J.H. Calvo, A. Martínez-Royo, P. Sánchez, J.L. Alabart, J. Folch

SEXAJE DE EMBRIONES EN OVINO MEDIANTE PCR ESPECÍFICA Y PCR-DUPLEX

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **102** N.º 4 (354-359), 2006

Sexaje de embriones en ovino mediante PCR específica y PCR-duplex

J.H. Calvo, A. Martínez-Royo, P. Sánchez, J.L. Alabart, J. Folch

Unidad de Tecnología en Producción animal. CITA. Apd. 727. 50080-Zaragoza

Resumen

Dentro del esquema de mejora por prolificidad puesto en marcha por la UPRA- Carnes Oviaragón desde 1994, se contempla que la producción de los machos a testar se realice a través de un programa MOET. Con el objetivo de aumentar la eficiencia y la rentabilidad del MOET, se planteó poner a punto el sexaje de los embriones previamente a su transferencia. El sexaje de embriones se realizó mediante amplificación específica por PCR de un fragmento de ADN del cromosoma Y (*SRY* gene; GenBank Acc. Z30265). Mediante cebadores específicos diseñados en este locus, se amplifica un fragmento de 166 pares de bases en las muestras procedentes de animales o de embriones machos, mientras que en las muestras procedentes de hembras no se produce amplificación, al carecer las mismas de este locus. Igualmente, y con el fin de incrementar la seguridad de la técnica, y evitar la aparición de falsos negativos, se ha llevado a cabo la puesta a punto de una PCR duplex. Esta PCR consiste en una doble amplificación de dos fragmentos de ADN mediante PCR, uno del gen *CGN (*GenBank Acc. AY785290), gen estructural que se amplifica tanto en machos como en hembras, y por otra parte el fragmento específico de ADN del cromosoma Y (*SRY* gene). Los estudios de sensibilidad a partir de ADN genómico extraído de sangre mostraron un límite mínimo de detección de 20 pg de ADN, mientras que en ensayos con diferente número de células procedentes de una biopsia de embriones se encontró que se puede sexar un embrión a partir de dos células.

Palabras clave: sexaje, ovino, PCR, MOET

Summary

Sex determination in ovine embryos by duplex PCR: production of genetic improvement rams

An accurate, sensitive, and quick method for determining the sex of ovine embryos was developed using polymerase chain reaction (PCR) primers derived from an ovine-specific Y-chromosome (*SRY* gene; GenBank Acc. Z30265), amplifying a 166 bp DNA fragment in male samples. To increase the sensibility and specificity of the technique a duplex PCR was carried out, using one pair of ovine-specific primers (*CGN* gene: GenBank Acc. AY785290) and one pair of Y-chromosome-specific primers. *CGN* fragment provides an internal positive control for amplification. Using this method we can determine the sex up to 20 pg of DNA from blood. In the same way, sex of embryos was determined from two cells.

Key words: sex determination, sheep, MOET, PCR

Introducción

La técnica MOET consiste en superovular las hembras de alto valor genético, inseminarlas con semen de machos adecuados y obtener los embriones, que son transferidos a otras hembras receptoras. Esta tecnología permite explotar mejor el potencial genético de los animales y acelerar la velocidad de selección (Nicholas, 1996). Por dicha razón, dentro del esquema de mejora por prolificidad puesto en marcha por la UPRA-Carnes Oviaragón desde 1994 se contempla que la producción de machos que van a ser testados se realice a través de un programa MOET. Desde los años 80 se van realizando numerosos estudios para poner a punto la técnica MOET en ovino. Sin embargo, el número de descendientes obtenidos en cada superovulación sigue siendo relativamente bajo. Evidentemente, la técnica sería más rentable y efectiva si se pudiese conocer sexo de los embriones obtenidos previamente a su transferencia, sin que ello afectase a la fertilidad. La determinación del sexo usando ADN genómico extraído de carne, sangre, pelo o biopsias embrionarias se está realizando como un requisito indispensable en la ciencia forense y en la producción animal. En concreto, la determinación del sexo en los embriones se realiza mediante la amplificación por PCR de secuencias específicas del cromosoma Y, como es el gen SRY (Griffiths y Tiwari, 1993; Pomp *et al*., 1995). Sin embargo, siendo que la fiabilidad de la técnica es el aspecto más importante que concierne a la identificación del sexo, la ausencia de amplificación puede indicar un falso negativo. De este modo, para dotar de la máxima fiabilidad a la técnica, es necesario la realización de una PCR duplex, o bien la amplificación de secuencias de ADN comunes en machos y en hembras, pero que se diferencien por amplificar fragmentos de diferente tamaño o con el mismo tamaño pero con diferentes polimorfismos entre los dos sexos. En cuanto a la PCR duplex en ovino, que consiste en la amplificación simultánea de un fragmento específico del cromosoma Y y otro fragmento control que se amplifica tanto en machos como en hembras, hasta el momento se han descrito dos trabajos (Gutiérrez-Adan *et al.*, 1997; Mara *et al.*, 2004). En cuanto a la amplificación de un fragmento del mismo tamaño en machos y hembras pero con diferentes polimorfismos entre los dos sexos, destaca el trabajo realizado por Aasen y Medrano (1990), en el que amplifican y detectan diferentes polimorfismos específicos de hembras y machos mediante la digestión con enzimas de restricción (RFLPs) en el locus ZFX/ZFY. Sin embargo, la técnica de RFLPs requiere una reacción adicional alargando el diagnóstico y disminuyendo la sensibilidad de la técnica. Por otro lado, en relación a la amplificación de secuencias de ADN comunes en machos y en hembras, pero que se diferencien por amplificar fragmentos de diferente tamaño según el sexo, Pfeiffer y Brenig (2005), amplificaron el gen de la amilogenina tanto en hembras como en machos, apareciendo una única banda en el caso de las hembras y tres en el caso de los machos. Sin embargo, en humana se han descrito fallos en la fiabilidad de la técnica debido a una delección del polimorfismo de la doble copia del gen en el cromosoma Y en machos con una frecuencia del 0.6 al 8% (Santos *et al*., 1998). Por tanto, esta delección debería ser testada previamente en ovino antes de utilizarla como gen marcador del sexo, ya que la frecuencia que presenta en humana hace que no sea fiable al menos en esta especie. El presente trabajo ha sido realizado con el objetivo de poner a punto una técnica rápida y sensible, que permita el sexaje de embriones a partir de un número mínimo de células embrionarias, produciendo un daño mínimo al embrión, y que permita mantener los embriones en cultivo y transferirlos frescos, sin necesidad de congelación.

Material y métodos

Extracción de ADN

La extracción de ADN se ha realizado a partir de diferente número de células procedentes de biopsias de mórulas y blastocistos ovinos, mediante el kit de extracción "BLOODCLEAN DNA Purification kit" (Biotools). La extracción de las células de los embriones se realizó mediante aspiración de las mismas, puncionando la membrana pelúcida. En total se analizaron 30 muestras de las cuales 5 tenían entre 9 y 12 células, 15 entre 5 y 8 células, y 10 entre 1 y 4 células.

Previo a los ensayos con embriones se realizaron pruebas de sensibilidad mediante dilución a partir de ADN genómico extraído de células sanguíneas, tanto de animales machos como hembras. Dicha extracción se realizó con el método de Lahiri *et al*. (1992). Las diluciones utilizadas contenían 20ng, 2 ng, y 200, 20, 2, 0.2 pg de ADN. Los estudios de sensibilidad fueron llevados a cabo para la PCR específica y para la PCR duplex.

PCR específica

El sexaje de embriones se realizó mediante amplificación específica por PCR de un fragmento de ADN del cromosoma Y (*SRY* gene; GenBank Acc. Z30265). La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 5 pmol de cada cebador, 200 nM dNTPs, 2.2mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 y 0.8 U Taq polymerasa (Biotools). Se realizaron 35 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 94ºC durante 30 s, de hibridación a 55ºC durante 30 s, y de extensión a 72ºC durante 40 s. La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

PCR duplex

Igualmente, con el fin de incrementar la seguridad y sensibilidad de la técnica, se ha llevado a cabo la puesta a punto de una PCR duplex en dos etapas. Esta PCR consiste en una doble amplificación de dos fragmentos de ADN mediante PCR, uno del gen *CGN (*GenBank Acc. AY785290), gen estructural que se amplifica tanto en machos como en hembras, y por otra parte el fragmento específico de ADN del cromosoma Y (*SRY* gene). La amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo 5 pmol de cada cebador, 200 nM dNTPs, 2.2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 y 1.2 U Taq polymerasa (Biotools). Se realizaron 20 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 94ºC durante 30 s, de hibridación a 55ºC durante 25 s, y de extensión a 72ºC durante 45 s. La segunda etapa consistió en una reamplificación a partir de 10 µl del producto PCR resultante usando las mismas condiciones de amplificación, con excepción de que se realizaron 25 ciclos de amplificación en un volumen final de 40 µl. Como en el caso de la PCR simple se realizaron estudios de sensibilidad en las mismas condiciones que los descritos con anterioridad. La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

Resultados y discusión

Con la metodología descrita se amplificó un fragmento de 166 pares de bases (pb) en las biopsias procedentes de embriones machos, mientras que en las muestras procedentes de hembras no se produce amplificación, al carecer las mismas de este locus (figura 1). Los estudios de sensibilidad a partir de ADN genómico extraído de sangre mostraron un

límite mínimo de detección de 20 pg de ADN, cantidad de ADN inferior a la contenida en una célula. En ensayos con diferente número de células procedentes de una biopsia de embriones se encontró que se puede detectar un embrión macho a partir de 5 células. A partir de una cantidad menor de células existe cierta probabilidad de aparición de falsos negativos (figura 1). En la figura 1 se muestran los resultados de uno de los experimentos en el que se analizaron distintos números de células procedentes de diferentes embriones. Sólo la línea 7 y 11 serían hembras, mientras que el resto de muestras serían machos. Sin embargo, la línea 11 es un falso negativo ya que con cuatro células la amplificación fue negativa, mientras que con 12 células (línea10) la amplificación fue positiva y por lo tanto el embrión era macho.

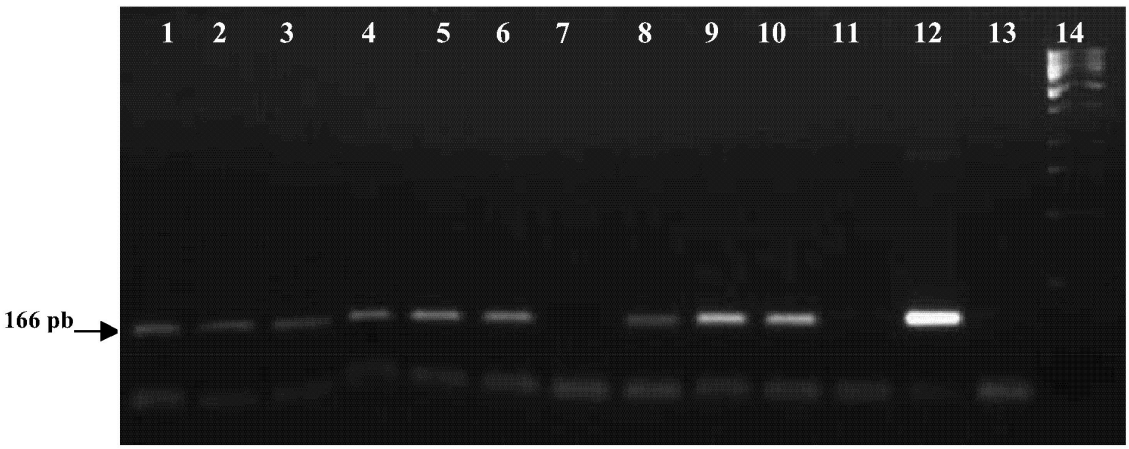


Figura 1. Sexaje mediante PCR específica del gen SRY sobre embriones con diferente número de células, en la que se puede ver la amplificación de un fragmento de 166 pares de bases (pb) en los embriones machos. La línea 11 es un falso negativo ya que con cuatro células la amplificación fue negativa, mientras que con 12 células (línea10) la amplificación fue positiva y por lo tanto el embrión era macho. Líneas 1 y 10: 12 células, línea 4: 10 células, línea 5: 8 células, líneas 3, 7 y 9: 7 células, líneas 2 y 6: 5 células, línea 11: 4 células, línea 8: 3 células, línea 12: control positivo (ADN extraído de sangre de un animal macho), línea 13: control negativo (ADN extraído de sangre de un animal hembra), línea 14: marcador de talla.

Figure 1. Sex determination using SRY specific PCR using genomic DNA from embryos with different cells number. The band of 166 base pairs (bp) corresponds to male embryos. Lane 10 and 11 are samples from the same embryo, showing the sample 11 a false negative result. Lanes 1 and 10: 12 cells, lane 4: 10 cells, lane 5: 8 cells, lanes 3, 7 and 9: 7 cells, lanes 2 and 6: 5 cells, lane 11: 4 cells, lane 8: 3 cells, lane 12: positive control (Male DNA sample from blood), lane 13: negative control (Female DNA sample from blood), lane 14: size marker.

Para evitar la aparición de falsos negativos, y aumentar la sensibilidad de la técnica se realizó la puesta a punto de una PCR doble, de forma que en muestras procedentes de hembras aparece una única banda de 243 pb, mientras que en las muestras procedentes de machos aparecen dos bandas de 166 y 243 pb (figura 2).

Los estudios de sensibilidad a partir de ADN genómico extraído de sangre mostraron un

límite mínimo de detección de 20 pg de ADN, cantidad inferior al ADN contenido en una célula. En ensayos con diferente número de células procedentes de una biopsia de embriones se encontró que se puede detectar un embrión macho a partir de dos células (figura 2). Con una única célula se observó que aunque algunos PCRs amplifican con éxito el fragmento específico del macho y el fragmento control, en otros experimentos no aparece ni esta banda ni el control.

En todos los ensayos realizados, los embriones biopsiados mantuvieron un crecimiento normal cuando fueron cultivados "in vitro".

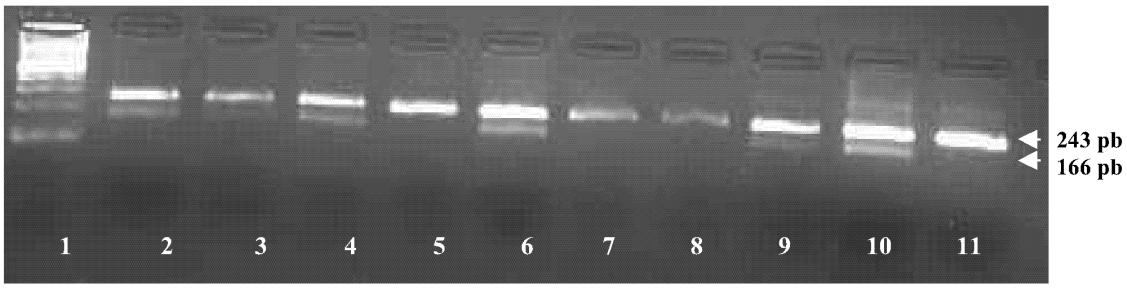


Figura 2. PCR duplex de los genes SRY y CGN sobre embriones con diferente número de células, en la que se puede ver la amplificación de dos fragmentos de 166 y 243 pares de bases en los embriones machos, y un único fragmento de 243 pares de bases en los embriones hembras. Línea 1: Marcador de talla, línea 2: 8 células, líneas 3 y 7: 3 células, línea 4: 5 células, línea 5: 12 células, línea 6: 10 células, línea 8: 2 células, línea 9: 4 células, línea 10: control positivo (ADN extraído de sangre de un animal macho), línea 11: control negativo (ADN extraído de sangre de un animal hembra).
Figure 2. Sex determination using SRY and CGN specific duplex PCR using genomic DNA from embryos with different cells number. The bands of 166 base pairs (bp) and 243 bp correspond to male embryos. One band of 243 bp corresponds to female embryos. Lane 1: size marker, lane 2: 8 cells, lanes 3 and 7: 3 cells, lane 4: 5 cells, lane 5: 12 cells, lane 6: 10 cells, lane 8: 2 cells, lane 9: 4 cells, lane 10: positive control (Male DNA sample from blood), línea 11: negative control (Female DNA sample from blood).

Conclusiones

Nuestros resultados indican que es posible realizar el sexaje de embriones ovinos a partir de dos células, produciendo un daño mínimo al embrión, y en un tiempo de 5 horas, lo que permite mantener los embriones en cultivo y transferirlos frescos, sin necesidad de congelación.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto CEDETI (pr 2004-611).

Bibliografía

Aasen E, Medrano JF, 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. Biotechnology 8(12): 1279-1281.

Griffiths R, Tiwari B, 1993. Primers for the differential amplification of the sex-determining region Y gene in a range of mammal species. Mol. Ecol. 2(6): 405-406.

Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JI, Hodes ME, Crisp M, 1992. A nonorganic and nonenzymatic estraction method gives higer yields of genomic DNA from whole-blood samples than other methods tested. J. Biochem. Bioph. Meth 25 (4): 193-205.

Mara L, Pilichi S, Sanna A, Accardo C, Chessa B, Chessa F, Dattena M, Bomboi G, Cappai P, 2004. Sexing of in vitro produced ovine embryos by duplex PCR Mol. Reprod. Dev. 69 (1): 35-42.

Nicholas FW, 1996. Genetic improvement through reproductive technology. Anim. Reprod. Sci. 42: 205-214

Pfeiffer I, Brenig B, 2005. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (Ovis aries) and European red deer (Cervus elaphus). BMC Genetics 6: Art. No. 16 2005

Pomp D, Good BA, Geiser RD, Corbin CJ, Conley AJ, 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or day-11 pig embryos. J. Anim. Sci. 73 (5): 1408-1415.

Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C, 1998. Reliability of DNA-based sex tests. Nat. Genet. 18 (2): 103-103.

(Aceptado para publicación el 5 de junio 2006)