

DETECCIÓN DEL TRANSCRITO REFERENCIAL RPLP0 EN TEJIDO GONADAL DE ALPACA

Detection of reference transcript RPLP0 in gonadal tissue of male alpaca

Florentini E.A.^{1,2}, Vásquez J.H.^{1,2}, Valdivia M.E.¹

¹Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, Instituto de Investigaciones en Ciencias Biológicas "Antonio Raimondi" (ICBAR), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima-Perú.

².email: aeflorentini@gmail.com (Florentini E.A., Vásquez J.H)

INTRODUCCIÓN

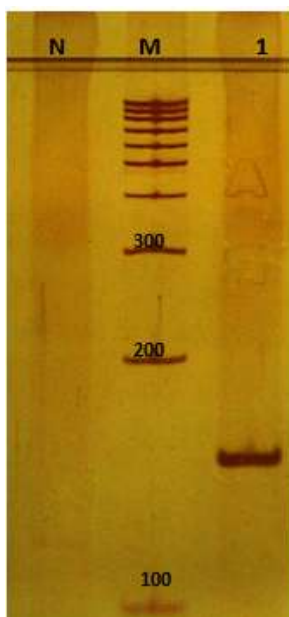
Actualmente se poseen nuevos reportes de numerosos genes, principalmente en mamíferos, asociados a capacidad fertilizante tanto en machos como en hembras. Detectar y cuantificar la expresión de estos genes representa una potente herramienta para validar marcadores de fertilidad, aplicando RT-qPCR tanto a transcritos diana como a genes de referencia. Sin embargo, actualmente hay solo un borrador disponible del genoma de la alpaca (ncbi, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) que posee una cobertura de 70% y una profundidad de solo dos lecturas. RPLP0, una proteína ribosomal, es considerada estable en su expresión y su transcrito es valioso como referencia o *housekeeping* (de Cremoux, Bieche et al. 2004; Goelden, Ukena et al. 2005). El objetivo del presente trabajo fue detectar la expresión de este gen de referencia en tejido gonadal de alpaca macho.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon las secuencias codificantes para RPLP0 disponibles en genbank (NCBI) NM_001098598.1, correspondiente a cerdo (*Sus scrofa*), y NM_001012682.1, toro (*Bos taurus*); ambas al igual que la alpaca, pertenecientes al orden artiodactyla, como elementos de interrogante (query secuencias), contra el genoma borrador de alpaca [BLASTn (NCBI), programa: megablast (algoritmo por defecto); database: Whole-genome shotgun sequences (wgs)]. A partir de las secuencias halladas, se alinearon todas las accesiones usando ClustalX2 (Larkin, Blackshields et al. 2007), con parámetros por defecto. Mediante el programa OLIGO (Rychlik 2007) y además manualmente, se diseñaron iniciadores para PCR. El ADN complementario empleado para la amplificación fue generado mediante el kit #1612 (Fermentas, Lituania) empleando instrucciones del fabricante, con oligo (dT)₁₈ a partir de 1µg de ARN total (*pool*) de biopsia testicular (matriz testicular, 100mg) de 6 individuos sexualmente maduros, en 20µl de reacción. Las condiciones de ciclaje para el testado de estos iniciadores fue: denaturación inicial de 95 °C por cinco minutos, 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, este ciclo se repitió 35 veces. Una vez terminado se hizo una extensión final a 72 °C por siete minutos en un termociclador Boeco TC-PRO. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 8%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia hallada como homóloga, estaba contenida dentro del contig con código de accesión ABRR01366739.1, la cual contenía los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (parcial) de los 7 exones reportados para este gen (Rich and Steitz 1987). De este alineamiento, se consideraron zonas óptimas acordes con los requerimientos típicos de diseño. El iniciador sentido fue: 5'-ATTGAAATCCTGACTGACGTG-3', Y EL iniciador antisentido fue: 5'-CTTCAGGGTTGTAGATGCTG3-3', que generaron un producto de PCR de 154pb. Este amplicón se muestra apto para su empleo como gen housekeeping en futuros ensayos de tiempo real (RT-qPCR)



N: control negativo M: marcador
De peso molecular. 1: mRNA de RPLP0
proveniente de tejido testicular detectado
por RT-PCR.

CONCLUSIONES

Los iniciadores arriba descritos son útiles para detectar la expresión por RT-PCR del transcrito referencial RPLP0, en tejido gonadal de alpaca macho.

REFERENCIAS

de Cremoux, P., I. Bieche, et al. 2004. "Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction." *Endocr Relat Cancer* 11(3): 489-495.

Goelden, U., S. N. Ukena, et al. 2005. "RAR-beta(1) overexpression in chromophobe renal cell carcinoma: a novel target for therapeutic intervention?" *Exp Oncol* 27(3): 220-224.

Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. 2007. "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

Rich, B. E. and J. A. Steitz. 1987. "Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly." *Mol Cell Biol* 7(11): 4065-4074.

Rychlik, W. 2007.. "OLIGO 7 primer analysis software." *Methods Mol Biol* 402: 35-60.