

La lipofección incrementa la eficiencia de mutagénesis dirigida en células troncoembrionarias de ratón E14 TG2a

Lipofection improves gene targeting efficiency in E14 TG2a mouse embryonic stem cells

Sandra M. López-Heydeck* Marcos Cajero-Juárez** Rogelio A. Alonso-Morales***
 José S. Martínez-Castañeda* José F. Robles-González* Alberto Barbabosa-Pliego*
 Juan C. Vázquez-Chagoyán*

Abstract

Electroporation has been the method of election for transfection of murine embryonic stem cells for over 15 years; however, it is a time consuming protocol because it requires large amounts of DNA and cells, as well as expensive and delicate equipment. Lipofection is a transfection method that requires lower amounts of cells and DNA than electroporation, and has proven to be efficient in a large number of cell lines. It has been shown that after lipofection, mouse embryonic stem cells remain pluripotent, capable of forming germ line chimeras and can be transfected with greater efficiency than with electroporation; however, gene targeting of mouse embryonic stem cells by lipofection has not been reported. The objective of this work was to find out if lipofection can be used as efficiently as electroporation for regular gene targeting protocols. This context compares gene targeting efficiency between these techniques in mouse embryonic stem cells E14TG2a, using a gene replacement type vector. No differences were found in gene targeting efficiency between groups; however, lipofection was three times more efficient than electroporation in transfection efficiency, which makes lipofection a less expensive alternative method to produce gene targeting in mouse embryonic stem cells.

Key words: GENE TARGETING, HOMOLOGOUS RECOMBINATION, MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS, TRANSFECTION, ELECTROPORATION, LIPOFECTION.

Resumen

Durante los últimos 15 años se ha demostrado que la electroporación representa el método ideal para la transfección de células troncoembrionarias de ratón; sin embargo, demanda grandes cantidades de ADN y células, así como equipo caro y delicado, ello hace que este proceso sea costoso y laborioso. La lipofección es un método de transfección que requiere menos de células y ADN que la electroporación; asimismo, ha probado ser eficiente en gran número de líneas celulares. Se ha demostrado que después de lipofectar células troncoembrionarias de ratón, éstas mantienen su pluripotencia y son capaces de formar quimeras de línea germinal y se transfectan con mayor eficiencia que con electroporación, pero no se ha notificado la mutagénesis dirigida mediante la lipofección de células troncoembrionarias de ratón. El objetivo del presente trabajo fue saber si la lipofección puede ser utilizada con la misma o mayor eficiencia que la electroporación para los protocolos regulares de mutagénesis dirigida; en este contexto, se compara la eficiencia en mutagénesis dirigida entre estas técnicas en células troncoembrionarias de ratón E14TG2a, utilizando un vector de reemplazo. Entre las células transfectadas no se hallan diferencias en la eficiencia en mutagénesis dirigida entre grupos; sin embargo, los resultados que aquí se ofrecen muestran que la lipofección es tres veces más eficiente en la transfección, lo cual indica que la lipofección es un método alternativo menos costoso para obtener mutagénesis dirigida en células troncoembrionarias de ratón.

Palabras clave: MUTAGÉNESIS DIRIGIDA, RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA, CÉLULAS TRONCOEMBRIONARIAS DE RATÓN, TRANSFECCIÓN, ELECTROPORACIÓN, LIPOFECCIÓN.

Recibido el 9 de octubre de 2007 y aceptado el 22 de agosto de 2008.

*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Autopista Toluca-Atlacomulco, Km 15.5, Toluca, Estado de México, México, Tele/Fax: (01-722) 2968980.

**Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo, Carretera Morelia-Zinapécuaro, Km 9.5, Colonia La Palma, Tarímbaro, Michoacán, México, Telefax: (01-443) 2958029.

***Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma México, 04510, México, D. F., Telefax: (01-55) 56225956.

Correspondencia: Telefax: (01-722) 2965555, correo electrónico: jcvu@uaemex.mx

Introduction

Murine embryonic stem (mES) cells have been manipulated to generate targeted mutations via homologous recombination for over 15 years, since they are a major tool in gene targeting mouse technologies, to produce diverse biological models for the study of human diseases, for biotechnologic developments and for developmental biology.¹⁻⁴

Although some other techniques have been tested to transfect mES cells for gene targeting protocols, electroporation has been the method of choice because it consistently produces acceptable results. In electroporation traditional conditions, cells are suspended in an aqueous solution with the transgene and then submitted to an electric pulse at few hundred millivolts, at a threshold suitable for the lipidic bilayer composition of the cell membrane of the mES cells. In *in-vitro* studies, performed with artificial membranes, it has been shown that the transmembranal potentials produced by the electric pulse, generate local field gradients in the lipid-water interphase, where the water forms channels with DNA suspended in it, the hydrophilic heads from the external layer of the bilayer membrane fold inwards in direction of the internal hydrophilic heads forming pores, through which water and DNA travel to the inside and a membrane/DNA complex is formed.⁵ This technique has the disadvantage of being a labor intensive process, requiring large number of cells ($> 10^7$) and large amounts of DNA (20 μ g) per transfection event, under traditional conditions, and the absolute targeting frequency is low, due to the high cell mortality occurring during electric discharge and to the low number of cells that incorporate the transgene.^{6,7} Additionally, electroporation requires a relatively expensive and delicate piece of equipment; therefore, it would be worth to count on an alternative reliable method that allows to perform gene targeting in at least an equally efficient way with a lower use of resources.

Lipofection is a transfection technique with a high cell survival rate. In this technique the transgene gains entrance to the cell through an endocytosis like process, where the transgene encapsulating liposomes, in aqueous solution, find an oppositely charged specific receptor bipolymer from the cell membrane that interacts with the microtubules.⁸⁻¹⁰ Lipofection has been successfully used to produce random integration in pig fetal fibroblasts,¹¹ gene targeting in sheep fibroblasts,¹² to transfect mES cells for transient expression of genes,⁷ to produce random integration of transgenes,^{13,14} to transfer interference RNA¹⁵ and to produce targeted mutations with oligonucleotides.¹⁶ Liposome mediated transfection has also been reported to maintain mES cells pluripotency and

Introducción

Las células troncoembrionarias de ratón (TER) se han usado para generar mutagénesis dirigida en ratones transgénicos desde hace más de 15 años, pues son muy importantes para la elaboración de diversos modelos biológicos para el estudio de enfermedades humanas, para desarrollos biotecnológicos y para la biología del desarrollo.¹⁻⁴

Aunque se han probado algunas otras técnicas para transfectar células TER para los protocolos de mutagénesis dirigida, la electroporación es el método elegido debido a los buenos resultados que obtiene. En la electroporación bajo condiciones tradicionales, las células son suspendidas en un medio acuoso junto con el transgen para someterlas a descarga eléctrica de algunos cientos de milivoltios, a un umbral acorde con la composición de la bicapa lipídica de la membrana celular de las células TER. Estudios *in vitro* con membranas artificiales muestran que los potenciales transmembrana producidos generan gradientes de campo locales en la interfase agua-lípidos, formándose canales de agua con el ADN en suspensión; las cabezas de lípidos de la capa externa son invaginadas hacia las cabezas de lípidos de la capa interna formando poros por donde penetra el agua con ADN y se origina un complejo de ADN/membrana.⁵ Esta técnica tradicional tiene la desventaja de que constituye un proceso laborioso e intensivo debido a que requiere gran cantidad de células ($> 10^7$) y de ADN (20 μ g) por evento de transfección; asimismo, tiene baja frecuencia absoluta de mutagénesis dirigida, como consecuencia de alta mortalidad celular durante el choque eléctrico y de bajo número de células que incorporan el transgene.^{6,7} Además, la electroporación requiere de equipo caro y delicado. Por ello sería valioso contar con un método alternativo que permita realizar mutagénesis dirigida de manera igualmente eficiente y que consuma menos recursos.

La lipofección es una técnica de transfección que se caracteriza por gran sobrevivencia celular. En esta técnica, el transgene entra a la célula por medio de un proceso tipo endocitosis donde los liposomas que encapsulan al transgene en medio acuoso, encuentran a su opuestamente cargado bipolímero receptor específico de la membrana celular que interactúa con los microtúbulos.⁸⁻¹⁰ La lipofección ha sido exitosamente utilizada para producir integración dirigida en fibroblastos fetales de cerdo,¹¹ mutagénesis dirigida en fibroblastos de ovinos,¹² transfección de células TER para expresión transitoria de genes,⁷ para producir integración azarosa de transgenes,^{13,14} para transferir ARN de interferencia¹⁵ y para producir mutaciones dirigidas con oligonucleótidos.¹⁶ Se ha notificado que mediante la transfección por liposomas, las células TER

their capacity to produce chimeras.^{3,14} Most protocols using liposomes agree that it is an efficient transfection method. Among the different protocols that have been used to transfect murine ES cells, there are no reports that describe transfection of a relatively large DNA fragments to induce gene replacement through homologous recombination, which would be necessary when the aim is to produce a fusion protein or to add a new gene in a specific site of the genome. In this study, gene targeting efficiency is compared with electroporation and lipofection in mES cells with a gene replacement plasmidic vector.

Plasmid pWAP-lox-neo-Tk-3 is a gene targeting construct (11.8 kb) based on a pBluescript with a 5kb mWAP (mouse whey acid protein gene) genomic DNA inserted in the multiple cloning site, that includes all four exons, modified with a multiple enzyme restriction site (Kpn I, Sal I, Bam HI, Nsi I, EcoR I, KpnI) in the Kpn I restriction site from exon I and a lox-neo-Tk cassette in the BamHI site in exon IV; The plasmid has a unique XhoI restriction site that linearizes the construct at the mWAP 5' end.¹⁶ Plasmid was amplified in *E. coli* XL1competent cells* and DNA was purified with the commercial kit Concert Rapid Plasmid Maxi-prep System** following manufacturer's instructions.

E14 TG2 mES¹⁷ cells were cultured in ES medium, according to some authors,¹⁷⁻¹⁹ but modified because Knock out medium*** was used, supplemented with Knock out serum substitute,† according to manufacturer's recommendations, supplemented with 1000 U/mL of murine leukemia inhibitory factor (mLIF),‡ without feeder cells. Since cell growth was slow when ES cells were cultured in chemically defined medium, 10% of filter sterilized conditioned medium was added to the ES medium (ES-LIF-C medium). Conditioned medium was prepared by culturing NSTO¹⁷ cells in ES medium without mLIF for 24-48 hrs. Cells were maintained at 37°C, RH 95% relative humidity, 5% CO₂, and passed every 48hrs. Before transfection, mES cells were fed with fresh ES-LIF-C medium twice, 24hrs and 2hrs, respectively, and dispersed by trypsinization.

Electroporation was done according to Vazquez *et al.*,¹⁷ a suspension of mES cells (5 to 12 × 10⁶) in ES medium was added with 20 µg of XhoI linearized plasmid, placed in an electroporation cuvette of 4mm gap and incubated at room temperature for 5 to 10 min; cells were electroporated in a BTX Genotronics ECM 830,* at 260 V, 6 ms, at 250 µFD within a square wave, incubated for 15 min at room temperature and then seeded in a gelatinized tissue dish with ES-LIF-C medium.¹⁷

Lipofection was performed with LipofectA-MINE™** following manufacturer's recommendations. Two separate tubes were prepared with 100

mantienen su pluripotencia y capacidad para producir quimeras.^{3,14} La mayoría de los protocolos que utilizan liposomas concuerdan en que se trata de un método de transfección eficiente. Entre los diferentes protocolos que se han utilizado para transfectar células TEr, no hay informes que describan la transfección de un fragmento de ADN relativamente largo para producir mutagénesis dirigida por recombinación homóloga, lo cual sería necesario cuando el objetivo es producir una proteína de fusión o introducir un nuevo gen en un sitio en específico del genoma. En el presente estudio se compara la eficiencia en la mutagénesis dirigida entre electroporación y lipofección en células TEr con un vector plasmídico de reemplazo.

El plásmido pWAP-lox-neo-Tk-3 es un constructo para mutagénesis dirigida (11.8 kb) con base en un pBluescript con fragmento de ADN genómico de 5 kb correspondiente al gen de proteína ácida sérica de leche de ratón (WAPr), insertado en el sitio de clonación múltiple, que incluye los cuatro exones del gen, modificado con un sitio múltiple de restricción enzimática (Kpn I, Sal I, Bam HI, Nsi I, EcoR I, KpnI) en un sitio Kpn I del exón I y un cassette lox-neo-Tk en un sitio BamH I del exón IV; el plásmido presenta un sitio único de restricción enzimática XhoI que linealiza al constructo en la terminación 5' del gen WAPr.¹⁶ Este plásmido fue amplificado en células competentes *E. coli* XL1* y el ADN fue purificado con el estuche comercial Concert Rapid Plasmid Maxiprep System** según las instrucciones del fabricante.

Las células TEr E14 TG2a¹⁷ fueron cultivadas en medio ES, de acuerdo con algunos autores,¹⁷⁻¹⁹ modificado porque se usó medio knock out*** complementado con sustituto de suero knock out,† según las instrucciones del fabricante, con 1 000 U/mL del factor inhibidor de la leucemia murino (LIFm),‡ sin células alimentadoras. Como consecuencia de que en el crecimiento celular de las células TEr fue lento cultivando bajo medio químicamente definido, se adicionó 10% de medio condicionado esterilizado mediante filtración al medio ES (medio ES-LIF-C). El medio condicionado fue preparado cultivando células NSTO¹⁷ en medio ES sin LIFm durante 24 a 48 h. Las células se incubaron a 37°C, con 95% de humedad relativa y 5% de CO₂; realizando pasajes cada 48 h. En dos ocasiones antes de la transfección (24 y 2 h, respectivamente), a las células TEr se les cambió el

*Life Technologies, Gibco BRL, Invitrogen, Estados Unidos de América.

**Life Technologies, Gibco BRL, Invitrogen, Estados Unidos de América.

***Life Technologies, Gibco BRL, Invitrogen, Estados Unidos de América.

†Life Technologies, Gibco BRL, Invitrogen, Estados Unidos de América.

‡Esgro, Chemicals, Estados Unidos de América.

μ L knock out medium, one with 4 μ L of LipofectAMINETM and the other with 1 μ L (1 μ g) of linearized plasmid; tubes content was mixed and incubated at room temperature for 45 min at room temperature for DNA-liposome complex formation; then 1×10^6 cells in 800 μ L knock out medium were added, mixed every 20 min during incubation (37°C, 95% RH and 5% CO₂) for 2 hrs and seeded in 10 cm diameter tissue culture dishes.

After 24 hrs of transfection, ES medium was replaced by fresh ES-LIF-C medium supplemented with 200 μ g/mL G418.*** This medium was changed every 24 hrs for 12 days; then neomycin resistant colonies were counted, collected and expanded individually in 24-well plates with the same fresh medium and DNA was extracted for PCR analysis.

Genomic DNA extraction and purification was performed with FTACards,† according to the manufacturer's recommendations with some modifications, as briefly described. Expanded colonies were disgregated by trypsinization, cells were counted, diluted and 100 μ L of cell suspension (1 cell/ μ L) were placed on a card, allowing to dry at room temperature for 1 hr and then stored in an envelope with desiccant until they were used for PCR analysis. A 2 mm diameter sample from the card was cut, washed and vortexed in a 1.5 mL microcentrifuge tube three times with 200 μ L FTA reagent, two times with TE-1 buffer and a final wash with deionized sterile nucleases free water. Between washes fluid was completely discarded and after the last wash, the paper with DNA sample was dried for 1 hr at room temperature, in sterile conditions.

PCR and nested PCR (Figure 1a) were performed using nuclease free deionized sterile water, DNA sample, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M of each primer*, 1U of Taq DNA polimerase,** 200 μ M dNTP's*** each and the manufacturer's PCR buffer under the following thermocycling conditions: initial denaturation 1 min at 94°C; 35 cycles of denaturalization 94°C 30 sec, alignment 54°C 70 sec, elongation 72°C 90 sec; final elongation 72°C 8 min; stabilization period 4°C 8 min. External primers AF 5'GCCTCCACACTCTTAGAA3' and AR 5'TTGGAACATGGACTGAAC3' were designed to anneal in the mWap gene promoter region (absent in pWAP-lox-neo-Tk-3 transgen), upstream from the transgene's homology region and with exon 2 of the mWap gene. This reaction was prepared with the Whatman paper containing the DNA genomic sample (or 0.5 μ L of DNA positive control with approximately 5ng), for a 10 μ L volume reaction, to amplify a 1474bp (wild type) or 1504bp (targeted mutation) fragments.

Nested	PCR	internal	primers	BA
5'TGTGTGGCCAAGAAGGAA3'			and	BR

medio ES-LIF-C por medio recién preparado, antes de la transfección se dispersaron mediante tripsinización.

La electroporación se realizó según Vázquez *et al.*;¹⁷ se adicionaron 20 μ g de ADN de plásmido linealizado con XhoI a una suspensión de células TEr (5 a 12×10^6) en medio ES colocadas en una cubeta de electroporación de 4 mm de gap y se incubó durante 5 a 10 min; las células fueron electroporadas en un electroporador BTX ECM830* a 260 V, 6 ms, a 250 μ FD en una onda cuadrática; se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y finalmente se sembraron en la caja de cultivo celular gelatinizada con medio ES-LIF-C.

La lipofección se realizó con LipofectAMINETM** siguiendo las instrucciones del fabricante. Se prepararon dos tubos con 100 μ L de medio knock out cada uno, a uno se le adicionaron 4 μ L de LipofectAMINETM y al otro 1 μ L (1 μ g) del plásmido linealizado; el contenido de ambos tubos se mezcló e incubó durante 45 min a temperatura ambiente para dar lugar a la formación del complejo ADN-liposomas; posteriormente se adicionaron 800 μ L de una suspensión de 1×10^6 células en medio knock out, mezclando cada 20 min durante su incubación (37°C, 95% HR y 5% CO₂) durante 2 h para después sembrarlas en cajas de cultivo celular de 10 cm de diámetro.

Después de 24 h de la transfección el medio ES-LIF-C fue sustituido por medio ES-LIF-C suplementado con 200 μ g/mL de G418;*** este medio se cambió cada 24 h durante 12 días; después las colonias neomicina resistentes fueron contadas, colectadas y expandidas individualmente en cajas de 24 pozos con el mismo medio, con el fin de extraer de aquí el ADN para realizar el análisis mediante PCR.

La extracción y purificación del ADN genómico se hizo utilizando FTACards† de acuerdo con las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones, según se describe brevemente. Las colonias expandidas fueron dispersadas por tripsinización, las células se contaron, se diluyeron y 100 μ L (1 célula/ μ L) de la suspensión de células se colocaron en la tarjeta, dejando secar a temperatura ambiente durante 1 h y después se guardaron en un sobre con desecante hasta ser utilizadas para su análisis por PCR. Llegado el momento se cortó un círculo de 2 mm de diámetro de cada muestra de la tarjeta, se lavó agitando con vórtex en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, tres veces con 200 μ L de reactivo FTA, dos veces con TE-1 amortiguador y un lavado final con agua desionizada estéril libre de nucleasas; el fluido se eliminó después

*Genotronics, Holanda.

**Life Technologies, Gibco BRL, Invitrogen, Estados Unidos de América.

***Sigma Chemical, Estados Unidos de América.

†Whatman Laboratorios, Estados Unidos de América.

5'AGAAGTGACCAGGGCCT3' amplified a 475bp (wild type) or 505bp (targeted mutation) fragment from an internal region of the mWAP gene amplified by PCR. As DNA source, 5 µL from the first PCR reaction was used for a 50 µL reaction.

For RFLP analysis, nested PCR product was digested with EcoRI† to differentiate random integration from targeted integration colonies (Figure 1a). A 10µL nested PCR reaction sample was added to 0.2µL EcoRI (12U/µL),‡ 3µL of 10X digestion buffer,° 0.3µL bovine serum albumin°° (10 µg/µL), 0.3µL 100X espermidin,°°° 4µL of pBR322^ 10ng/µL (as internal digestion control), 12.2µL sterile deionized water for a 30µL reaction, incubated at 37°C for 1 hr. Each RFLP reaction was split and analyzed in two different agarose gels, a 3% agarose gel, (Figure 1b) and a 1% agarose gel (for the internal control plasmid; Figure 1c). RFLP from nested PCR targeted mutation colonies (+HR) produced two (338bp plus 167bp) or three (an additional non digested 475bp) bands considering if both alleles (homozygous) or only one (heterozygous) had a targeted mutation. Fragments from wild type mWAP gene (-HR) of colonies with random integration no digestion was expected (only the non digested 475bp band from both alleles was found) since it did not have the EcoRI restriction site.

As a whole, from five repetitions, a total of 41×10^6 cells were electroporated and 8×10^6 cells lipofected. The total number of colonies surviving G418 selection was 434 and 256, respectively; and the total number of gene targeting events found after analyzing 155 and 128 colonies per treatment were 7 and 6 for electroporation and lipofection, respectively. Proportions of colonies surviving selection after transfection and proportions of gene targeting events were compared by X^2 (test for two independent samples) in a 2×2 contingency table with a formula corrected by continuity. A difference ($P < 0.001$) between the proportion of positive transfectants (T+) was found, but no differences ($P > 0.7$) were found between treatments in the proportion of gene targeting (+HR) events (Table 1).

Overall transfection efficiency was 3.2 times higher for lipofection (0.0032%) than for electroporation (0.0010%). Homologous recombination efficiency was very similar between lipofection (4.68%) and electroporation (4.51%). Absolute homologous recombination efficiency was estimated in 1.5×10^{-6} for lipofection and 0.478×10^{-6} for electroporation.

The transfection ratio (3.2:1) between lipofection and electroporation in mES cells, agrees with other authors,^{7,14} who reported a 3-4:1 index. There are other studies that compare lipofection against electroporation in different kinds of cells and conditions. However, results of these reports are not comparable with the ones of this study, since it has been proven

de cada lavado y al final del último lavado el papel con la muestra de ADN se dejó secar durante 1 h a temperatura ambiente, en condiciones estériles.

El PCR y el PCR anidado (Figura 1a) se realizaron utilizando agua desionizada estéril, la muestra de ADN, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 µM de cada primer,* 1U de Taq ADN polimerasa,** 200 µM de cada dNTP*** y tampón de PCR del fabricante bajo las siguientes condiciones en un termociclador: Desnaturalización inicial 1 min a 94°C; 35 ciclos de denaturalización 94°C 30 s, alineación 54°C 70 s, elongación 72°C 90 s; elongación final 72°C 8 min; periodo de estabilización 4°C 8 min. Los iniciadores externos AF 5'GCCTCCACACTCTTAGAA3' y AR 5'TTGGAACATGGACTGAAC3', fueron diseñados para alinearse en la región del promotor del gen WAPr (ausente en el transgene pWAP-lox-neo-Tk-3), corriente arriba de la región de homología del transgene, y con el exon 2 de WAPr; esta reacción se preparó con el recorte de papel Whatman que contenía la muestra de ADN genómico (o bien, 0.5 µL de ADN para el testigo positivo con aproximadamente 5 ng), para una reacción de 10 µL, amplificando un fragmento de 1 474 pb (para el tipo silvestre) o 1 504 pb (para el fragmento con mutagénesis dirigida).

Los iniciadores internos para el PCR anidado BA 5'TGTGTGGCCAAGAAGGAA3' y BR 5'AGAAGTGACCAGGGCCT3' amplificaron un fragmento de 475 pb (tipo silvestre) o 505 bp (mutación dirigida) de la región interna del gen WAPr amplificado por el PCR. Como fuente de ADN se utilizaron 5 µL de la primera reacción de PCR para una reacción de 50 µL.

Para el análisis por RFLP, el producto del PCR anidado fue digerido con EcoRI† para diferenciar las colonias con integraciones al azar de las colonias con mutagénesis dirigida (Figura 1a). Se agregaron 10 µL de la reacción del PCR anidado de cada muestra junto con 0.2 µL de EcoRI (12U/µL),‡ 3 µL de tampón 10X° para la reacción de digestión, 0.3 µL de albúmina sérica bovina°° (10 µg/µL), 0.3 µL de 100X espermidina,°°° 4 µL de pBR322^ 10 ng/µL (como testigo interno de la digestión), 12.2 µL de agua desionizada estéril para una reacción de 30 µL, que fue incubada a 37°C durante 1 h. Cada reacción de RFLP se dividió para analizarla en dos diferentes geles de agarosa, uno al 3% (Figura 1b) y otro al 1% (para el plásmido

*Life Technologies, Gibco BRL, Invitrogen, Estados Unidos de América..

**Biogénica/Biotecnologías Universitarias, México.

***Biogénica/Biotecnologías Universitarias, México.

†Promega, Estados Unidos de América.

‡Promega, Estados Unidos de América.

°Promega, Estados Unidos de América.

°°Promega, Estados Unidos de América.

°°°Biogénica/Biotecnologías Universitarias, México.

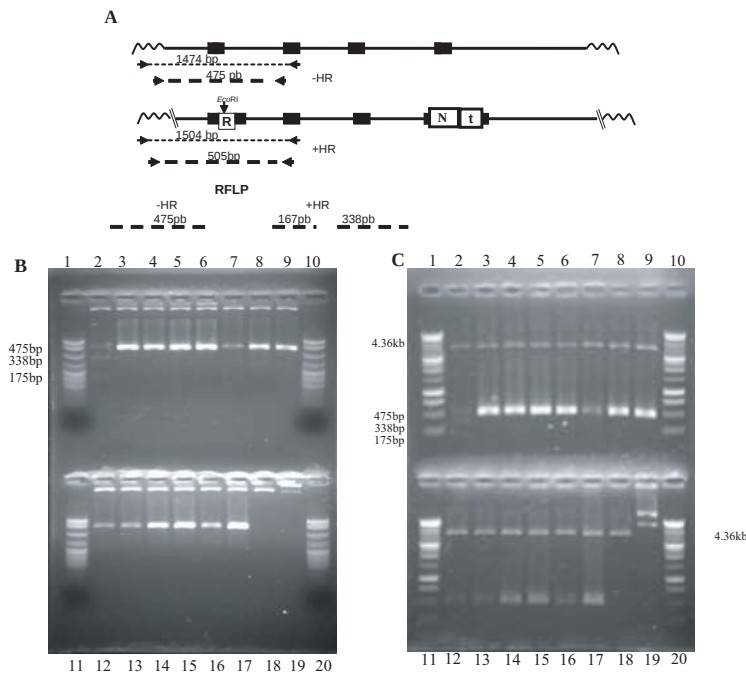


Figura 1: A. Representación esquemática del diagnóstico, realizado mediante PCR anidado y RFLP, para diferenciar el alelo silvestre (-HR) del gen WAPr del alelo modificado (+HR) por mutagénesis dirigida con un vector de reemplazo (pWAP-lox-neo-Tk-3). 1) PCR: -HR. La línea horizontal gruesa representa al gen WAPr tipo silvestre con 4 exones (cajas numeradas 1 a 4). 2) PCR: +HR. Representa al gen WAPr modificado por mutagénesis dirigida (WAPrm). Las cajas numeradas representan los exones respectivos. Las cajas R y NT representan un nuevo sitio de restricción EcoRI y al gen de resistencia a G418 (análogo de neomicina) insertados, respectivamente, en los exones I y IV. Las flechas horizontales, que en los diagramas 1 y 2 flanquean a las líneas interrumpidas delgadas, representan a los iniciadores y al producto de la primera reacción de PCR que amplifica desde la región del promotor (no incluida en el transgene) hasta el segundo exón y que produce amplificadores de diferente tamaño (1 474 y 1 504 pb) para los alelos tipo silvestre y el mutado, respectivamente. Las flechas que flanquean las líneas interrumpidas gruesas representan a los iniciadores y al producto del PCR anidado que amplifica un fragmento interno del primer amplificado y que resulta en 475 y 505 pb para los alelos tipo silvestre y modificado, respectivamente. La flecha vertical indica el nuevo sitio EcoRI insertado en el gene modificado por recombinación homologa (+HR) y que es utilizado para el análisis por RFLP del producto del PCR anidado. 3) RFLP: Las líneas interrumpidas representan los fragmentos de ADN amplificados por la reacción de PCR anidado. El alelo -HR representa un amplificado de 475 pb que no puede ser digerido por EcoRI (alelo silvestre) y el alelo +HR representado por dos líneas interrumpidas gruesas (167 y 338 pb) que representan el producto de la digestión por la enzima EcoRI que sólo puede ocurrir en el alelo modificado por mutagénesis dirigida. B y C. Identificación de eventos de mutagenesis dirigida en el gen WAPr a través de electroforesis en gel de los amplificadores por PCR anidado y digeridos con la enzima EcoRI. El producto de la digestión del PCR anidado y digerido con EcoRI se dividió para su análisis en un gel de agarosa al 3% (B) y otro al 1% (C). B) En el carril 1 se aprecia el marcador de peso molecular, en el segundo se observa un clon (L1.2) con mutación dirigida en uno de sus alelos, por lo que muestra tres bandas: las bandas 338pb y 167pb corresponden al alelo con mutación dirigida (+HR), y una banda de 475pb del alelo de tipo silvestre. Los carriles 3 a 9 y 12 a 17 muestran bandas de tipo silvestre (475 bp) de colonias transfectadas que no sufrieron recombinación homologa (-HR). C) Los carriles 2 a 9 y 12 a 17 son las mismas muestras del gel B, cada una muestra una banda de 4363pb del pBR322 (linear) utilizado como testigo interno de la digestión de con Eco RI; en el carril 18 el pBR322 linearizado solo, y en el carril 19 pBR322 mostrando dos estados conformacionales no digeridos. Los carriles 1, 10, 11 y 20 de ambos geles, son marcadores de peso molecular.

Figure 1: A. Schematic representation of nested PCR and RFLP diagnostic method to differentiate the wild type allele (-HR) from the mWAP gene of the modified allele (+HR) through gene targeting with a replacement type vector (pWAP-lox-neo-Tk-3). 1) PCR: -HR. Horizontal thick line represents the wild type WAPr gene with four exons (numbered boxes 1 to 4). 2) PCR: +HR. Represents the modified mWAP gene through gene targeting. Numbered boxes represent respective exons. Boxes R and NT represent new restriction EcoRI sites and the G418 resistance gene (neomycin analog) inserted in exons I and IV, respectively. Horizontal arrows, flanking the interrupted thin lines in diagrams 1 and 2, represent the primers and the first PCR reaction product which amplifies from the promoter region (not included in the transgene) through the second exon, producing different size bands (1474 and 1504 bp) for the wild type and targeted alleles, respectively. Arrows flanking thick interrupted lines represent the primers and the nested PCR product, amplifying 475 and 505 bp for the wild type and targeted alleles, respectively. Vertical arrows indicate the new EcoRI site inserted in the gene targeted (+HR) used for the RFLP analysis from the nested PCR product. 3) RFLP: interrupted lines represent DNA fragments amplified by nested PCR reaction. Wild type allele (-HR) is represented by a 475bp band which can not be digested by EcoRI. The targeted allele (+HR) is represented by two interrupted thick lines (167 and 338), product of the EcoRI digest that could only occur in a targeted gene. B and C. Identification of gene targeted events in the mWAP gene through gel electrophoresis in agarose gel from the nested PCR amplification fragments digested with EcoRI enzyme. Analysis of the product of the EcoRI digested nested PCR amplification reaction was conducted by splitting the digestion reaction in two agarose gels (3% and 1%). Lane 1 shows the molecular weight marker, lane 2 shows a clone (L1.2) targeted in one allele, therefore three bands can be appreciated: bands 338bp and 167bp that correspond to a gene targeted allele (+HR), and the 475bp band that corresponds to a wild type allele. Lanes 3 to 9 and 12 to 17 show wild type bands (475 bp) of transfected colonies that did not undergo homologous recombination (-HR). C) Lanes 2 to 9 and 12 to 17 show the same samples than those of the gel B, each sample shows a 4363bp from the linear pBR233 plasmid used as internal control reaction for the EcoRI digestion reaction; lane 18 shows the digestion reaction of pBR322 plasmid alone, and in lane 19 are shown two conformational forms of the undigested pBR322. lanes 1, 10, 11 and 20 in both gels, are molecular weight markers.

Cuadro 1

COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA ENTRE ELECTROPORACIÓN Y LIPOFECCIÓN
PARA PRODUCIR TRANSFECCIÓN Y MUTACIÓN DIRIGIDA EN CÉLULAS
TRONCOEMBRIONARIAS DE RATÓN

COMPARISON OF EFFICIENCY BETWEEN ELECTROPORATION AND LIPOFECTION TO
PRODUCE TRANSFECTION AND GENE TARGETING IN MURINE EMBRYONIC STEM CELLS

Transfection (five repetitions per treatment)	Number of transfected cells (Total)	G418 resistant colonies (T+)	Gene targeting analysis (+RH)	
			Colonies T+ analyzed	Colonies +RH
Electroporation	41×10^6	434 ^a	155*	7 ^c
Lipofection	8×10^6	256 ^b	128*	6 ^c

^{a,b}Different superscripts within columns denote significant difference ($P < 0.001$) and with the same literal^c denote no difference ($P > 0.7$) by χ^2 . T+ are positive transfected colonies that expressed resistance to G418 neomycin by random or targeted integration. +RH are T+ colonies that were gene targeted in exon I of the mWAP gene.

*Due to protocol intrinsic difficulties, number of colonies analyzed was not even.

that transfection efficiency varies within techniques according to the cell type²⁰ or to the *in vivo* or *in vitro* application, because there are *in vivo* factors that affect liposomes transfection efficiency, like serum presence or poor perfusion of liposomes into the target organ.^{21,22}

Results presented in this study suggest that lipofection can be used to produce gene targeting in transgenic mice, since Ma *et al.*¹⁴ demonstrated that this method does not affect the pluripotency quality nor the state of indifferentiation of the mES cells or their capacity to produce germ line chimeras when they worked GFP gene expression.

Microelectroporation²³ is an *in vitro* transfection method that has been recently adopted by many researchers and it has a high homologous recombination efficiency (10^{-1}); however, this method still has the disadvantage of requiring sophisticated and delicate equipment and highly trained personnel, which still leaves lipofection as simple and cost effective transfection method to produce transgenic gene targeted mice. It would be interesting to compare these methods under the same conditions of mES cells, because results could be affected by the target gene, vector used, type of cell and skills of the personnel performing the techniques.^{4,20,23}

In conclusion, lipofection is a good alternative over conventional electroporation as transfection method for gene targeting in mES cells, because it is equally efficient for targeted mutations by homologous recombination and more efficient to obtain transfected cells with less effort, economic cost and equipment.

testigo interno de la digestión, Figura 1c). El RFLP del PCR anidado generó en las colonias con mutagénesis dirigida (RH+) dos (338 pb y 167 pb) o tres (475 pb fragmento no digerido, adicional a los fragmentos antes mencionados) bandas según si la mutación dirigida afectó a los dos alelos (homocigótica) o a uno solo (heterocigótica); en el caso de las colonias con recombinación azarosa (RH-) el gen WAPr de tipo silvestre no se esperaba que se digiriera (banda de 475 pb de ambos alelos) por carecer del sitio de restricción *Eco* RI.

Se realizaron cinco transfecciones para cada tratamiento, con 41×10^6 células electroporadas y 8×10^6 células lipofectadas, de las cuales sobrevivieron a la selección con G418, 434 y 256, respectivamente; y de éstas después de analizar 155 colonias de electroporación y 128 de lipofección, el total de eventos de mutación dirigida fue de 7 y 6, respectivamente. La proporción de colonias sobrevivientes a la selección después de la transfección y la proporción de eventos con mutación dirigida fueron comparados por la prueba de ji-cuadrada (para dos muestras independientes) en tabla de contingencia de 2×2 con fórmula corregida por la continuidad. Se encontraron diferencias ($P < 0.001$) entre las proporciones de transfectantes positivos (T+), pero no hubo diferencias ($P > 0.7$) entre tratamientos en las proporciones de eventos con mutaciones dirigidas (RH+) (Cuadro 1).

La eficiencia de transfección fue 3.2 veces mayor para la lipofección (0.0032%) que para la electroporación (0.0010%). La eficiencia de recombinación homóloga fue muy similar entre lipofección (4.68%) y electroporación (4.51%). Haciendo un aproximado,

Acknowledgements

This work was supported by the Autonomous University of the State of Mexico, 1887/2004 SIyEA-UAEM Project and the Project 28207M from the Science and Technology National Counsel (Conacyt for its Spanish meaning) from Mexico. Special thanks to the scholarship support from UAEM, CONACYT (174059) and COMECYT (FO-CMCYT-05) and to Dr James Derr from Texas University A&M for technical support through the Students Mobilization Program (SEP-FIPSE) Globalization of Education in Animal and Poultry Science.

Referencias

1. THOMAS K, CAPECCHI R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51(3): 503-512.
2. HASTY P, RIVERA-PEREZ J, CHANG C, BRADLEY A. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4509-4517.
3. AMURA C R, MAREK L, WINN R A, HEASLEY L E. Inhibited neurogenesis in JNK1-deficient embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 10791-10802.
4. BOLLAG R J, WALDMAN A S, LISKAY M. Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 1989; 23: 199-225.
5. TAREK M. Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation. *Biophys J* 2005; 88: 4045-4053.
6. CAPECCHI M R. How close are we to implementing gene targeting in animals other than mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 956-957.
7. BUGÉON L, SYED N, DALLMAN M J. A fast and efficient method for transiently transfecting ES cells: application to the development of systems for conditional gene expression. *Transgenic Res* 2000; 9: 229-232.
8. HASEGAWA S, HIRASHIMA N, NAKANISHI M. Microtubule involvement in the intracellular dynamics for gene transfection mediated by cationic liposome. *Gene Ther* 2001; 8: 1669-1673.
9. LAKKARAJU A, RAHMAN Y, DUBINSKY J M. Low-density lipoprotein receptor-related protein mediates the endocytosis of anionic liposomes in neurons. *J Biol Chem* 2002; 277: 15085 - 15092.
10. RAVIV U, NEEDLEMAN D J, LI Y, MILLER H P, WILSON L, SAFINYA C R. Cationic liposome-microtubule complexes: Pathways to the formation of two-state lipid-protein nanotubes with open or closed ends. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11167-11172.
11. HYUN S, LEE G, KIM D, KIM H, LEE S, NAM D *et al.* Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblast transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod* 2003; 69: 1060-1068.
12. MCCREATH K J, HOWCROFT J, CAMPBELL K H, COLMAN A, SCHNIEKE A E, KIND A J. Production of la eficiencia de recombinación homóloga absoluta fue de 1.5×10^{-6} para la lipofección y de 0.478×10^{-6} para la electroporación.

El índice de transfección (3.2:1) entre lipofección y electroporación en células TEr, es similar al obtenido por otros autores,^{7,14} quienes han notificado un índice de 3-4:1. Existen otros estudios que comparan lipofección contra electroporación en otros tipos de células y condiciones; sus resultados no los podemos comparar con los de este estudio, debido a que se ha comprobado que la eficiencia en la transfección varía entre técnicas de acuerdo con el tipo de célula²⁰ o a su aplicación *in vivo* o *in vitro*, ya que hay factores *in vivo* que afectan la eficiencia de transfección con liposomas, como es la presencia de suero o bien una mala perfusión de liposomas hacia algún órgano.^{21,22}

Los resultados que aquí se presentan sugieren que la lipofección puede utilizarse para producir mutación dirigida en células TEr, lo que sumado a los hallazgos de Ma *et al.*,¹⁴ que demostraron que este método no afecta el estado de indiferenciación ni la pluripotencialidad de las células TEr ni su capacidad para producir quimeras de línea germinal cuando trabajaron con la expresión del gen GFP, sugiere que la lipofección podría ser utilizada en la producción de ratones transgénicos.

La microelectroporación²³ es un método de transfección *in vitro* que han adoptado recientemente muchos investigadores, tiene alta eficiencia de recombinación homóloga (10^{-1}); sin embargo, este método presenta la desventaja de requerir equipo sofisticado, delicado y de personal altamente calificado, lo cual mantiene a la lipofección como un método de transfección de elección si se considera que es una técnica sencilla y económica para producir mutagénesis dirigida en células TEr. Sería interesante comparar estos métodos bajo las mismas condiciones de gen diana, vector utilizado, tipo de célula (TEr) y mismo personal (con mismas habilidades técnicas), ya que los resultados pueden verse afectados grandemente por estos factores.^{4,20,23}

En conclusión, la lipofección es buena alternativa sobre la electroporación convencional como método de transfección para producir mutagénesis dirigida en células TEr, debido a que es igualmente eficiente que la electroporación para obtener mutación dirigida por recombinación homóloga y más eficiente para obtener células transfectadas con menos esfuerzo, dinero y equipo.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por la Universidad Autónoma del Estado de México bajo el proyecto 1887/2004 SIyEA-UAEM y el proyecto 28207M del Con-

- gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000; 29, 405: 1066-1069.
13. LEE J T, JAENISCH R. A method for high efficiency YAC lipofection into murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 5054-5056.
 14. MA H, LIU Q, DIAMOND S L, PIERCE E A. Mouse embryonic stem cells efficiently lipofected with nuclear localization peptide result in a high yield of chimeric mice and retain germline transmission potency. *Methods* 2004; 33: 113-120.
 15. YANG S, TUTTON S, PIERCE E, YOON K. Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7807-7816.
 16. DEKKER M, BROWERS C, RIELE H. Targeted gene modification in mismatch-repair-deficient embryonic stem cells by single-stranded DNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 27-34.
 17. VÁZQUEZ J C, NOGUESS C, RUCKER E B, PIEDRAHITA J A. Factors affecting the efficiency of introducing precise genetic changes in ES cells by homologous recombination: tag-and-exchange versus the cre-loxp system. *Transgenic Res* 1998; 7 : 181-193.
 18. JOYNER A L. GENE TARGETING A Practical Approach. In: Rickwood D, Hames D, editors. The Practical Approach Series. Toronto, Canada: OIRL Press., 1992: 85-97.
- sejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), de México. Se agradece el soporte en becas de la UAEM, del Conacyt (174059) y el Comecyt (FO-CMCYT-05), así como el apoyo técnico del Dr. James Derr, de la Universidad de Texas A&M, a través del Programa de Movilización Estudiantil (SEP-FIPSE), Globalization of Education in Animal and Poultry Science.
-
19. HOGAN B, BEDDINGTON R, CONSTANTINI F, LACY E. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Cold spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
 20. HANSON K D, SEDIVY J M. Analysis of biological sections for High-efficiency gene targeting. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 45-51
 21. ABE A, MIYANOHARA A, FRIEDMANN T. Enhanced Gene Transfer with Fusogenic Liposomes Containing Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein. *J Virol* 1998; 72: 6159-6163.
 22. GROSSINI L, COUNIL-HENRIONNET C, MIR L M, LIAGRE B, DUMAS F, ETIENNE S *et al.* Direct gene transfer into rat articular cartilage by *in vivo* electroporation. *FASEB J* 2003; 17: 829-835.
 23. TEMPLETON N S, ROBERTS D D, SAFER B. Efficient gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Gene Therapy* 1997; 4 : 700-709.