Patología Experimental - Facultad de Ciencias de la Salud - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IPE - CONICET), Universidad Nacional de Salta (UNSa), Avenida Bolivia 5150, Salta (4400), Argentina;

<sup>3</sup>Fogarty International Center, Universidad de California en Davis, One Shields Av. Davis CA 95616, Estados Unidos.

\*Correspondencia. E-mail: vbrajal@gmail.com

## RESUMEN

La detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos (AN) empleando PCR revolucionó las ciencias biológicas y médicas. La PCR en tiempo real (qPCR) incorporó la posibilidad de obtener resultados cuantitativos. Una etapa decisiva previa a la qPCR es la extracción de AN, en la que se pueden producir tanto la remoción como la extracción conjunta de sustancias inhibidoras de la reacción enzimática, lo que afectará la eficiencia de amplificación. En el presente trabajo se realizó una comparación entre los *kits* de extracción comerciales Qiagen, Invitrogen y Macherey-Nagel, utilizados para extraer ADN de *Trypanosoma cruzi* de sangre murina artificialmente infectada y ARN de PP7, bacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa*, sembrado en matrices acuosas, en presencia o ausencia de inhibidores. La eficiencia de recuperación de AN en muestras sin inhibidores fue similar para los tres *kits* de extracción. El kit de Invitrogen fue el único que no se vio afectado por la presencia de inhibidores en las muestras.

**Palabras clave:** ácidos nucleicos, extracción, PCR en tiempo real, inhibición, eficiencia

## ABSTRACT

**Comparison of nucleic acid extraction efficiency using different commercial kits and qPCR. Effect of inhibitors.** The detection of specific nucleic acid (NA) sequences by PCR has revolutionized the biological and medical sciences. Real-time PCR (qPCR) opened up the possibility of obtaining quantitative results. NA extraction is a decisive step prior to qPCR since it may produce either the removal or co-extraction of inhibitory substances of the enzymatic reaction, which in turn affects the amplification efficiency. In the present work we compared the commercial NA extraction kits from Qiagen, Invitrogen and Macherey-Nagel, which were used to extract DNA from mice blood artificially infected with *Trypanosoma cruzi* and PP7 RNA, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, in spiked aqueous matrices. NA recovery efficiency in samples without inhibitors was similar for the three extraction kits. However, the Invitrogen kit was the only one that remained unaffected in the presence of inhibitors in the samples.

**Key words:** nucleic acids, extraction, real-time PCR, inhibition, efficiency

La detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos (AN) empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) revolucionó diversos campos de las ciencias biológicas y médicas. La PCR en tiempo real (qPCR) abrió nuevas perspectivas basadas en la posibilidad de generar resultados cuantitativos (2), por ejemplo, para estimar la cantidad de organismos patógenos en muestras clínicas (1, 13) y ambientales (9). La concentración de la secuencia blanco se determina por la acumulación de

fluorescencia a medida que ocurre la amplificación. El ciclo de amplificación en el que la cantidad de fluorescencia acumulada supera el umbral establecido se conoce como ciclo umbral (*Ct*, del inglés *threshold cycle*). La cuantificación absoluta requiere de una curva estándar que relacione el logaritmo de la concentración de AN de un patrón conocido y sus diluciones con los *Ct* resultantes de la qPCR (2). La concentración de muestras incógnitas se obtiene interpolando sus valores de *Ct* en la curva estándar.

La pendiente de la curva estándar se relaciona con la eficiencia de amplificación ( $E_{amp}$ ) según la siguiente ecuación:

$$E_{amp} = (10^{-1/pendiente}) - 1 \quad [1]$$

Los errores en el diseño de la reacción (insuficiencia de reactivos, temperaturas de hibridación o amplificación no óptimas), una actividad reducida de la polimerasa o la presencia de inhibidores purificados conjuntamente con los AN pueden alterar la eficiencia (10). Es entonces importante utilizar un control interno cuya amplificación indica una correcta extracción de AN y ausencia de inhibición de la polimerasa (7).

Cada tipo de muestra plantea una problemática diferente. En el caso de muestras ambientales o de aguas de consumo, la cantidad de algunos microorganismos (virus y parásitos) es generalmente pequeña y se necesita una etapa de concentración para lograr un límite de detección aceptable en un ensayo diagnóstico, lo que también incrementa la concentración de inhibidores de la qPCR (3, 6). En muestras de sangre, por ejemplo, el tiocianato de guanidina, agente anticoagulante y conservante, es un componente del buffer de extracción y a la vez un inhibidor de la qPCR, que puede quedar en el eluato final de extracción de ADN (1). Como consecuencia de los problemas originados por los inhibidores, la extracción de AN es importante en la qPCR porque debe garantizar una alta eficiencia de recuperación y además reducir la concentración de inhibidores remanentes.

El objetivo del presente trabajo fue comparar la eficiencia de extracción de AN de diferentes kits comerciales empleando qPCR. Se evaluó la cantidad de AN recuperados y la eficiencia de amplificación en presencia de inhibidores en muestras de agua y de sangre entera, empleando kits de extracción de las firmas comerciales de Qiagen (Q), Invitrogen (I) y Macherey-Nagel (MN). Las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado en un termociclador GeneAmp®5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Como modelo de agua limpia sin inhibidores se utilizó buffer fosfato (PBS), y como modelo de agua ambiental, con inhibidores, una solución de ácido tánico (1 g/l, Sigma-Aldrich) en PBS. La concentración de taninos seleccionada está dentro del rango correspondiente a una muestra de agua de efluentes de curtiembre, por ejemplo, luego de un proceso de concentración para la detección de patógenos, lo que

a la vez incrementa la cantidad de inhibidores. El bacteriófago PP7 (ARN de simple cadena), huésped de *Pseudomonas aeruginosa*, se empleó como organismo viral modelo y fue sembrado en ambas matrices acuosas hasta alcanzar concentraciones finales de  $10^{10}$  UFP/ml (alta concentración, AC) y  $10^7$  UFP/ml (baja concentración, BC). La extracción de AN de todas las muestras se realizó con los siguientes kits: QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen), PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) y NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel), según las instrucciones de cada manual. Las reacciones de retrotranscripción (RT) y de amplificación (qPCR) se realizaron por separado; la RT con el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) y la qPCR según Rajal *et al.* (8).

La sangre fue extraída por punción cardíaca de un ratón sano, mezclada con un volumen doble de buffer con tiocianato de guanidina (*guanidine hydrochloride* 6M, Sigma, y EDTA 200 mM, pH 8,0), e incubada a temperatura ambiente durante 24 h. Luego se le agregó una alícuota de un cultivo axénico de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuén, a una concentración final de  $10^6$  parásitos/ml. Esta solución se hirvió durante 10 min para evitar coágulos y liberar el ADN de todas las células. La extracción de ADN se realizó con los mismos kits comerciales empleados para las muestras de agua, con excepción del QIAamp® Viral RNA Mini Kit que fue reemplazado por el QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) específico para ensayos con sangre. La muestra de sangre no fue diluida en el buffer de extracción comercial para evitar un exceso de tiocianato de guanidina porque fue recolectada en un buffer con este inhibidor, de modo que se incubó directamente a 56 °C siguiendo el protocolo del kit. La qPCR se realizó con SYBR® Green (qPCR SuperMix, Invitrogen) en concentración final 1X, 500 nM de cada cebador Sat (1) y 5 µl de ADN en un volumen final de 25 µl. Para las diluciones menores de 1 parásito/ml, la concentración se consideró como "equivalentes de parásitos" porque el fragmento se encuentra en un número aproximado de  $3 \times 10^4$  copias por parásito de la cepa utilizada. Las condiciones de amplificación fueron 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C y 40 repeticiones de 15 s a 95 °C y 1 min a 63 °C. Al finalizar la qPCR se realizó el protocolo de disociación para verificar la ausencia de productos de amplificación inespecíficos. Se construyeron curvas estándares empleando diluciones sucesivas 1/10 a partir del ADN extraído con cada kit.

Se evaluó el comportamiento de los kits de

extracción analizando la eficiencia de amplificación de la qPCR en presencia o ausencia de inhibidores y la cantidad relativa de copias genómicas recuperadas. Los valores de  $C_t$  para las muestras y sus diluciones se representaron en función del logaritmo de la concentración de la secuencia blanco. Aquellos puntos que se ajustaron a un comportamiento lineal corresponden a reacciones sin inhibición y se emplearon para el cálculo de la eficiencia de amplificación, según la ecuación [1]. En cambio, los puntos no alineados son aquellos cuya amplificación sufrió inhibición. Para las curvas estándares con puntos no alineados se determinó el factor de dilución (FD) correspondiente a la dilución necesaria para superar la inhibición. Ej: si se necesita realizar una dilución 1/10 para entrar en la zona de linealidad,  $FD = 10$ , mientras que en una muestra no diluida  $FD = 1$ . La cantidad relativa de copias genómicas recuperadas entre dos kits de extracción (A y B) ( $CR_{A/B}$ ) se calculó según la siguiente fórmula:

$$CR_{A/B} = \frac{C_0^A \cdot \frac{V_{f,ex}^A}{V_{i,ex}^A} \cdot \frac{V_{f,rt}^A}{V_{i,rt}^A} \cdot V_{PCR}^A \cdot FD^A \cdot (1 + E_{amp}^A)^{Ct^A}}{C_0^B \cdot \frac{V_{f,ex}^B}{V_{i,ex}^B} \cdot \frac{V_{f,rt}^B}{V_{i,rt}^B} \cdot V_{PCR}^B \cdot FD^B \cdot (1 + E_{amp}^B)^{Ct^B}} \quad [2]$$

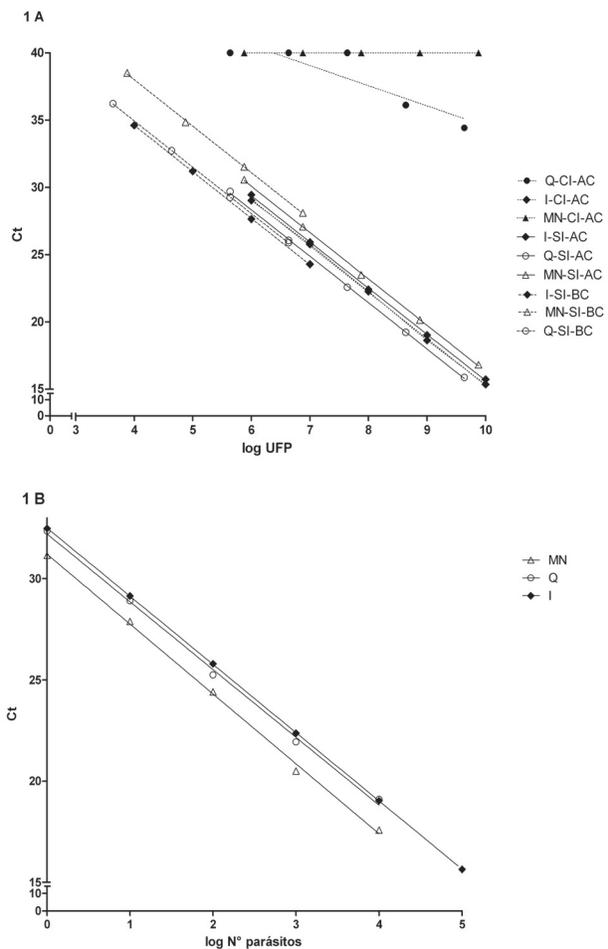
donde  $C_0$  (UFP/1000  $\mu$ l o N.º parásitos/1000  $\mu$ l) es la concentración inicial de organismos,  $V$  ( $\mu$ l) es el volumen,  $E_{amp}$  es la eficiencia de amplificación,  $Ct$  es el ciclo en el cual la fluorescencia atraviesa la línea umbral y  $FD$  es el factor de dilución. Los subíndices  $i$  y  $f$  corresponden a inicial y final, respectivamente;  $ex$  corresponde a extracción,  $rt$  a la reacción de RT y  $PCR$  a la reacción de amplificación.

La Figura 1 muestra los valores promedio de las amplificaciones y rectas de regresión obtenidas al estudiar el efecto de los diferentes kits de extracción de AN en las matrices PBS (Figura 1A) y sangre (Figura 1B).

Cuando la matriz acuosa fue PBS sin taninos (SI), los tres kits presentaron comportamientos similares en la eficiencia de amplificación (Figura 1A), indicados por la pendiente, la intersección y el coeficiente de regresión (Tabla 1). En general, el kit de Invitrogen fue más eficiente que los otros en la recuperación de copias genómicas, pero en el caso de AC de PP7, el equipo de Qiagen mostró mayor rendimiento (Tabla 2).

En presencia de inhibidores (CI), la eficiencia de amplificación de AN obtenidos con el kit de Invitrogen no fue afectada, independientemente de la concentración de templado (Tabla 1). En cambio, la reacción de RT-qPCR fue inhibida total o parcialmente cuando se emplearon los kits Macherey-Nagel y Qiagen en presencia de tanino, y no fue posible cuantificar las copias genómicas recuperadas (no detectados, ND, Tabla 1).

Para la matriz de sangre, la curva estándar de AN extraídos con el kit de Invitrogen fue lineal en toda su extensión, pero con los kits Qiagen y Macherey-Nagel se observó falta de linealidad y alteraciones en la eficiencia de amplificación en los primeros puntos, recuperadas en la primera dilución ( $FD = 10$ , Figura 1B). Si bien esta estrategia de realizar



**Figura 1.** Curvas estándares para las dos matrices estudiadas: (A) PBS con (CI) y sin (SI) inhibidores para alta (AC) y baja (BC) concentración de PP7; y (B) sangre entera infectada artificialmente con *T. cruzi*. Se emplearon los kits de Qiagen (Q), Invitrogen (I) y Macherey-Nagel (MN) para la extracción de ácidos nucleicos.

Tabla 1. Parámetros descriptivos de las rectas de regresión para las condiciones analizadas: PBS con baja (BC) y alta (AC) concentración de PP7, en ausencia (SI) y presencia (CI) de inhibidores (taninos) de la qPCR, y sangre infectada artificialmente con *T. cruzi*

Muestra	Parámetro	Invitrogen	Qiagen	Macherey-Nagel	
PBS	AC, CI	Pendiente	-3,453	ND <sup>(1)</sup>	ND <sup>(1)</sup>
		Eficiencia	94,8 %	ND <sup>(1)</sup>	ND <sup>(1)</sup>
		Intersección	49,834	ND <sup>(1)</sup>	ND <sup>(1)</sup>
		R <sup>2</sup>	0,9996	ND <sup>(1)</sup>	ND <sup>(1)</sup>
	AC, SI	Pendiente	-3,437	-3,451	-3,447
		Eficiencia	95,4 %	94,8	95 %
		Intersección	50,009	49,047	50,760
		R <sup>2</sup>	0,9996	0,9995	0,9995
	BC, CI	Pendiente	-3,441	ND <sup>(1)</sup>	ND <sup>(1)</sup>
		Eficiencia	95,3 %	ND <sup>(1)</sup>	ND <sup>(1)</sup>
		Intersección	50,340	ND <sup>(1)</sup>	ND <sup>(1)</sup>
		R <sup>2</sup>	0,9985	ND <sup>(1)</sup>	ND <sup>(1)</sup>
	BC, SI	Pendiente	-3,457	-3,447	-3,456
		Eficiencia	94,7 %	95 %	94,7 %
		Intersección	48,451	48,745	51,826
		R <sup>2</sup>	0,998	0,9995	0,9997
Sangre	Pendiente	-3,37	-3,35	-3,45	
	Eficiencia	98 %	98,8 %	94,8 %	
	Intersección	32,508	32,212	31,215	
	R <sup>2</sup>	0,9988	0,9962	0,9982	

<sup>(1)</sup>ND: no detectado

Tabla 2. Recuperación relativa entre los métodos de extracción empleados (calculada según la ecuación [2]): Qiagen (Q), Invitrogen (I) y Macherey-Nagel (MN) para alta (AC) y baja concentración (BC) de PP7 en PBS sin inhibidores y para sangre artificialmente infectada con *T. cruzi*

Kits	Muestras		
	PBS, AC	PBS, BC	Sangre
I/Q	0,46	1,34	2,18
I/MN	1,5	9,59	4,72
Q/MN	3,26	7,18	2,17

diluciones sucesivas permite cuantificar salvando el inconveniente de la presencia de inhibidores, solo es posible cuando la concentración de la secuencia blanco es suficientemente elevada, pues podría llegarse a una situación en la que por la dilución se pierda completamente la señal y la amplificación no sea posible.

Entre las sustancias inhibitoras de la PCR en muestras de agua se encuentran los iones de hierro y calcio, los ácidos húmicos (10) y los taninos, cuyos grupos fenólicos libres se oxidan para formar quinonas que inactivan la polimerasa de ADN (4). Algunos inhibidores en muestras de tejido y sangre son el grupo hemo, la heparina, los anticuerpos, los lípidos (5, 7) y el tiocianato de guanidina. Como en cualquier reacción enzimática, la magnitud del impacto dependerá del tipo de inhibidor y de su concentración. En qPCR, un resultado positivo confirma la presencia de la secuencia blanco, aunque la cuantificación solo será precisa si la amplificación no estuvo afectada por inhibición. Una reacción positiva sometida a inhibición parcial resultaría en un *Ct* que subestime la cantidad de la secuencia blanco. Un resultado negativo puede deberse a la ausencia de la secuencia blanco, pero también a la inhibición total de la amplificación (falso negativo), que puede ser subsanada mediante diluciones sucesivas. Así se recupera la señal y se puede realizar la detección en una región libre de inhibiciones, lo que permite la cuantificación correcta. Finalmente, para monitorear los distintos pasos del ensayo y validar un resultado negativo es recomendable emplear controles internos cuya amplificación sea independiente de la secuencia blanco (1, 7).

Un factor importante en las reacciones de PCR es el método de extracción de AN, porque los inhibidores de las polimerasas de ADN pueden ser extraídos conjuntamente y la calidad y cantidad de la secuencia blanco condicionan los siguientes pasos. En los escenarios evaluados, el kit de Invitrogen condujo a los mismos resultados independientemente de la presencia o ausencia de inhibidores, en relación con los otros *kits*. De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible que hayan quedado trazas de taninos junto a los AN, lo que pudo inhibir significativamente la RT-qPCR. Lo mismo se observó en sangre, aunque el kit de Invitrogen era específico para extracción de AN virales a partir de muestras de agua y no de sangre. La inhibición en la qPCR fue superada realizando diluciones sucesivas de AN.

Estas diferencias entre los *kits* pueden deberse a una combinación de varios factores, como el tipo de muestra, la naturaleza de las columnas de sílica gel y de los buffers de lisis y lavado, aunque la composición de los últimos son secretos comerciales.

Es interesante resaltar que cuando las concentraciones virales sembradas fueron menores, con el kit de Invitrogen se recuperaron mayores cantidades relativas de copias genómicas. Será importante entonces evaluar el comportamiento del método de extracción que se empleará para cada caso cuando se pretendan analizar muestras por qPCR.

**Agradecimientos:** el estudio fue financiado por el Fogarty International Center, University of California Davis, EE.UU. a través del UCD-INIQUI Agreement N° 06001055-02 y la Fundación Florencio Fiorini. H. R. Poma, C. Davies y D. Gutiérrez Cacciabue son becarios del CONICET.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Duffy T, Bisio M, Altchek J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e419.
2. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992; 10: 413-7.
3. Hill VR, Kahler AM, Jothikumar N, Johnson TB, Hahn D, Cromeans TL. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 4218-25.
4. Kontanis EJ, Reed FA. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *J Forensic Sci* 2006; 51: 795-804.
5. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöbak R, Sjögreen B, Stömbom L, Stalberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.
6. Morales-Morales HA, Vidal G, Olszewski J, Rock CM, Dasgupta D, Oshima KH, Smith GB. Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4098-102.
7. Nolan T, Hands RH, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal Biochem*. 2006, 351: 308-10.
8. Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res* 2007; 41: 1411-22.
9. Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger M, Wuertz S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California storm water. *Water Res* 2007; 41: 4287-98.

10. Schriewer A, Wehlmann A, Wuertz S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *J Microbiol Methods* 2011; 85:16-21.
11. Thomas SM, Moreno RF, Tilzer LL. DNA extraction with organic solvents in gel barrier tubes. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 5411.
12. Thompson DE, Rajal VB, De Batz S, Wuertz S. Detection of *Salmonella* in water samples using magnetic capture hybridization combined with PCR or real time PCR. *J Water Health* 2006; 4: 67-75.
13. Zago MP, Barrio AB, Cardozo RM, Duffy T, Schijman AG, Basombrío MA. Impairment of infectivity and immunoprotective effect of a *LYT1* null mutant of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Imm* 2008; 76: 443-51.

Recibido: 6/3/2012 – Aceptado: 15/5/2012