GENERACIÓN DE UNA GENOTECA DE ADNc DE OVIDUCTO DE CONEJO Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE ESTs.

M. Merchán[1], R. Peiró[2], J.M. Folch[1]

[1]Unitat de Genètica i Millora Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària, UAB. 08193 Bellaterra. [2]Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, P.O. Box 22012, 46071 Valencia.

INTRODUCCIÓN

El oviducto de los mamíferos está sometido a cambios bioquímicos y fisiológicos inducidos por las hormonas durante el ciclo estral y durante la gestación temprana. Estos cambios aportan el microambiente necesario para la maduración de los gametos, la capacitación de los espermatozoides, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. La secreción oviductal es un fluido bioquímicamente complejo y su principal componente son las proteínas. Una parte de éstas procede del exudado sérico, pero la otra parte es expresada y liberada por el propio epitelio oviductal (Killian, 2004).

A pesar del interés que presenta este órgano reproductivo, actualmente son relativamente pocos los estudios realizados sobre la caracterización de los genes expresados específicamente en oviducto tanto de conejo como de otras especies domésticas. Esta falta de conocimiento representa un obstáculo en el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la fecundación y las primeras fases del desarrollo embrionario.

El análisis de ESTs (*Expressed Sequenced Tags*) es una estrategia ampliamente utilizada para la caracterización de la expresión génica. Los ESTs son secuencias cortas y parciales, normalmente de 100-500 pb, de clones de genotecas de ADNc (Graveley, 2001). Una genoteca de ADNc es una colección de moléculas de ADNc recombinantes (generadas por transcripción reversa del ARNm) que representa todos los genes expresados en una determinada célula o tejido en un momento fisiológico determinado (Ying, 2003). El análisis de ESTs es una buena aproximación para descubrir nuevos genes, para identificar las regiones fronterizas entre exones/intrones, y nuevas formas de procesamiento alternativo de genes ya conocidos (Yuan *et al*., 2001). También permite la identificación de las secuencias de genes en especies en las que se desconocían mediante la identificación de similitud nucleotídica o aminoacídica usando el Basic Local Aligment Tool (BLAST). Además, los ESTs pueden ser utilizados para cartografiar en el genoma los genes a partir de los que derivan, permitiendo el desarrollo de mapas genéticos y citogenéticas, y mejorando el mapa comparativo entre especies. Además, son una fuente de genes candidatos para caracteres de interés productivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recogida de muestras. Para la construcción de la genoteca de ADNc se han utilizado muestras de oviducto de 3 conejos pertenecientes a una línea de la Universidad Politécnica de Valencia seleccionada para aumentar la capacidad uterina. Los animales fueron sacrificados a las 62 horas post-monta, verificando previamente, mediante laparoscopia, que hubiesen ovulado. Posteriormente, se les

extrajo el aparato reproductivo y se perfundió el oviducto con PBS. Los tejidos fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80ºC.

Construcción de la genoteca de ADNc. Se realizó la extracción del ARNm de un *pool* de los oviductos de los 3 animales mediante la utilización del kit *Fast Track ® 2.0 mRNA Isolation Kit (Invitrogen).* Una vez comprobada la integridad del ARNm se procedió a la construcción de la genoteca usando el kit *Creator® SMART™ cDNA Library Construction Kit (Clontech).* El vector incluido en este *kit* (pDNR-LIB) permite la clonación direccional del ADNc mediante la incorporación de dianas asimétricas (A y B) para el enzima de restricción *Sfi*I en los extremos 5' y 3' del ADNc, respectivamente. Una vez obtenidos, los plásmidos recombinantes fueron transformados mediante electroporación en células *ElectroMAX™ DH5α-E™ (Invitrogen).* Posteriormente, se determinó el título de la genoteca mediante la siembra en placas de LB ágar que contenían cloranfenicol (30 µg/ml).

Secuenciación de ADN y análisis de ESTs. Se aislaron, sembraron y purificaron 215 clones, que finalmente fueron secuenciados en el secuenciador automático *ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems)* con el kit *Big Dye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* y un primer M13 *Forward* situado en el extremo 5' de los insertos. Previa eliminación de las regiones correspondientes al vector y de los clones redundantes, se analizaron las secuencias de los insertos con el programa BLAST del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para analizar su similitud nucleotídica con las secuencias depositadas en la base de datos del *GenBank.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha construido una genoteca de ADNc no normalizada y clonada direccionalmente a partir del ARNm de muestras de oviducto de 3 conejas sacrificadas a las 62 horas post-monta. En esta fase de la gestación, los embriones (principalmente mórulas) se encuentran todavía en el oviducto. El título de la genoteca es de 6.8×10^6 y el porcentaje de clones recombinantes es del 96%.

Se han aislado y secuenciado un total de 215 clones utilizando el primer M13F localizado en el extremo 5' del inserto. De las 215 secuencias de los clones, 9 no contenían inserto y 6 eran de baja calidad. Los 200 clones restantes han sido clasificados en función del tamaño de los insertos (Figura 1). Para la caracterización de los ESTs se han analizado las secuencias que presentaban una longitud igual o superior a 150 pb y se han clasificado en función de la similitud nucleotídica que presentaban con la base de datos del *GenBank* al utilizar el BLASTN (Figura 2). Se han clasificado como *Genes conocidos* aquellas secuencias que eran homólogas a genes previamente depositados en *GenBank* (E-value < e^{-7}), como *Similares a genes no anotados* a aquellas secuencias que presentaban similitud con secuencias no anotadas (clones de ADN o ADNc) y como *Genes desconocidos* las secuencias que no presentaban homología (no blast o E-value > e^{-7}).

El *kit* utilizado está diseñado para obtener una genoteca enriquecida en moléculas de ADNc completas, sin embargo, los resultados obtenidos indican que gran parte de los insertos corresponden a ARNm incompletos en el extremo 5', aunque normalmente el extremo 3' esta completo. No obstante, para caracterizar ESTs es suficiente con secuencias de 150-400 pb.

El resultado preliminar del análisis de los ESTs indica que hay un porcentaje elevado de ESTs homólogos a genes conocidos o similares a genes no anotados (Figura 2). Este resultado es esperable al tratarse de una genoteca no normalizada, en la que hay un número elevado de ARNm de genes relacionados con el

metabolismo celular que se expresan en un gran número de tejidos y que ya han sido previamente secuenciados e identificados en conejo u otras especies.

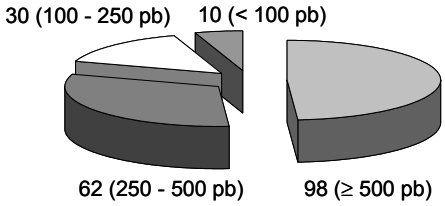


Figura 1. Clasificación de los clones en función del tamaño de sus insertos. No se han incluido los clones sin inserto ni aquellos que presentaban secuencias de mala calidad.

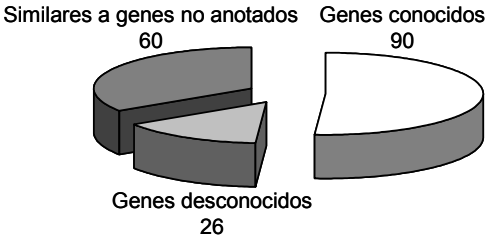


Figura 2. Clasificación de los clones en función de su similitud nucleotídica con la base de datos del *GenBank* al utilizar el BLASTN. Sólo se han considerado las secuencias ≥ 150 pb.

En el hombre y en el ratón se están caracterizando de forma sistemática millones de ESTs (6,052,636 y 4,329,768, respectivamente). En conejo, sin embargo, sólo se han depositado en *GenBank* las secuencias de 2,275 ESTs pero no proceden de estudios de caracterización de la expresión génica de tejidos reproductivos (dbEST NCBI, febrero 2005). La genoteca presentada en este trabajo permitirá la identificación de aquellos genes que se transcriben en el oviducto de conejas a las 62 horas de gestación. La caracterización de los ESTs de este tejido en este momento fisiológico podrá ser utilizada como una fuente de genes candidatos para caracteres importantes desde un punto de vista económico, como es la supervivencia embrionaria pre-implantacional, y también permitirá ayudar a comprender, desde un punto de vista molecular, algunos de los acontecimientos que se producen en el oviducto durante el desarrollo temprano de los embriones.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado con el proyecto MCYT (AGL2001-3068-C03) y con una beca FPI a M.Merchán (MCYT) y a R. Peiró (OCYT).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Graveley, B.R. 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. TRENDS in Genetics. 17 (2). 100-107.

Killian, G.J. 2004. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. Animal Reproduction Science. 82-83. 141-153.

Ying, Shao-Yao. 2003. Generation of cDNA Libraries. Methods and Protocols. Vol. 221. Chapter 1: Complemetary DNA Libraries. An overview. 1-12. Human Press. Totowa, New Jersey.

Yuan, J., Liu, Y., Wang, Y., Xie, G., Blevins, R. 2001. Genome analysis with gene-indexing databases. Pharmacology & Therapeutics. 91. 115-132.