



Capítulo 6

Procedimientos para el sexaje de embriones bovinos por PCR

Autores: Luisa Fernanda Ortiz Román
y Diana Maritza Echeverry Berrío

En los casos en los que no se puede realizar fertilización con semen sexado para obtener animales con el sexo requerido según las necesidades, el sexaje de embriones mediante la técnica de PCR puede ser una herramienta útil antes de transferir los embriones, aunque es una metodología aún en perfeccionamiento, especialmente en cuanto a la toma de la muestra del embrión. El sexaje por PCR es especialmente útil en procesos de investigación en los cuales se requiere determinar el sexo de los embriones obtenidos (por ejemplo, cuando se utilizan aditivos en los medios y se quiere determinar su efecto sobre la proporción de sexos). En este capítulo se describen los pasos básicos para el sexaje de embriones bovinos por PCR.

Remoción de zona pelúcida de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para la remoción de zona pelúcida de embriones bovinos para obtener material genético con fines de diagnóstico molecular
- **Materiales:** Termo de boca ancha, tijeras curvas, guantes de látex, termómetro, tubos cónicos de 50 ml, hielo, overol, botas, casco y gorro blancos.
- **Medios:** solución con pronasa 0,5%, PBS suplementado con PVP al 0,3%, solución de lisis (RTL) (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1).

El proceso de remoción de zona pelúcida se debe realizar con el fin de evitar que los espermatozoides adheridos en la zona pelúcida interfirieran con los resultados del sexaje, dando falsos machos positivos.

Procedimiento:

En cabina de flujo laminar:

- Seleccionar los embriones en estadio transferible (mórula compacta, blastocisto temprano, blastocisto expandido) o aquellos a los que se les desee realizar extracción de DNA o RNA.
- Lavar cada embrión pasándolo por 4 gotas de 100 µl de PBS suplementado con PVP al 0,3%.
- Pasar a una gota de 100 µl de solución de pronasa al 0,5% durante 2 a 5 minutos en observación permanente bajo estereoscopio, vigilando constantemente los cambios en la zona pelúcida.
- Al presentar cambios que indiquen degradación, pasar inmediatamente a una gota de 100 µl de PBS+PVP al 0,3% y pipetear manualmente hasta desprender la zona pelúcida restante.
- Tomar las células embrionarias y pasar a tubos de micro centrífuga de 1,5 ml con 20 µl de solución de lisis (RTL) activada.
- Almacenar a -80°C hasta el momento de su procesamiento. (ver figura 6.1)

Purificación de ADN total a partir de células

- **Propósito:** Explicar los procedimientos para la purificación de DNA total a partir de células de embriones bovinos producidos *in vitro*.

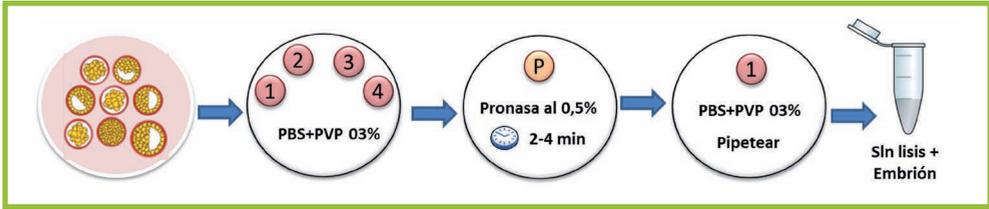


Figura 6.1 Diagrama de remoción de zona pelúcida.

- **Materiales:** Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, micropipetas de 100 y 1000 μ l, puntas para las micropipetas, kit Dneasy Blood & Tissue, etanol puro, PBS 1X.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, centrífuga, baño serológico, vórtex.

Procedimiento previo a la extracción:

En cabina de flujo laminar:

- Adicionar 125 ml de etanol al 100% al buffer AW1 para obtener 220 ml de buffer, y 160 ml de etanol al 100% para obtener 226 ml de buffer AW2 (ver figura 6.2).

Procedimiento de extracción:

En cabina de flujo laminar:

1. A los embriones resuspendidos en solución de lisis en un tubo de 1,5 ml, agregar 200 μ l de PBS 1X y 20 μ l de proteinasa K y mezclar varias veces (ver figura 6.3 A).



Figura 6.2. Activación de buffers AW1 y AW2.

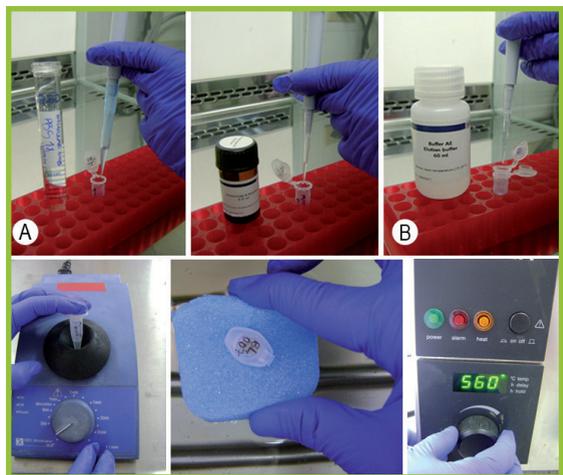


Figura 6.3 A. Adición de PBS y proteinasa K; B. Adición de buffer de lisis e incubación de la muestra.

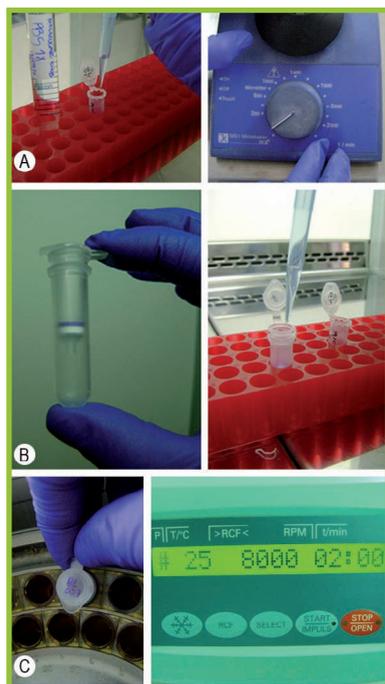


Figura 6.4 A. Adición de etanol 100% y vórtex para homogenizar; B. Columna Mini Dneasy; C. Número de revoluciones por minuto (RPM) en centrifuga.



Figura 6.5 A. Transferencia de columna a tubo de colección; B. Número de revoluciones por minuto (RPM) en centrifuga y descarte de tubo de colección.

2. Adicionar 200 μ l de buffer de lisis AL, agitar en el vórtex e incubar en el baño serológico a 56°C durante 10 minutos, temperatura en la cual la proteinasa K es funcionalmente activa (ver figura 6.3 B).
3. Pasados los 10 minutos, retirar los tubos del baño serológico, agregar 200 μ l de etanol al 100% a la muestra y mezclar por vórtex. Es importante que la muestra y el etanol se encuentren bien homogenizados (ver figura 6.4 A).
4. Con una micropipeta de 1000 μ l, tomar la mezcla y transferirla a la columna Mini Dneasy (ver figura 6.4 B).
5. Centrifugar a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 minutos y descartar el tubo dejando libre la columna (ver figuras 6.4 C y 6.4 A).
6. Transferir la columna a un nuevo tubo de colección y agregar 500 μ l de buffer de lavado AW1 (ver figura 6.5 A).
7. Centrifugar nuevamente a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 minutos, y descartar de nuevo el tubo dejando libre la columna (ver figura 6.5 B).
8. Transferir la columna a un nuevo tubo de colección y agregar 500 μ l de buffer de lavado AW2 (ver figura 6.6 A).
9. Centrifugar a 20000 xg (14000 rpm) durante 4 minutos (ver figura 6.6 B).
10. Transferir la columna a un tubo de micro-centrífuga de 1,5 ml y agregar 50 μ l de buffer de elusión AE (ver figura 6.6 C).
11. Centrifugar a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 minutos y adicionar nuevamente 50 μ l de buffer de elusión, centrifugar por última vez a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 minutos y descartar la columna (ver figura 6.7).
12. Guardar el DNA a -80°C para ser empleado en la PCR.



Figura 6.6 A. Adición de buffer de lavado; B. Número de revoluciones por minuto (RPM); C. Retiro de columna y adición de buffer de elusión.



Figura 6.7. Paso final en la elusión del DNA

Amplificación de DNA total para sexaje de embriones

Propósito: Explicar los cálculos y pasos a realizar en la PCR para determinar el sexo de los embriones.

- **Materiales:** Tubos de microcentrífuga de 0,2 ml, micropipetas de 2, 20, 100 y 1000 µl, puntas libres de nucleasas para las micropipetas,
- **Reactivos:** Cloruro de magnesio ($MgCl_2$), Taq buffer con KCl, dNTP (dinucleótidos trifosfato), Taq polimerasa, primer BOV97M (F), primer BOV97M (R), primer satélite 1,715 (F), primer satélite 1,715 (R), agua destilada desionizada estéril.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar

Procedimiento: Antes de iniciar:

- Limpiar con abundante alcohol la cabina y las micropipetas, y dejar todos los materiales a emplear bajo luz UV por 15 minutos.

- Los primers empleados en la reacción de amplificación se reconstituyen con agua libre de nucleasas a una concentración de 100 mM. Para ello hay que agregar 10 veces la cantidad de nanomoles en agua; por ejemplo, si estos vienen a 36,5 nanomoles, para dejarlos a 100 mM se agrega 360 μ l de agua libre de nucleasas.
- Una vez reconstituidos los primeros, preparar una solución de trabajo a 10 mM.
- Los dNTP se preparan también a una concentración de 10 mM para emplearlos como solución de trabajo en la PCR; para ello se emplea la fórmula:
V1: volumen que se desea encontrar
C1: concentración de la que se parte, para el caso de los dNTP sería 100 mM
V2: volumen total de la reacción
C2: concentración final que se desea obtener

Cálculos:

Entendiendo que, normalmente, a la hora de remitirse a los procedimientos de una PCR, esta siempre se expresa en términos de concentración, hay que tener en cuenta una serie de cálculos a realizar para saber el volumen a tomar de cada uno de los reactivos empleados.

La mezcla de la reacción en la PCR para el sexaje de los embriones contiene:

- 2,5 mM de $MgCl_2$
- 1X de Taq buffer con KCl
- 0,2 mM de cada dNTP (adenina, timina, guanina, citocina)
- 0,3 mM de cada primer BOV97M
- 0,06 mM de cada primer satélite 1,715
- 1 Unidad de Taq polimerasa
- 17,6 μ l del DNA molde

Entonces, empleando la fórmula anteriormente descrita, $V1C1 = V2C2$, es necesario calcular el volumen a emplear así:

Para el $MgCl_2$

V1 = volumen a encontrar
C1 = 25 mM (concentración a la que viene el cloruro de magnesio)
V2 = 25 μ l (volumen final para la PCR)
C2 = 2,5 mM
 $V1 = 25 \mu l * 2,5 \text{ mM} / 25 \text{ mM}$
V1 = 2,5 μ l



Nota: Los cálculos se realizan para una muestra (ver tabla 6.1), pero dicho valor se multiplica por el número de muestras a procesar.

Tabla 6.1 Concentración de los reactivos empleados en la PCR

Reactivo	Concentración	Volumen
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 µl
Taq buffer con KCl	1X	2,5 µl
Di nucleótidos trifosfato (dNTP)	0,2 mM	0,5 µl
Primer BOV97M (F)	0,3 mM	0,75 µl
Primer BOV97M (R)	0,3 mM	0,75 µl
Primer satélite 1,715 (F)	0,06 mM	0,15 µl
Primer satélite 1,715 (R)	0,06 mM	0,15 µl
Taq polimerasa	1 U	0,2 µl
DNA		17,6 µl

Procedimiento para la PCR:

En un tubo de 1 ml agregar cada uno de los reactivos. Es recomendable agregar por último la Taq polimerasa, para evitar reacciones inespecíficas.

Después de agregar cada reactivo, mezclar por pipeteo y cambiar de punta.

Una vez mezclados todos los reactivos de la Mix, agregar el DNA en un lugar fuera de la cabina de PCR.

Finalmente, llevar los tubos para el termociclador y configurar el siguiente perfil térmico (ver figura 6.8):

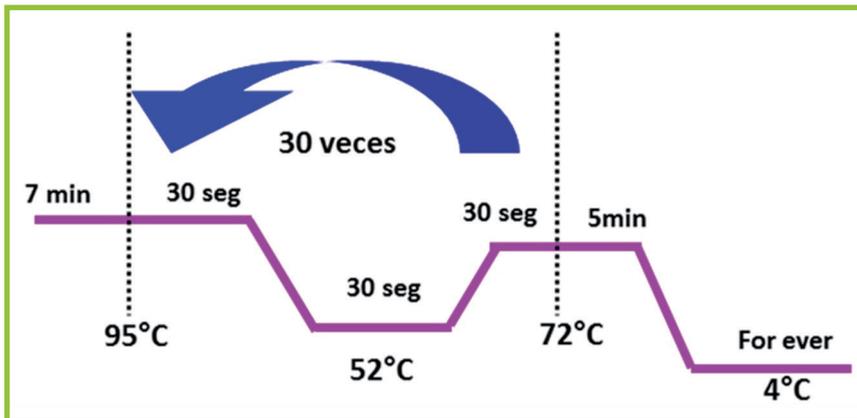


Figura 6.8. Esquema de perfil térmico en la PCR.

Procedimiento para la reamplificación de PCR

Dado que la concentración de DNA extraído de cada embrión es tan baja ($\approx 8 \text{ ng}/\mu\text{l}$), es necesario hacer una reamplificación para poder obtener un alto número de copias visibles bajo luz UV.

En un tubo de 1,5 ml agregar los reactivos que se indican en la tabla 6.2:

Tabla 6.2 Concentración de los reactivos empleados en la reamplificación

Reactivo	Concentración	Volumen
MgCl ₂	2,5mM	2,5 μl
Taq buffer con KCl	1X	2,5 μl
Di nucleótidos trifosfato (dNTP)	0,2 mM	0,5 μl
Primer BOV97M (F)	0,27 mM	0,675 μl
Primer BOV97M (R)	0,27 mM	0,675 μl
primer satélite 1,715 (F)	0,06 mM	0,15 μl
primer satélite 1,715 (R)	0,06 mM	0,15 μl
Taq polimerasa	1 U	0,2 μl
DNA		3 μl
Agua destilada desionizada estéril		14,85 μl

Una vez realizada la Mix (toda la mezcla sin el DNA), agregar 24 μl de esta a cada tubo de PCR. Finalmente, agregar 2 μl del producto de PCR anterior a cada tubo y llevar al termociclador con el mismo perfil térmico de la primera PCR.

Nota: Es importante que la Mix se realice en un lugar con luz UV, ya sea una cabina de bioseguridad o un cuarto, pero el DNA se agrega fuera de este sitio para evitar contaminaciones.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

- **Propósito:** Indicar los pasos a seguir para el revelado del producto de PCR.
- **Materiales:** papel parafilm, micropipeta de 20 μl , puntas libres de nucleasas estériles, erlenmeyer de 100 ml.
- **Reactivos:** buffer TAE 1X (ver capítulo 2), marcador de peso molecular de 50 bp, DNA loading buffer dye 6X.
- **Equipos:** balanza, cámara de electroforesis, fuente de poder, fotodocumentador.



Procedimiento:

- Pesar en una balanza 1,5 gr de agarosa grado molecular y ponerla en un erlenmeyer de 100 ml (ver figura 6.9 A).
- Adicionar 100 ml de buffer TAE 1X (ver figura 6.9 B).
- Calentar la mezcla hasta que quede homogenizada por completo (ver figura 6.9 C)
- Enfriar en agua para reducir la cantidad de vapores (ver figura 6.10 A)
- Agregar 10 μ l de bromuro de etidio a una concentración de 5 mg/ml y mezclar suavemente (ver figura 6.10 B).

Con cuidado y sin inhalar los vapores, depositar la mezcla en la cubeta de electroforesis y colocar suavemente la peinetas (ver figura 6.10 C).

Una vez realizado el gel:

- Retirar la peinetas, con cuidado de no dañar los pozos (ver figura 6.11 A).
- Agregar dentro de la cubeta buffer TAE 1X hasta cubrir los pozos del gel (ver figura 6.11 B).



Figura 6.9 A. Medición de la cantidad de agarosa; B. Adición de buffer TAE; C. homogenización de la agarosa.



Figura 6.10 A. Reducción de vapores; B. Adición de bromuro de etidio; C. Adición de la mezcla en la cama de electroforesis.

- Sobre el papel parafilm, agregar 3 μ l de DNA loading buffer dye 6X y 20 μ l del producto de PCR (el reamplificado) y mezclarlo con el DNA loading buffer dye 6X (ver figura 6.11 C)
- Sembrar 3 μ l de marcador de peso molecular en el primer pozo del gel seguido, y sembrar la mezcla de la muestra con el dye 6X en el gel (ver figura 6.12 A).
- Instalar los electrodos de la cámara de electroforesis: rojo con rojo y negro con negro en la fuente de poder (ver figura 6.12 B).
- Correr el gel a 60 V durante 40 minutos (ver figura 6.12 C)

Nota: la presencia de burbujas en la cámara de electroforesis indica que la energía eléctrica está correctamente conectada.

Pasados los 40 minutos, retirar cuidadosamente la tapa de la cámara de electroforesis, retirar el gel y situarlo en el fotodocumentador.

Encender la luz UV y observar el amplificado. La presencia de dos bandas (141 bp y 216 bp) indica que el embrión es macho, y la presencia solo de la banda de 216 bp indica que es hembra (ver figura 6.13).

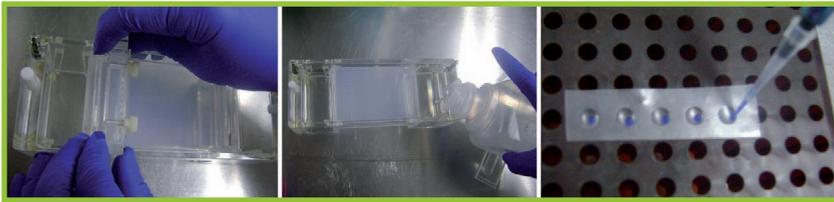


Figura 6.11 A. Retiro de peinetá; B. Adición de buffer TAE en la cámara de electroforesis; C. Mezcla dye con el producto de PCR.



Figura 6.12 A. Siembra de muestras en el gel; B. Instalación de electrodos en la cámara; C. Regulación del voltaje.



Figura 6.13. Gel de agarosa; resultados de sexaje de 10 embriones bovinos producidos *in vitro*.



Bibliografía recomendada

Nedambale TL, A Dinnyes, X Yang, XC Tian (2004) Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification, *Biol Reprod* 71, 1671-1676.

Kit DNeasy® Blood & Tissue. Quiagen. 25-27.

