

Bioquímica

Volumen 27
Volume

Número 1
Number

Marzo 2002
March

Artículo:

Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



www.Medigraphic.com

GENETICA

Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real

Edmundo Bonilla ^{*2}, Mario Párraga¹, Luis A. López¹, Fernando Escolar¹ y Jesús del Mazo¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España;

²Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México

*Sobretiros: Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av- Michoacán y Purísima s/n Col. Vicentina, CP 09340, México DF; Fax: 58 04 47 27, e-mail: mundo@xanum.uam.mx

Recibido: 21/09/2001 Aceptado: 24/10/2001

Resumen

La cuantificación de la expresión génica mediante los métodos clásicos requiere de cantidades de RNAm difíciles de obtener cuando el número de muestras experimentales es limitado. Recientemente ha sido introducida una nueva tecnología que permite la cuantificación precisa de los amplicones durante cada ciclo del PCR (LightCycler™; Roche). En este estudio hemos utilizado esta tecnología para analizar la expresión de algunos genes en ovocitos fetales de ratón en cultivo. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo a partir de lisados completos de ovocitos para evitar la pérdida de RNAm causada por su aislamiento. La amplificación de DNA genómico se previno mediante su digestión con DNasa libre de RNAsas. La metodología empleada nos permitió la amplificación y cuantificación de RNAs con expresión alta (e.g. proteína ribosomal S16) y moderada (Cu/Zn superóxido dismutasa) a partir de sólo dos ovocitos. Para la amplificación y cuantificación de transcritos escasos (Metaxina) se requirió de un mínimo de ocho ovocitos. La amplificación por PCR usando esta metodología puede ser muy útil en el análisis de la expresión génica en condiciones en las que el material biológico disponible es muy limitado.

Palabras clave: Cuantificación de la expresión génica, RT-PCR en tiempo real.

Abstract

Quantification of gene expression by classical methods requires amounts of mRNA difficult to obtain when the number of experimental samples is limited. Recently, a new detection technology that facilitates real-time detection of specific amplification product during PCR has been introduced (LightCycler™; Roche). In this study, we have used this technology to analyze the expression of single genes in fetal mouse oocytes. RT-PCR was performed on whole oocytes lysates in order to avoid RNA loss during its isolation. Amplification of genomic DNA was prevented by digesting it with RNase-free DNase. The method used allowed us specific PCR amplification and quantification of abundant (e.g. S16 ribosomal protein) and moderate (copper-zinc superoxide dismutase) mRNAs from as few as two oocytes, while specific amplification and quantification of less abundant transcripts (Metaxin) required 8 oocytes as starting material. PCR amplification using this technology provides a unique opportunity to study gene expression in conditions where the amount of experimental material is very limited.

Key words: Quantification of gene expression, Real time RT-PCR.

Introducción

La evaluación de la expresión génica mediante los métodos clásicos requiere de una gran cantidad de RNAm que es difícil de obtener cuando el número de muestras es limitado o cuando el material biológico es una población de diferentes tipos celulares. Aunque la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un fuerte impacto en esta área, su uso en la cuantificación de la expresión génica ha sido problemática, principalmente debido a la naturaleza exponencial del PCR, donde pequeñas diferencias en la eficiencia de la amplificación pueden alterar de manera significativa el rendimiento del producto de la amplificación (amplicón)¹. Recientemente ha sido introducida una nueva tecnología que permite la cuantificación precisa de los amplicones durante cada ciclo del PCR (LightCycler™; Roche diagnostics, Indianapolis, USA). En ésta se emplean marcadores fluorescentes, como el SYBR Green I, que mediante su unión a ácidos nucleicos de doble cadena permite

valorar la cantidad de DNA presente en cada ciclo de amplificación de PCR². Así, el aumento de fluorescencia se corresponde con la cantidad de producto formado, y al comparar estos resultados con los obtenidos en una curva estándar, se logra la cuantificación de los amplicones en cada ciclo. Esta tecnología permite, además, diferenciar las amplificaciones específicas de aquellas inespecíficas (debidas a la formación de dímeros de los oligonucleótidos utilizados), determinando el punto de fusión de los amplicones y considerando que los productos específicos tienen generalmente un mayor punto de fusión que los productos inespecíficos. Una ventaja adicional de esta metodología se basa en que el marcador fluorescente SYBR Green I es al menos 10 veces más sensible que el bromuro de etidio, lo que facilita el análisis de los productos de

Este trabajo contó con el apoyo de DGICYT (PB95-0119), EU (PL 960183) y CAM (07B/0022/1997). E. Bonilla contó con el apoyo de UAM y CONACYT para la realización de estudios de doctorado en el CIB, Madrid, España.

PCR cuando se trabaja con cantidades limitadas de DNA. Y finalmente, es una metodología que consume muy poco tiempo: un experimento de RT-PCR se realiza en unos 20-30 minutos.

Durante los últimos años, en nuestro laboratorio hemos estudiado la expresión génica en la gametogénesis [proceso de diferenciación que lleva a la formación de espermatozoides (espermatogénesis) o de ovocitos (ovogénesis)] de los mamíferos^{3,4}. La diferenciación de células germinales en la espermatogénesis se inicia en la etapa prepuberal, y es un proceso continuo en el que después de la primera oleada meiótica se mantiene ininterrumpidamente hasta la vida adulta, y a lo largo de ésta, por lo que el análisis molecular de este proceso es algo más conocido que el correspondiente del sexo femenino en mamíferos. En este sentido, los estudios sobre la ovogénesis son escasos, dado que la diferenciación de los ovocitos se lleva a cabo únicamente en estadios fetales, por lo que son relativamente inaccesibles a la manipulación experimental, y la cantidad de material biológico disponible para su análisis es escaso. La cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real a partir de un escaso número de células ha sido reportado recientemente⁵. En este estudio sin embargo, sólo se llevó a cabo la amplificación de transcritos abundantes, y no se tomaron en cuenta las amplificaciones inespecíficas debidas a DNA genómico (especialmente mitocondrial), que son frecuentes cuando se lleva a cabo la amplificación a partir de lisados celulares completos.

Con el objetivo de disponer de una herramienta que nos permitiera el análisis sensible de la expresión génica empleando un bajo número de células, en el presente estudio se utilizó la tecnología del LightCycler y se estandarizaron las condiciones metodológicas para eliminar las amplificaciones inespecíficas debidas a la presencia de DNA genómico, y poder así llevar a cabo el análisis de la expresión de genes expresados alta, mediana o escasamente en ovocitos fetales de ratón cultivados *in vitro*.

Material y métodos

El cultivo *in vitro* de ovocitos fetales se llevó a cabo básicamente según la metodología descrita⁶. Ovarios de embriones de ratón de 17 días post-coito (dpc) fueron disectados en medio de recolección [medio MEM (Gibco) suplementado con 1mg/mL de BSA fracción V (Sigma) y 100 µg/mL de penicilina y estreptomycin]. Cada ovario se cortó en fragmentos de 0,5-1 mm utilizando agujas finas (G 5/8) bajo el estereomicroscopio. Los fragmentos se colocaron en 250 µL de medio de cultivo [medio Waymouth (Gibco) suplementado con 5% de suero de caballo, 2,5% de suero fetal de ternera, y 100 µg/mL de penicilina y estreptomycin] en los pozos formados por la adhesión de los bloques para cultivos celulares flexiPERM (Heraeus) a placas

de Petri de 10 cm, y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Después de 2 días, cuando los explantos de ovario estaban adheridos a la placa (fig. 1A), los bloques flexiPERM fueron retirados, y se añadieron 10 mL de medio de cultivo por placa. Se observó diariamente el crecimiento y desarrollo de los ovocitos. Después de 6 días de cultivo, la mayoría de los ovocitos alcanzaron el estadio de vesícula germinal (VG), mostrando un tamaño de aproximadamente 70 µm (fig. 1C). Los ovocitos en el estadio de VG se aislaron de los explantos de ovario mediante pipeteo repetido hasta que los ovocitos fueron liberados (fig. 1D). Estos se lavaron en PBS-DEPC y se almacenaron en tubos para PCR a -70°C (10 ovocitos por tubo en 0.5 µL de agua-DEPC).

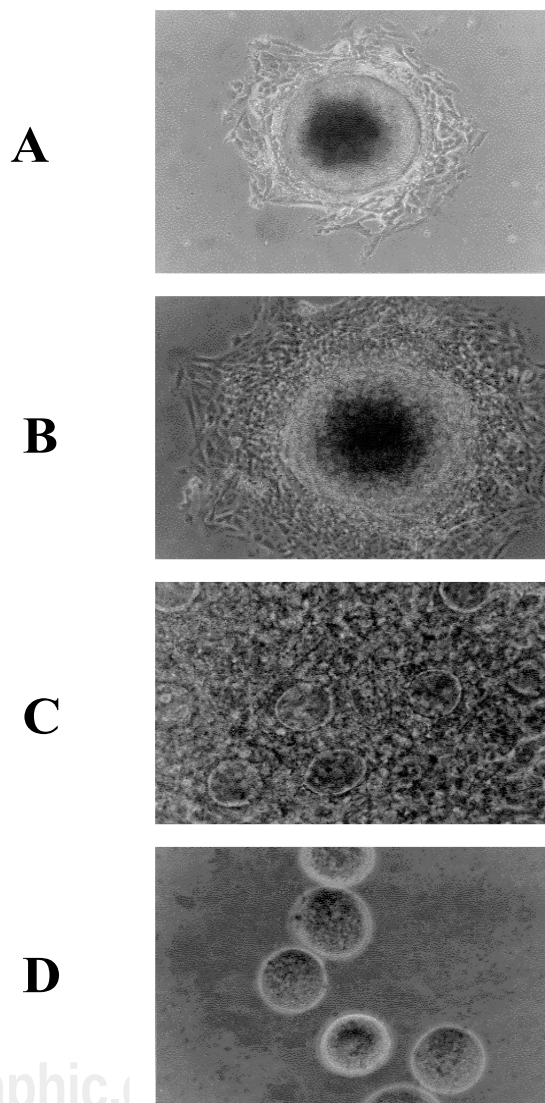


Figura 1. Cultivo *in vitro* de ovocitos fetales. A: explanto de ovario adherido a la placa Petri después de 2 días de cultivo. B: explanto a los 4 días de cultivo. C: ovocitos en estadio de vesícula germinal a los 6 días de cultivo. D: ovocitos aislados de los explantos de ovario.

Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados en las amplificaciones por PCR

RNAm diana	Oligonucleótido U	Oligonucleótido L	Tamaño del amplicón (pb)
Citocromo c oxidasa (subunidad II)	5'-AGGGCACCAATGATACTGAA-3'	5'-TCTAGGACAATGGGCATAAA-3'	335
Cu/Zn superóxido dismutasa	5'-TATGGGGACAATACACAAGG-3'	5'-GTTTGAGGGTAGCAGTTGAG-3'	363
Proteína ribosomal S16	5'-AGGAGCGATTTGCTGGTGTGGA-3'	5'-GCTACCAGGCCTTTGAGATGGA-3'	102
Metaxina	5'-ATCAGAGAACGAGGAGGAAC-3'	5'-GATAGAAACGATGCCACTGA-3'	406

Las reacciones de retrotranscripción (RT) se realizaron directamente sobre lisados completos de ovocitos, para evitar la pérdida de RNA durante su aislamiento⁷. La amplificación de DNA genómico se impidió mediante la digestión de los lisados con DNAsa libre de RNAsas antes de la reacción de RT, siguiendo la metodología descrita a continuación.

Inmediatamente antes de iniciar el experimento, 10 ovocitos fueron lisados mediante dos pasos de congelación y descongelación rápida a -70°C . Los reactivos para la RT [tampón de RT 1X (Gibco), 10 mM DTT, 0.5% NP40, 1.5 U/ μL de inhibidor de RNAsas (Promega), 0.5 μL de cada nucleótido (Pharmacia) y 3.75 μM de oligo(dT)₁₇] se mezclaron y 7.5 μL de ésta mezcla se añadieron a los lisados de ovocitos. Las muestras se calentaron a 65°C 1 min para lisar las membranas mitocondriales, y se mantuvieron en hielo. A continuación, se añadieron 2 U de DNAsa libre de RNAsas, y la digestión se realizó a 37°C durante 5 min. Al finalizar, la DNAsa se inactivó mediante incubación a 65°C durante 5 min, y los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente para permitir el anillamiento del oligo(dT)₁₇. Se añadieron 160 U de la transcriptasa reversa Superscript (Gibco) a los lisados de ovocitos, y la RT se llevó a cabo a 37°C durante 15 min. La transcriptasa reversa fue omitida en los controles negativos. Al término de la reacción, la enzima fue inactivada por incubación a 65°C 10 min, y el cDNA formado se almacenó a -20°C hasta su uso.

La expresión de transcritos abundantes, como la subunidad II de la citocromo c oxidasa (CCOII) y la proteína ribosomal S16, moderados, como la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD), y escasos, como metaxina, fueron entonces analizadas. Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se indican en el cuadro 1.

Las reacciones de PCR y la determinación de los puntos de fusión de los amplicones se efectuó en tubos capilares de vidrio con capacidad para 20 μL . La mezcla para PCR se preparó de la siguiente forma: 10.8 μL de agua, 3.2 μL de MgCl_2 (25 mM), 1 μL de cada oligonucleótido a 5 pmol/ μL y 2 μL del kit "LightCycler DNA-Master SYBR Green I". 2 μL de cDNA de ovocitos (equivalentes a 2 ovocitos)

se utilizaron para la amplificación. Varias diluciones (1:100, 1:1000 y 1:5000) de la proteína ribosomal S16 se amplificaron simultáneamente para elaborar una curva patrón que serviría para realizar la cuantificación de los productos de PCR mediante interpolación. Las condiciones para la reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 s, anillamiento durante 10 s a la temperatura óptima para cada par de oligonucleótidos, extensión a 72°C durante 16 s. La intensidad de la fluorescencia se registró al final de cada fase de anillamiento.

Después de la amplificación se determinaron los puntos de fusión de los amplicones, generando curvas de fusión de la siguiente manera: las muestras se mantuvieron a 50°C durante 5 s para facilitar la unión del marcador SYBR Green al DNA de doble cadena, generando una fluorescencia máxima. La temperatura se elevó lentamente (0.2°C/s) hasta alcanzar 95°C para permitir la desnaturalización del DNA. Cuando se alcanza este punto, las cadenas de DNA se separan, y también por tanto el marcador SYBR Green, lo que origina un notable decaimiento en la fluorescencia. Las curvas de fusión generadas se convirtieron en picos de fusión graficando el negativo de la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura ($-dF/dT$), contra la temperatura.

Resultados

Las curvas de amplificación de las muestras estándar (S16 amplificado a partir de varias diluciones de cDNA de testículo) se muestran en la figura 2. La curva patrón generada a partir de estos datos tenía un coeficiente de correlación $r = -0.9$.

Las curvas de fluorescencia generadas por la amplificación de los transcritos de CCOII, S16 y SOD se muestran en la figura 3. Estas amplificaciones son específicas, lo que se deduce del análisis de las curvas de temperatura de fusión (figura 4) y del análisis de los productos de PCR en geles de agarosa (figura 5). Algunos de los controles negativos de (S16 y SOD) mostraron curvas de

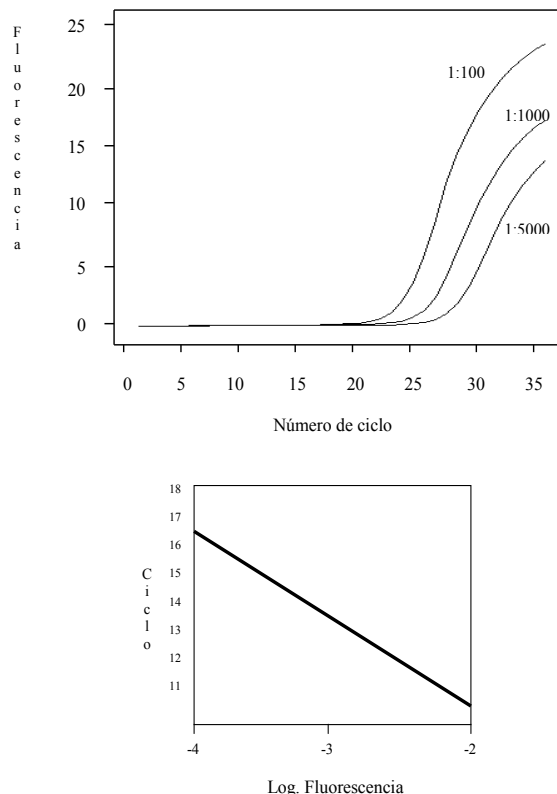


Figura 2. A. Curvas de amplificación por PCR en tiempo real de las muestras estándar. Varias diluciones (1:100, 1:1000 y 1:5000) de cDNA de testículo de ratón se usaron como molde para la amplificación de S16. B. Curva patrón (cantidad de cDNA/amplificación) generada a partir de las curvas de amplificación de las muestras estándar.

amplificación. Estas amplificaciones inespecíficas son debidas a amplificación de dímeros de oligonucleótidos (ver curvas de temperatura de fusión, figura 4, y el análisis de los productos de PCR por electroforesis, figura 5).

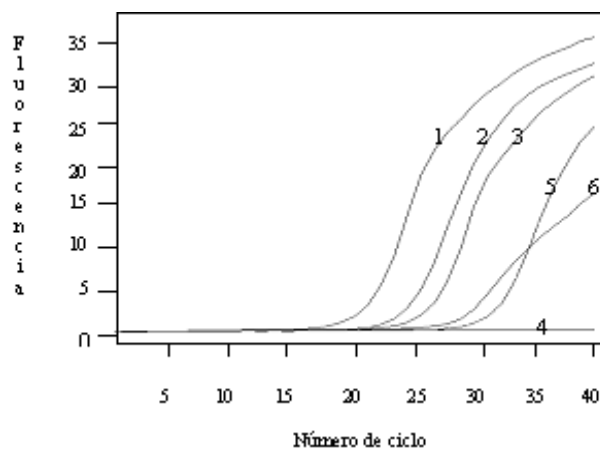


Figura 3. Amplificación por PCR en tiempo real de CCOII (1), SOD (2) y S16 (3) a partir de muestras de 2 ovocitos. La transcriptasa reversa fue omitida de los controles negativos (4, 5 y 6, respectivamente).

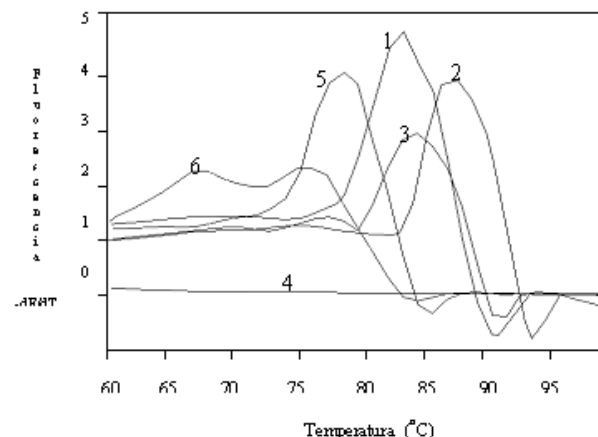


Figura 4. Curvas de temperatura de fusión de DNA en tiempo real del DNA amplificado de CCOII (1), S16 (2) y SOD (3), y sus correspondientes controles negativos (4, 5 y 6).

Los puntos de fusión para los productos de PCR de los transcritos de CCOII, S16 y SOD fueron, respectivamente, 83.6 °C, 84.5 °C y 86.8 °C (figura 4). Los dímeros de oligonucleótidos formados en los controles negativos de SOD y S16 mostraron, como se esperaba, puntos de fusión más bajos que los de los productos específicos de SOD y S16.

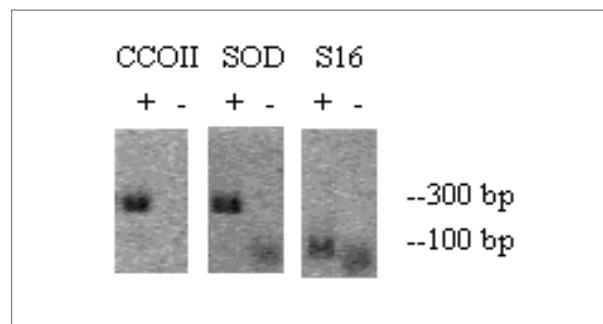


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación por PCR en tiempo real de CCOII, SOD, S16 y sus respectivos controles negativos.

En la figura 5 se observa el análisis electroforético en geles de agarosa de los mismos productos de la amplificación de los transcritos de CCOII, SOD, S16 y sus respectivos controles negativos. La amplificación específica de los transcritos de CCOII (335 pb), SOD (363 pb) y S16 (102 pb) está presente sólo en los controles positivos. Acorde a los resultados obtenidos en el análisis de las curvas de amplificación y temperaturas de fusión, tanto en el caso de SOD como de S16 se detectan en los controles negativos amplificaciones inespecíficas de dímeros de oligonucleótidos.

La amplificación específica de transcritos poco abundantes, como el de metaxina, sólo se pudo llevar a cabo a partir de un número mayor de ovocitos (ocho). Al intartarlo con una menor cantidad (dos o cuatro), se generaba una gran cantidad de productos inespecíficos, lo que impide una cuantificación precisa (figura. 6).

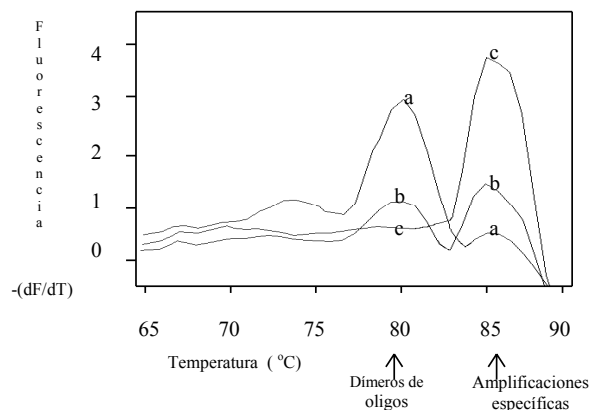


Figura 6. Curvas de temperaturas de fusión de los productos de la amplificación por PCR en tiempo real de metaxina. Dos (a), cuatro (b) u ocho ovocitos (c) se usaron como molde.

Discusión

Debido a su gran sensibilidad, reproducibilidad y velocidad, la metodología de RT-PCR en tiempo real es muy ampliamente usada en la actualidad para la realización de análisis de la expresión génica⁸. Sin embargo, se requiere la implementación de modificaciones de la metodología básica cuando no se dispone de un suficiente número de células para llevar a cabo el análisis. Steuerwald y cols.⁵ realizaron la cuantificación del RNAm de β -actina e hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa a partir de ovocitos y embriones individuales por medio de RT-PCR en tiempo real. Estos autores, sin embargo, sólo llevaron a cabo la amplificación de transcritos abundantes, y no tomaron en cuenta las amplificaciones inespecíficas debidas a DNA genómico (especialmente mitocondrial), que son frecuentes cuando se lleva a cabo la amplificación a partir de lisados celulares completos. Si no se considera este factor, los resultados de la cuantificación pueden no ser muy precisos.

La metodología utilizada en el presente estudio nos permitió la amplificación específica de transcritos abundantes como son CCOII y S16, y moderados, como SOD, a partir de dos ovocitos (figuras 3, 4 y 5). La amplificación de transcritos menos abundantes (como metaxina) requirió de un número mayor de ovocitos para evitar la amplificación inespecífica de dímeros de nucleótidos. La formación de dímeros de oligonucleótidos ocurrió incluso cuando se utilizaron cuatro ovocitos. Sin embargo, al utilizar ocho ovocitos como molde, la amplificación específica de metaxina fue evidente, sin trazas de amplificación inespecífica de dímeros (figura 6).

La digestión del DNA genómico no fue esencial cuando se amplificaron transcritos nucleares tales como SOD, S16 o metaxina. En estos casos no se observó la amplificación de DNA genómico en los controles negativos, aún cuando este DNA no fuera digerido (resultado no mostrado). Sin embargo, la digestión del DNA genómico

fue esencial al amplificar transcritos mitocondriales como CCOII. En este caso, la amplificación del DNA genómico ocurre probablemente debido al elevado número de mitocondrias (y por tanto, de copias de los genes mitocondriales) presentes en las células. La digestión del DNA mitocondrial, sin embargo, no se consiguió fácilmente. Esto sólo se logró después de seguir la metodología descrita anteriormente, que incluye la lisis de los ovocitos por medio de congelación y descongelación, y la disrupción de las membranas a 65 °C utilizando NP40 antes de la adición de la DNasa.

En conclusión, la amplificación por PCR utilizando la tecnología del LightCycler nos proporciona una herramienta muy útil para el estudio de la expresión génica cuando se dispone de cantidades muy limitadas de material experimental. En el método descrito aquí, el número mínimo de células que pueden ser utilizadas está condicionado por el nivel de expresión de los genes a ser analizados. Dos células son suficientes para la amplificación específica de RNAs expresados abundante o moderadamente, en tanto que se requieren ocho células en el caso de transcritos menos abundantes. Esta técnica abre posibilidades para ser utilizada en el análisis molecular de células obtenidas de fluidos fisiológicos o mediante microdissección con láser⁹. A partir de los resultados obtenidos es posible cuantificar de una manera precisa la expresión de genes en situaciones biológicas como los mismos estadios postcigóticos, en los que la cantidad de material biológico es limitante. Otros procesos patológicos, como los derivados de oncogénesis, donde se encuentran presentes diferentes poblaciones celulares pueden ser disectados molecularmente¹⁰ en base a la aplicación de la tecnología desarrollada en el presente estudio.

Referencias

1. Foley KP, Leonard MW, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet* 1993; 9(11): 380-5.
2. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 1998; 24(6): 954-962.
3. López-Alañón D M, del Mazo J. Cloning and characterization of genes expressed during gametogenesis of female and male mice. *J Reprod Fertil* 1995; 103(2): 323-9.
4. López-Fernández LA, del Mazo J. Characterization of genes expressed early in mouse spermatogenesis, isolated from a subtractive cDNA library. *Mamm. Genome* 1996; 7(9): 698-700.
5. Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Brenner CA. Quantification of RNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 2000; 6 (5): 448-53.
6. De Felici M, Dolci S. Cellular interactions of mouse fetal germ cells in *in vitro* systems. *Curr Top Dev Biol* 1987; 23:147-62.
7. Dulac C. Cloning of genes from single neurons. *Curr Top Dev Biol* 1998; 36: 345-59.
8. Bustin, S.A. Absolute quantification of RNAm using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2): 169-93.
9. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet* 1998; 14(7): 272-6.
10. Aslanidis C, Nauck M, Schmitz G. High speed prothrombin G-A 20210 and methylene- tetrahydrofolate reductase C-T 677 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves. *BioTechniques* 1999; 27(2): 234-8.