

BIOLOGIA MOLECULAR Y NEFROLOGIA

Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica

A. Hernández, P. Martín Vasallo*, A. Torres y E Salido

Laboratorio de Medicina Interna y Biología Molecular, Departamento de Medicina Interna, Universidad de La Laguna.

* Laboratorio de Biología del Desarrollo, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Laguna.

ESQUEMA GENERAL DE LA EXPRESION DE UN GEN

Para comprender bien los fundamentos de los métodos de estudio de la expresión génica, como son el Northern blot, el ensayo de protección de RNAsas y la estrategia RT-PCR, creemos necesario recordar el proceso de la expresión génica (fig. 1). Pueden encontrarse revisiones bien detalladas sobre esto en otras fuentes especializadas ^{1,2}.

La actividad de un gen comienza con la *transcripción*, proceso que consiste en la síntesis de una molécula de *RNA* mediante el copiado de una porción de una de las hebras del DNA (una unidad de transcripción) que se extiende desde una secuencia génica denominada *promotor* hasta el terminador. La reacción es catalizada por una *RNA polimerasa* y comprende eventos complejos, aún no bien conocidos, de desenrollamiento del DNA, reconocimiento de secuencias consenso del promotor, presencia de factores proteicos de transcripción ³, etc. El primer producto de la transcripción es un *transcrito primario*, una molécula que rápidamente comienza a ser procesada por las *ribonucleasas (RNAsas)* nucleares.

Uno de los primeros eventos del procesamiento ocurre en la región 3' del transcrito y consiste en un corte específico realizado por una endoRNasa y la adición en ese lugar de una secuencia de poliadenosina (*extremo poli-A*) catalizada por la poli-A-poli-merasa utilizando ATP como sustrato. Aunque no todas, la mayoría de las moléculas de RNA que darán lugar a una proteína llevan en su extremo 3' esa cola poli-A, cuya longitud oscila entre 50 y 200 nucleótidos. Al parecer, su función primordial es aumentar la estabilidad del RNA en el citoplasma ^{2,8}; pero, al margen de su función biológica, la presencia de este

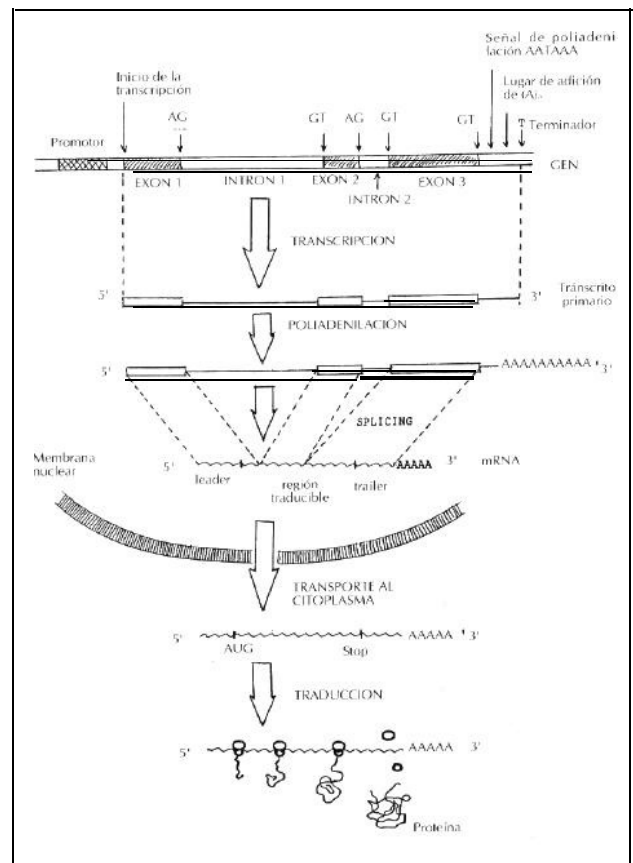


Fig. 1.-Flujo de información de DNA a RNA y proteína para un hipotético gen con .3 exones.

segmento poli-A es crucial para la *clonación de genes* ⁶ y será también de gran utilidad para el procedimiento RT-PCR.

La secuencia de bases de un gen y los aminoácidos del producto génico no son *colineales*, sino que los genes poseen secuencias intermedias de DNA no traducibles a proteína, los *intrones*, que representan como promedio el 75 % de la longitud del gen. Así pues, el transcrito primario es procesado de un modo

Correspondencia: Dr. Armando Torres Ramírez
Servicio de Nefrología.
Hospital Universitario de Canarias.
Ofra, s/n. La Cuesta. La Laguna.
38320 Santa Cruz de Tenerife.

extraordinariamente preciso mediante cortes y empalmes que eliminan las secuencias correspondientes a los intrones: proceso de «*splicing*»⁴. La reacción es catalizada por endoRNAsas que localizan secuencias específicas, y el resultado es el *RNA mensajero (mRNA)* maduro, que únicamente contiene los exones. Como veremos, para el estudio de la expresión mediante el procedimiento RT-PCR es importante conocer, si es posible, la secuencia nucleotídica completa del gen, o por lo menos disponer de una información mínima en lo que se refiere a la localización y tamaños aproximados de exones e intrones.

El mRNA maduro es sustancialmente más largo de lo necesario para codificar solamente su proteína. Un mRNA de tamaño medio tiene aproximadamente 1.000 - 2.000 bases de largo y existen en él dos tramos no traducibles a proteína o UTR («untranslated region»):

- a) 5' UTR o región «*leader*», generalmente corta (< 100 bases).
- b) 3' UTR o región «*trailer*», por lo general bastante larga (incluso de 1.000-2.000 bases en algunos mensajeros de gran tamaño).

Este último tramo no traducible es digno de tener en cuenta en el método RT-PCR y conviene conocer su tamaño, y a ser posible su secuencia, en el gen cuya expresión queremos estudiar. Finalmente, una vez que el mRNA maduro pasa al citoplasma tiene lugar la síntesis *proteica*, un proceso muy complejo, con multitud de eventos, en el que participan los tres tipos de RNA celulares (tRNA, rRNA, mRNA), varias proteínas estructurales (ribosómicas) y factores proteicos de traducción¹.

Es obvio que la expresión génica no es necesariamente un proceso automático una vez se ha iniciado, sino que existen unos niveles de control intermedios que van desde la activación de la estructura del gen (p. ej., por la respuesta generada por una acción hormonal) hasta los procesos postraduccionales (como la eliminación de secuencias peptídicas pre y pro por acción de proteasas, o la regulación de la glicosilación en las proteínas que lo requieren)⁵. No en todos los genes se controla su expresión mediante cada uno de los niveles potenciales de control, sino que para cada gen existe un conjunto particular de eventos que controlan la expresión.

ESTUDIO DE LA EXPRESION GENICA

Estrictamente, el término expresión génica abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se ha localizado en el lugar adecuado y realiza su función, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular. Este hecho puede ser abordado por técnicas de análisis de pro-

teínas («*binding*» molecular, RIA, ELISA, western blot, inmunohistoquímica). Además, si la proteína es un enzima se puede estudiar su grado de expresión titulando su actividad enzimática.

Sin embargo, es un hecho generalmente aceptado que la abundancia de un mRNA y el número de moléculas por célula de ese transcrito se correlaciona con el nivel de síntesis de la proteína correspondiente. Por esta razón, en la práctica, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante *detección y/o cuantificación de los mRNAs* funcionales del citoplasma, y los métodos de estudio utilizados (Northern blot, protección de RNAsa, RT-PCR e hibridación in situ) se basan en su capacidad para detectar mRNAs específicos y no productos proteicos.

Como ya se ha dicho, existen diferentes niveles de control de la expresión. Al parecer, la expresión génica específica de tejido y la expresión regulada durante el desarrollo están sometidas en gran parte a control *transcripcional*³, pero existen muchos genes, sobre todo los que codifican productos que son utilizados y degradados muy rápidamente, en los que predominan los procesos *postranscripcionales* de control⁸, por ejemplo, alteración de la vida media de los mRNAs por un cambio en su tasa de degradación. Es decir, la concentración de mRNAs funcionales disponibles para traducción a proteína depende no sólo de la tasa de síntesis de mRNA, sino también de la *estabilidad relativa* del mRNA una vez en el citoplasma. Cuando se detecta un incremento o reducción del nivel de un mRNA en el estado estacionario en respuesta a un estímulo particular, se puede precisar si esto ocurre por mecanismos transcripcionales. Este estudio se hace habitualmente mediante el *ensayo de «run-olf» nuclear*, en el que, aislando primero los núcleos y suministrando nucleótidos radiactivos como precursores del RNA recién transcrito, se detectan y cuantifican los mRNAs de interés sintetizados durante un período de tiempo controlado⁹. Esto da un índice directo de la *tasa de transcripción del gen*, y si el ensayo no muestra cambios en la transcripción del mensaje, la variación en su nivel se atribuye usualmente a cambios en la estabilidad del mRNA.

Finalmente, la *hibridación in situ* es otra poderosa herramienta para detectar transcritos que, a diferencia del Northern blot, permite localizar el mRNA en áreas de tejido y determinar también la cantidad relativa del mensajero *in situ*.

EXTRACCION DEL RNA CELULAR

La posibilidad de aislar RNA lo más intacto posible es esencial tanto para el clonado de genes como para

el análisis de la expresión génica. El éxito de cualquier extracción de RNA es totalmente dependiente de la eliminación de toda posible contaminación de ribonucleasas (RNAsas) que *degradan el RNA durante y después de la extracción*, provocando bajos rendimientos de RNA de longitud completa.

Las ribonucleasas son enzimas muy resistentes y de gran actividad catalítica¹⁰: a) son marcadamente resistentes al calor, manteniendo incluso una considerable actividad tras un ligero calentamiento; b) son activas dentro de un amplio rango de pH; c) usualmente no requieren cofactores para su actividad; d) algunas, como las RNAsas pancreáticas, se renaturalizan fácilmente después de un tratamiento con agentes desnaturizantes (p. ej., urea).

El contenido de RNAsas endógenas varía con el tejido que se estudia: *páncreas* y *bazo* son tejidos con muy altos contenidos de RNAsas, mientras que *riñón*, *hígado* e *intestino* tienen niveles menores, aunque no despreciables. Un problema adicional es que el contenido de mRNA en cualquier tejido es muy bajo: una célula típica de mamífero contiene aproximadamente 10^{-5} ug de RNA total, del que tan sólo 1-5% corresponde a mRNA¹¹. De ese mRNA, aproximadamente el 50% lo constituyen clases de mensajeros presentes en un número de copias < 10 por célula¹. Por esta razón, una pequeña contaminación de RNAsas, tanto *endógena* (del propio tejido) como *exógena* (del material utilizado, soluciones, manos, polvo, etc.), puede suponer un problema serio, por lo cual se deben tomar algunas precauciones.

Precauciones y metodología general

A diferencia del DNA, el RNA es muy inestable una vez obtenido el tejido, por la presencia de las RNAsas celulares. Por ello resulta crítica la congelación del tejido o su rápida homogeneización en la solución desnaturizante. Una fuente potencialmente grande de contaminación con RNAsas son las manos del investigador por las células epidérmicas que se liberan continuamente. Es por ello obligado el uso de *guantes* tanto al realizar la extracción como al preparar las soluciones. De fundamental importancia para una extracción de RNA intacto con éxito es la ejecución de todas las fases tan rápidamente como sea posible, ya que esto elimina riesgos de contaminación. Los recipientes a utilizar deben ser de plástico y estériles, y si se quiere trabajar con recipientes de cristal es necesario calentarlos a 250° C durante 24 horas o más (ni siquiera el autoclavado nos garantiza la inactivación de ribonucleasas)^{10,11}.

Hay que trabajar, además, con soluciones libres de RNAsas contaminantes, y esto se consigue tratándolas

previamente con *DEPC*. El DEPC (dietil pirocarbonato) es un *agente alquilante* que reacciona covalentemente y de modo inespecífico con las proteínas, pero es muy reactivo con los sitios activos de las RNAsas, inactivándolas muy eficaz, aunque no absolutamente. El DEPC sobrante puede reaccionar con el RNA y es preciso eliminarlo autoclavando las soluciones antes de utilizarlas; así, el DEPC se descompone en etanol y CO₂ que son volátiles.

Una vía para eliminar la degradación de RNA durante la extracción es desnaturizar todas las proteínas celulares, incluyendo las RNAsas. Se utilizan potentes agentes caotrópicos, como las sales de *guanidinio*. Desde hace tiempo¹² se sabe que las proteínas se desnaturizan y, por tanto, pierden su actividad a concentraciones 4M de cloruro de guanidinio, en contraste con la estructura secundaria de los ácidos nucleicos, que casi no se ve afectada. La eficacia del *tiocianato de guanidinio* (GTC) es aún mayor y su uso es prácticamente universal en todos los métodos de extracción de RNA^{10,11,13,14}. Como ejemplo de su efectividad basta decir que la vida media de la RNasa A pancreática es de 3 minutos en 8M urea y de sólo unos 5 segundos en tiocianato de guanidinio 4M¹³. La solución en que el tejido debe ser homogeneizado debe tener 4M GTC, además de *detergentes* (como el SDS o el sarcosil) que ayudan a romper membranas celulares y desnaturizar proteínas, y *agentes reductores* (como el 2-mercapto-etanol) que contribuyen también a la desnaturización proteica mediante la rotura de puentes disulfuro (típicos de las RNAsas).

Tras el homogeneizado del tejido y la desproteínización del RNA con agentes desnaturizantes hay que aislar físicamente el RNA del resto de componentes celulares. Existen dos procedimientos fundamentales para realizar esta separación:

1. *Ultracentrifugación en gradiente de densidad*: basada en la mayor densidad del RNA respecto al resto de los componentes celulares.

2. *Extracción fenólica*: basada en la propiedad de los ácidos nucleicos de ser más solubles en soluciones acuosas que en solventes orgánicos.

Separación del RNA mediante ultracentrifugación

En este método las células son lisadas mediante un triturador de aspas o de émbolo en una solución que contiene 4M CTC. El RNA es entonces sedimentado centrifugando a alta velocidad en un gradiente de cloruro de cesio (CICs). La densidad del RNA (> 1,8 g/ml) es mayor que la del resto de componentes celulares y mayor también que la del CICs 5,7 M (1,1-1,2 g/ml). El resultado es que durante la sedimentación

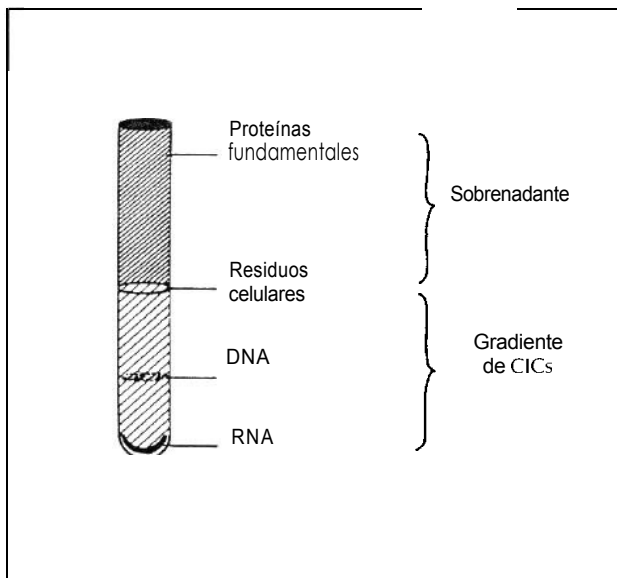


Fig. 2.-Separación física del RNA del resto de los componentes celulares: A) Resultado de la ultracentrifugación del homogeneizado en un colchón de CICs. B) Resultado de la fenolización del homogeneizado en el método de extracción fenólica.

los distintos componentes celulares van quedando a distintas alturas en el tubo, mientras que el RNA forma un pellet en el fondo (fig. 2A). El fluido sobrenadante es luego cuidadosamente retirado con una pipeta Pasteur y el RNA es purificado posteriormente mediante precipitación con etanol y centrifugación.

Es importante en este método homogeneizar bien el tejido porque esto rompe el DNA nuclear y evita la formación de una red impenetrable de DNA en el colchón de CICs que podría bloquear la sedimentación del RNA hacia el fondo del tubo de centrifuga. Con este fin también se suele utilizar una jeringa con una aguja fina para hacer pasar el homogeneizado.

En la tabla I se muestra una variante del conocido método de Chirgwin y cols.¹³ pero otras variantes son igualmente válidas⁹⁻¹¹.

Tabla I. Protocolo resumido del método de extracción de RNA por ultracentrifugación en gradiente de CICs (modificado de 9).

1. Homogeneizar el tejido en CTC, Tris-CIH, 2-ME.
2. Añadir sarcosil y centrifugar a 5.000 g, 10 min.
3. Hacer pasar el sobrenadante por una jeringa.
4. Colocarlo en un colchón de CICs y centrifugar a 30.000 g, 15 h.
5. Lavar el pellet con etanol y resuspender en Tris-EDTA.
6. Precipitar con etanol y centrifugar.
7. Lavar de nuevo con etanol y resuspender en agua tratada con DEPC.

Este método de extracción de RNA presenta varias ventajas:

a) Requiere muy pocas manipulaciones, lo cual elimina el riesgo de contaminaciones esporádicas con RNAsas y requiere poco tiempo.

b) Proporciona RNAs muy poco degradados a partir de muchas fuentes y es el método de elección para tejidos con altos niveles de RNasa endógena (p. ej.: páncreas).

c) El rendimiento es bueno (unos 200 ug RNA a partir de 10^8 células), y la pureza en mRNA es bastante alta porque pequeños RNAs (tRNA y rRNA 5S) tienen menor densidad y no sedimentan con él. También la contaminación con DNA es mínima.

Sin embargo, el hecho de que se requiera una centrifuga a alta velocidad limita el número de muestras que pueden prepararse al mismo tiempo. Este método es preferido para elaboración de genotecas de cDNA en las que se requiere RNA de alta pureza e integridad.

Separación del RNA mediante extracción fenólica

Probablemente los métodos más comunes para extracción de ácidos nucleicos son los que utilizan fenol¹⁰. El principio básico de la extracción fenólica es la **desproteínización** del homogeneizado celular (solución acuosa que contiene los ácidos nucleicos) y la eliminación de los componentes no hidrosolubles mediante una separación de fases con distinta solubilidad.

En primer lugar, se efectúa la homogeneización del tejido mediante el procedimiento más conveniente (con triturador de aspas, de émbolo o, si el volumen de tejido es pequeño, mediante ultrasonidos). Se añade un volumen de fenol y, tras una intensa agitación, se centrifuga la mezcla, dando como resultado la separación de dos fases (fig. 2B): a) una **fase inferior orgánica** (fenólica) que contiene lípidos, proteínas y fragmentos subcelulares varios, y b) una **fase superior acuosa** (menos densa) que contiene polisacáridos, ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles, quedando la mayor parte de las proteínas en la interfase debido a su contenido en aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. En esta separación, el fenol suele usarse en combinación con **cloroformo** para aumentar la eficiencia de la extracción: la alta densidad del cloroformo y su capacidad para disolver lípidos y proteínas proporciona fases acuosas menos contaminadas. También es importante **acidificar** ligeramente el buffer de homogeneizado: a un pH 5-6, el DNA es selectivamente retenido en la fase orgánica y la interfase, dejando el RNA en la fase acuosa. Transferida la fase acuosa a un tubo

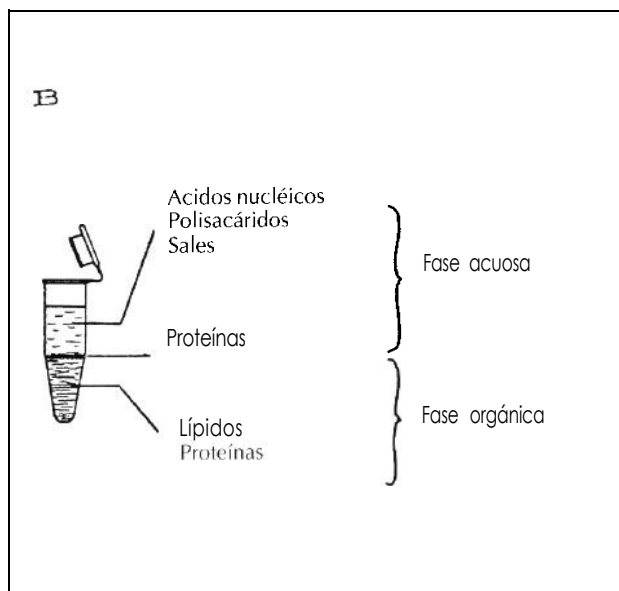


Fig. 2B.

nuevo, las etapas siguientes están destinadas a purificar cada vez más el RNA mediante precipitaciones a baja temperatura con alcoholes (como etanol e isopropanol) y *centrifugaciones* secuenciales, produciendo un «pellet» cada vez más libre de contaminantes (polisacáridos, sales, etc).

Varios son los métodos de extracción fenólica de RNA desarrollados desde los años 60, pero en la actualidad el método de *fenol caliente* de Feramisco¹¹ y el de *fenol-cloroformo* de Chomczynski¹⁴ (tabla II) son quizás los más extendidos. Ambos métodos tienen rendimiento y pureza de RNA similares (aunque menores que en el método con ultracentrifuga). Con ambos pueden manipularse muchas muestras simultáneamente; sin embargo, el método de Chomczynski tiene la ventaja de ser más rápido que el de fenol caliente y, al tener menos etapas de manipulación, la posibilidad de degradación es menor, por lo que suele considerarse como el método de elección.

Tabla II. Protocolo resumido del método de extracción de RNA con fenolcloroformo (modificado de 14).

1. Homogeneizar el tejido en solución D (GTC, citrato, sarcosil y 2-ME).
2. Añadir acetato sódico, fenol y cloroformo. Agitar.
3. Centrifugar y recoger la fase acuosa.
4. «Pelletear» con isopropanol 2 veces.
5. Lavar con etanol.
6. Resuspender el RNA en agua tratada con DEPC.

Además, ha probado ser particularmente útil para aislar RNA de muestras tan pequeñas como suspensiones de 10^6 células o 3 mg de tejido.

Una vez extraído el RNA del tejido, células aisladas o en cultivo, pasamos a describir los distintos métodos de detección de los mRNAs específicos.

NORTHERN BLOT

El «northern blot» es el método más usado para el estudio de la expresión génica. Para realizar un northern blot, una vez extraído el RNA, debe ser fraccionado en función de sus tamaños en gel desnaturante de agarosa, transferido a un filtro de nitrocelulosa y sondado.

El gel de agarosa/formaldehído

El gel de agarosa/formaldehído es un sistema sencillo de electroforesis desnaturante que permite, con buena resolución, la separación por tamaños del RNA de cadena simple. Para proteger las muestras de las RNAsas debemos mantener el material para su realización en agua con DEPC al 1 % durante unas horas; esto incluye el aparato de electroforesis horizontal, peines y material auxiliar. Dada la toxicidad del DEPC y del formaldehído, es conveniente realizar el proceso en campana de seguridad de gases.

Se cargan entre 5 y 20 microgramos de RNA por pocillo, a los que previamente se les ha añadido el tampón de carga con formamida, formaldehído, bromuro de etidio, colorante para seguir la electroforesis y glicerol o sacarosa que aumente la viscosidad de la muestra y evite su difusión en el tampón de electroforesis. Antes de cargar la muestra debe ser calentada (hervida un minuto, por ejemplo) para separar las distintas hebras de RNA que aleatoriamente pudieran haber hibridado parcialmente entre sí. El gel se «corre» a bajo voltaje (unos 40-50 voltios) durante las horas que sea necesario y que, obviamente, dependen del tamaño del gel. Un procedimiento alternativo usa concentraciones más bajas de formaldehído y la electroforesis se lleva a cabo en menos de dos horas.

Transferencia del RNA al filtro de nitrocelulosa

Una vez obtenido el gel, se enjuaga con solución salina SSC 10X, para eliminar el formaldehído, y a continuación se coloca el sistema de transferencia como aparece en la *figura 3*, empapando previamente papel Whatman 3MM en la solución anteriormen-

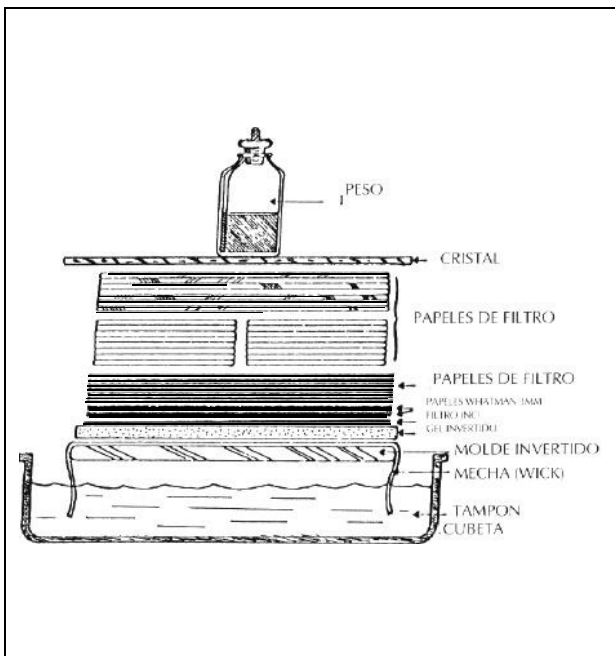


Fig. 3.-Montaje para la transferencia de RNA (Northern blot) mediante capilaridad.

te dicha utilizado y humedeciendo con agua la nitrocelulosa. El dispositivo de la figura 3 debe dejarse montado durante 12 horas a temperatura ambiente. La transferencia se lleva a cabo por capilaridad. Transcurrido este período, desmontamos el sistema, lavamos el filtro y, para fijar el RNA a éste, lo colocamos entre varias hojas de papel Whatman 3MM, lo envolvemos en papel de aluminio y lo secamos en horno a 80° C durante 2 horas.

Cuando miramos la nitrocelulosa con luz UV veremos en las carreras de RNA dos manchas más grandes; son los rRNA de 18 y 28s, que debemos marcar en el filtro para tener como referencias del tamaño de los mensajes. El rRNA 18s tiene 2,0 kb y el rRNA 28s 5,1 kb. Una vez que hemos tratado el filtro con alguna solución de prehibridación o hibridación, estas manchas desaparecen; por ello es importante marcar estas referencias en este momento.

Hibridación con la sonda, lavados del blot y autorradiografía

Una vez tratado el filtro con la solución de prehibridación, se incubaba con la sonda marcada radiativamente por cualquiera de los métodos conocidos^{11,15} no habiendo diferencias esenciales entre los procedimientos de hibridación de northern y southern.

Los lavados del filtro después de la hibridación se realizan en SSCPE y 0,1 % SDS, variando la tempera-

tura y fuerza iónica (SSCPE) según el grado de homología de la sonda con el RNA de la muestra. Como referencia, cuando el DNA de la sonda es de la misma especie (sonda humana, RNA humano), podemos lavar 2 horas a 65° C, 0,1X SSCPE, 0,1 % SDS, y cuando son de especies diferentes (rata y humana, por ejemplo) 55° C y entre 0,2 y 0,5X SSCPE pueden considerarse como variaciones correctas.

Una vez lavado el filtro, se deja secar entre papel Whatman y se coloca para la autorradiografía. La exposición varía de horas a días, dependiendo de la calidad de la sonda y cantidad del mensaje buscado.

Interpretación de un northern blot

Con el northern blot podemos saber si un gen se expresa o no, cuántos mensajes tiene (especies de mRNA), qué tamaño tiene cada especie y con qué intensidad se expresa (abundancia de mRNA). Estas respuestas se obtienen para cada tejido del que hemos colocado RNA, que puede ser a su vez muestra de diversas etapas del desarrollo (fig. 4). En el caso de la (Na,K)-ATPasa, la diversidad en la expresión de las isoformas en los distintos tejidos y distintas etapas del desarrollo nos sugiere que la subunidad alfa de esta proteína pudiera tener diversas formas de actuación y estar sometida a distintos sistemas de regulación según las necesidades durante el desarrollo o de acuerdo con la fisiología particular de un determinado órgano.

ENSAYO DE PROTECCION DE RNASA (RPA)

Entre los métodos de análisis de RNA existen dos técnicas basadas en reacciones de hibridación en solución: el ensayo de la nucleasa S1 y el ensayo de protección de RNasa (RPA). Dado que los fundamentos de ambos procedimientos tienen muchos puntos en común, describiremos la técnica más usada, el RPA, y finalmente se hará un comentario breve acerca del ensayo con nucleasa S1

El RPA se basa en dos principios (fig. 5): 1) la obtención de sondas de RNA complementario (cRNA, anti-sense), mediante reacciones de transcripción in vitro; 2) las ribonucleasas A y T1 digieren RNA monocadena, pero no duplexes de RNA. Por tanto, si una sonda de cRNA es hibridada en solución con el mRNA a analizar y posteriormente se digiere la mezcla con RNasas A y/o T1, las moléculas de la sonda que hayan formado híbridos quedarán «protegidas» de la digestión con RNasas. Si la hibridación se llevó a cabo en exceso molar de sonda, el número de moléculas de cRNA protegidas será un fiel reflejo del número de moléculas de mRNA, por lo que el RPA es un test cuantitativo de análisis de RNA.

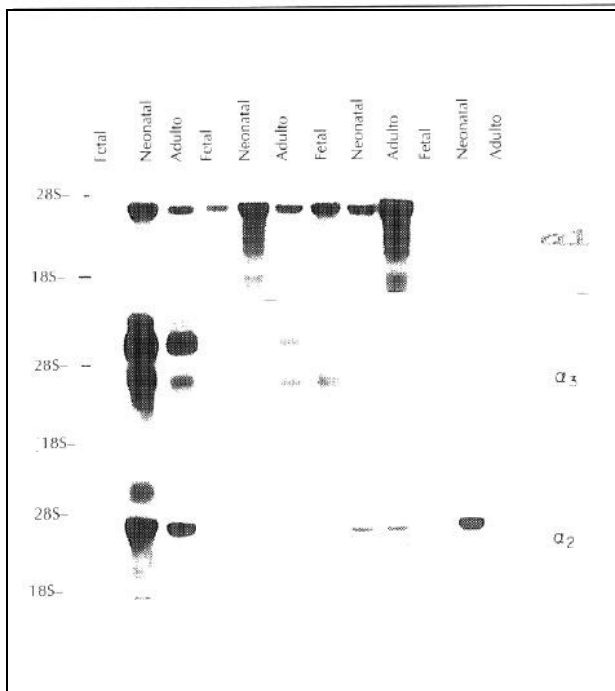


Fig. 4. -Northern blot de las isoformas α -1, α -2 y α -3 de esta subunidad de la (Na,K)-ATPasa de rata en cerebro, corazón, riñón e hígado en tres etapas de desarrollo: fetal, neonatal y adulta. En la parte superior de la figura observamos la lectura de los tejidos y etapas del desarrollo; en el margen izquierdo, los marcadores 28S y 18S, que nos servirán de referencia para el tamaño, y en el margen derecho, la isoforma α que corresponden los datos obtenidos (α -1, α -2 y α -3). La isoforma α -1 presenta una única especie de mensaje, de 4,5 kb, la α -2 tiene dos mensajes, uno de 4,3 kb y otro de 6 kb y la α -3 uno de 4,5 kb. El cerebro del feto parece que sólo expresa la α -1, el neonato y el adulto expresan las tres isoformas, aunque con mayor intensidad, la predominante, es la α -2. En el corazón fetal se expresa la α -1 y, ligeramente, la α -2; el del neonato, sólo la α -1, y el adulto, α -1 y α -3. El riñón del feto expresa las isoformas 1 y 2 de la subunidad α -de la (Na,K)-ATPasa, el del recién nacido la 1 y la 3 y el del adulto, las tres isoformas, aunque la forma predominantemente renal es la α -1. Los niveles de expresión hepáticos son muy bajos; sólo el hígado del neonato expresa las tres isoformas; el del adulto sólo la α -3.

Un elemento clave en la realización del RPA consiste en generar sondas de cRNA marcadas a alta actividad específica. Para ello, el cDNA de interés ha de ser clonado en un vector de expresión (pGEM, pBluescript, pET, etc.) en orientación anti-sense con respecto al promotor de la RNA polimerasa. Este plásmido es posteriormente linearizado mediante digestión con enzima de restricción cuya diana se localice a unas 100-500 bp desde el promotor (cortando bien dentro del cDNA o distal a él, en el vector). De este modo aseguramos que las moléculas de RNA generadas mediante transcripción *in vitro* usando el plásmido linearizado como molde tengan una longitud homogénea. Las condiciones para la transcrip-

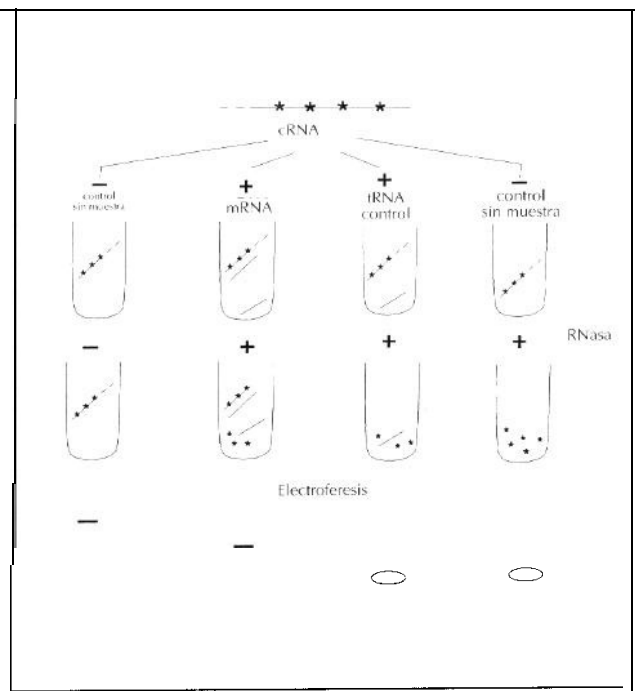


fig. 5. -Esquema de RPA. Las muestras son hibridadas en solución con la sonda de cRNA (marcada *, con cola de plásmido-), de modo que es protegida en la porción complementaria al mRNA por aquellas muestras que contengan el transcrito de interés. Tras digestión con RNasa, la electroforesis en acrilamida revela una banda de tamaño algo inferior al cRNA sin tratar con RNasa sólo si existe mRNA específico en la muestra. Las calles reflejan, de izquierda a derecha: 1) control con cRNA pero sin RNasa; 2) muestra con mRNA complementario a la sonda; 3) control con tRNA en lugar de mRNA; 4) control sin muestra.

ción *in vitro* fueron optimizadas por el grupo de Maniatis¹⁶ haciendo uso de RNA polimerasa de bacteriófago previamente purificada por otros¹⁷. En la actualidad disponemos comercialmente de RNA polimerasas de distintos bacteriófagos (SP6, T7 y T3) que presentan una alta especificidad por sus respectivas secuencias promotoras. Este hecho facilita el que a partir de un mismo plásmido, en el que el cDNA esté clonado entre los promotores de SP6 y T7 (figura 6), por ejemplo, sea posible generar *in vitro* tanto cRNA (sonda complementaria al mRNA) como mRNA en sí, dependiendo de que utilicemos la RNA polimerasa, cuyo promotor está «anti-sense» o «sense», respectivamente, en relación al cDNA.

Una vez preparada la sonda de cRNA, de longitud homogénea, se procede a hibridarla en fase líquida, con soluciones del RNA tisular sometido a estudio (tabla III). Como control negativo se suele utilizar tRNA de levadura. El fundamento de la técnica RPA reside en que las RNasas A y T1 digieren solamente RNA monocadena, mientras que en los híbridos

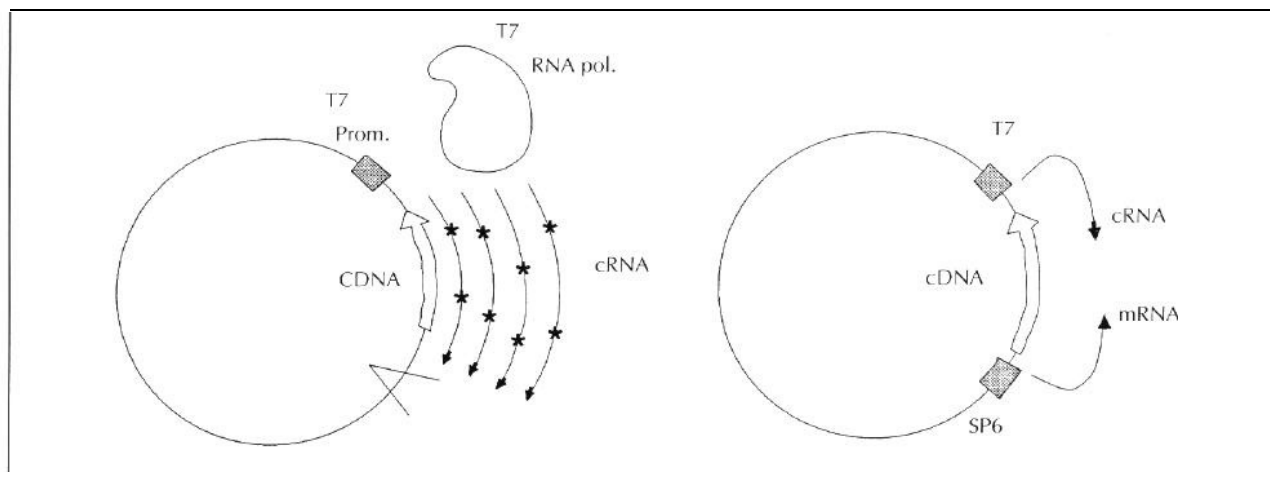


Fig. 6.-Esquema de la síntesis de cRNA mediante transcripción in vitro (izquierda). Dependiendo del promotor usado en la transcripción, se puede sintetizar bien cRNA (anti-sense) o mRNA (sense); en el ejemplo ilustrado a la derecha, el promotor T7 genera RNA anti-sense, mientras que el SP6 genera RNA sense

mRNA-cRNA la sonda de cRNA queda protegida de la digestión enzimática. Generalmente, las sondas de

cRNA producidas in vitro incluyen una pequeña cola de secuencia que no es propia del inserto (cDNA de interés) sino del vector de expresión (distancia entre el inicio de transcripción y la diana de restricción donde el cDNA fue clonado). Este hecho añade un ventajoso control interno al ensayo: si la digestión con RNasas procedió normalmente, la sonda de cRNA debe disminuir ligeramente de tamaño, ya que sólo las secuencias complementarias a mRNA son protegidas. En el control hibridado con tRNA de levadura, la sonda es degradada por las RNasas completamente.

Uno de los problemas más frecuentes con el RPA es que la digestión con RNasas sea parcial, lo que resulta en un alto fondo inespecífico, con señal incluso en el control con tRNA. La causa más frecuente de este problema no es que la RNasa esté fracasando (aunque sería una posibilidad a investigar) debido a que se trata de un enzima muy estable. Es más frecuente que altos fondos inespecíficos se deban a que, durante la preparación de la sonda de cRNA, la digestión del plásmido después de la transcripción in vitro, sea incompleta. Como consecuencia, este cDNA co-purifica con la sonda y la protege de la digestión con RNasas sin necesidad de que exista mRNA específico en el medio. Este problema se suele solucionar con el uso de DNasa 1 en buen estado, prolongando la incubación durante varias horas. Otras veces es preciso purificar la sonda de cRNA mediante electroforesis en gel de acrilamida para liberarnos del cDNA.

Otro problema encontrado con relativa frecuencia en el RPA es que la sonda de cRNA tenga un tamaño

Tabla III. Protocolo de RPA (modificado de 9).

1. Preparar sonda de cRNA marcada con ^{32}P mediante transcripción in vitro, ver «análisis del DNA I»).
2. Digerir el cDNA, usado como molde en la transcripción in vitro, con DNasa libre de RNasa.
3. Extracción fenólica y precipitación con etanol en presencia de acetato amónico. Resuspender pellet en pequeño volumen de H_2O (50 μl , tratado con DEPC) y repetir la precipitación. Resuspender en 50 μl y contar 1 μl en contador de centelleo.
4. Precipitar 10 μg RNA motivo de estudio. En un tubo control, precipitar una cantidad similar de tRNA.
5. Resuspender pellets de RNA en 30 μl solución de hibridación (80 % Formamida, 40 mM PIPES pH 6,4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA) que contenga un total de 0,5 10 cpm de sonda.
6. Desnaturalizar a 85 °C durante 5 minutos.
7. Hibridar a 45 °C durante toda la noche. La temperatura de hibridación óptima puede variar según temperatura de la sonda.
8. Añadir 350 μl de mezcla con RNasa (10 mM Tris HCl, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNasa A, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNasa T₁-opcional-) e incubara 70 °C durante 30-60 minutos.
9. Añadir 20 μl de 10 % SDS y 5 μl de 10 mg/ml proteinasa K. Incubara 37 °C durante 15 minutos.
10. Extracción fenólica y precipitación con etanol en presencia de 10 μg de tRNA (carrier).
11. Resuspender pellets en solución de carga de RNA (con 80 % formamida) y someter a electroforesis en gel de acrilamida-urea.
12. Autorradiografía y cuantificación (densitometría o conteo de bandas).

* Alternativamente a la electroforesis se puede resuspender el pellet (punto 11) en H_2O y colocar alícuotas en filtros GF/c, que se someten a conteo previo lavado con soluciones de tricloroacético, para eliminar los nucleótidos no incorporados y productos de digestión de la sonda.

variable, lo que da lugar a que se observen múltiples bandas protegidas en la autorradiografía. La causa de estas sondas incompletas puede deberse a contaminación con RNasas o a paradas de la RNA polimerasa antes de llegar al final. Hay que tener presente que en esta técnica trabajamos con RNA o RNasas en distintas fases de la misma y es fundamental que no contaminemos con RNasas las muestras, las sondas, la solución de hibridación, etc. Los parones de la RNA polimerasa durante la transcripción *in vitro* se asocian a determinadas secuencias en el cDNA y se ven favorecidos por la baja concentración de nucleótido-trifosfato marcado. La mejor manera de evitarlos es diseñando sondas cortas, de menos de 500 bp (cDNAs de 100-300 bp dan transcritos de tamaño muy homogéneo).

El análisis con *nucleasa S1* comparte el esquema fundamental con el RPA, pero en este caso la sonda utilizada es de DNA monocadena, y el enzima que se utiliza para digerir la sonda que no haya sido protegida por mRNA es la nucleasa S1, una endonucleasa que corta DNA monocadena (no-apareado). El análisis con nucleasa S1 goza de múltiples aplicaciones en el estudio de la organización exón-intrón de genes y en la definición de regiones promotoras y del punto de inicio de transcripción. También se puede utilizar para cuantificar un mRNA de interés, pero en este sentido el RPA es preferible porque la sonda es más fácil de preparar y se consiguen marcados más homogéneos y de mayor actividad específica. Además, la digestión de sonda no protegida con RNasas en el RPA es más eficaz y segura que la digestión con nucleasa S1, que es más sensible a cambios de temperatura, concentraciones enzimáticas y dependiente de pH bajo.

METODO RT-PCR

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un método para amplificar de un modo eficiente y rápido fragmentos de DNA mediante *Taq DNA polimerasa*. Puesto que la PCR produce una amplificación, para detectar un mRNA celular bastaría con someterlo a este proceso y, por poco abundante que fuera, podría al final visualizarse con un método de tinción adecuado. Sin embargo, la *Taq* polimerasa sólo es capaz de sintetizar DNA a partir de un molde de DNA, y es necesario entonces generar primero una cadena de DNA complementario (cDNA) a partir del mRNA mediante una DNA polimerasa dependiente de RNA, enzima conocida como *transcriptasa inversa* o RT (Reverse Transcriptase).

En conjunto (fig. 7), el método RT-PCR (llamado así por el paso de transcripción inversa previo a la

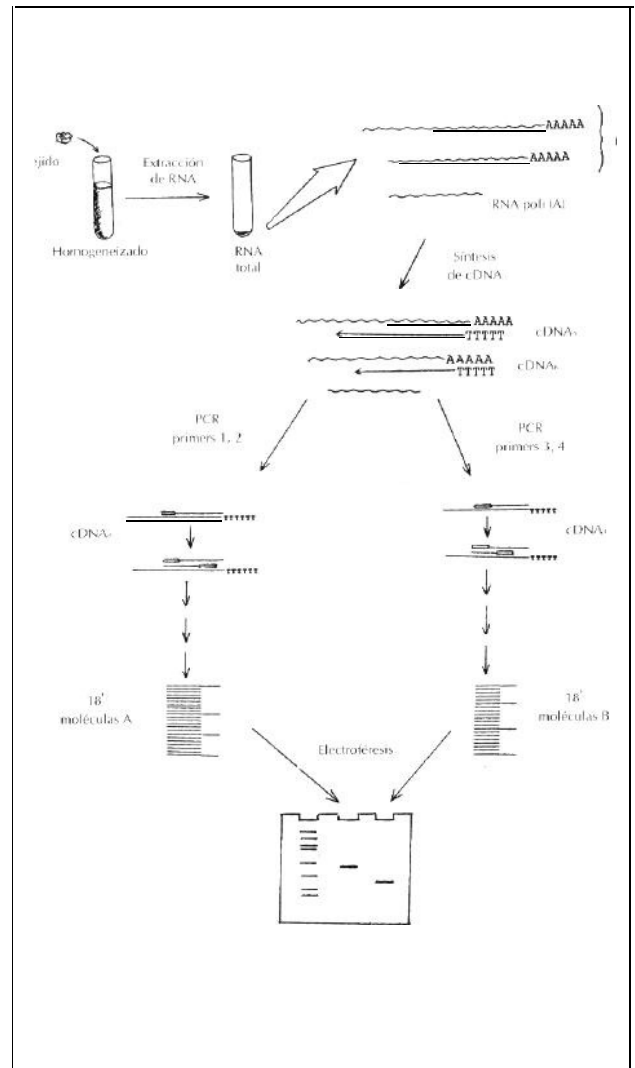


Fig. 7.-Etapas implicadas en la detección de mRNA por RT-PCR. Nótese que en la etapa de PCR sólo se amplifica un cDNA específico mediante una adecuada pareja de primers

PCR), o RNA-PCR, consiste primero en una extracción de RNA a partir del tejido en el que se quiere estudiar la expresión de un mensajero. Teniendo en cuenta que existirá al final una etapa de *amplificación específica*, no es necesario que el RNA tenga un alto grado de pureza ni que la cantidad de RNA sea grande, de modo que los métodos de *extracción fenólica* son bastante adecuados y permiten estudiar gran cantidad de muestras simultáneamente. El siguiente paso es la síntesis de *una cadena de cDNA* a partir del mRNA mediante una RT. Para ello se aprovecha la presencia de la *cola poli(A)* de los mensajeros y se utiliza como cebador un oligonucleótido sin-

tético de polideoxitimidina (*oligo[dT]*) que se une a las colas de poli(A). Puesto que esta cola es una característica casi universal en los distintos tipos de mRNAs, tendremos entonces una muestra de moléculas de cDNA representativa de los tipos de mensajeros expresados en ese tejido. Seguidamente se toma de esa solución una alícuota y se somete a una reacción de PCR utilizando una pareja de cebadores o «primers» específica del mRNA de interés, y si la elección de los primers y de las temperaturas del proceso han sido adecuadas, tendremos en torno a 10^6 moléculas de DNA idénticas correspondientes a un fragmento del mRNA específico que queremos detectar. La detección de este producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel.

Hay que destacar el hecho de que tras la transcripción inversa disponemos de una mezcla de cDNAs representativos de las distintas especies de mRNA'S celulares y que podemos tomar de ahí alícuotas para estudiar por PCR diferentes transcritos simultáneamente (siempre que elijamos para cada mensajero una pareja específica de primers).

Síntesis de cDNA

Tras la extracción de RNA es necesario fabricar cDNA que pueda servir de sustrato para la PCR. Esto se consigue mediante una enzima extraída originariamente de ciertos retrovirus, la *transcriptasa inversa* (RT), que utiliza como molde una molécula de RNA a la que se ha unido un pequeño fragmento de DNA que actúa como cebador (en nuestro caso, oligo-dT de unos 15 nucleótidos de longitud). La enzima copiará sólo los mRNA (que son los únicos que poseen extremo poli[A]) y lo hará en sentido 3'-5' del mRNA. Dependiendo de lo óptimas que sean las condiciones de la reacción, el cDNA será de longitud más o menos completa (según acabe más o menos cerca del extremo 5' del mRNA) (fig. 8A). Sin embargo, para el método RT-PCR la calidad de la síntesis de cDNA no necesita ser tan alta como la requerida para la construcción de genotecas de cDNA. Aunque haya muy poca abundancia de cadenas de cDNA de longitud completa («full length cDNA»), éste es un hecho irrelevante, ya que bastará con que la síntesis progrese hasta la región a la que luego se unirán los dos primers durante la PCR, y las cadenas de cDNA que no lleguen a esa zona se perderán durante la amplificación. Tampoco es necesario generar mediante la RT una segunda cadena de cDNA complementaria a la primera, como ocurre para la construcción de genotecas de cDNA, ya que esa cadena será generada por la Taq polimerasa durante el primer ciclo de la PCR.

Existen dos tipos de transcriptasas inversas comercialmente: a) la de MMLV (Moloney Muri-

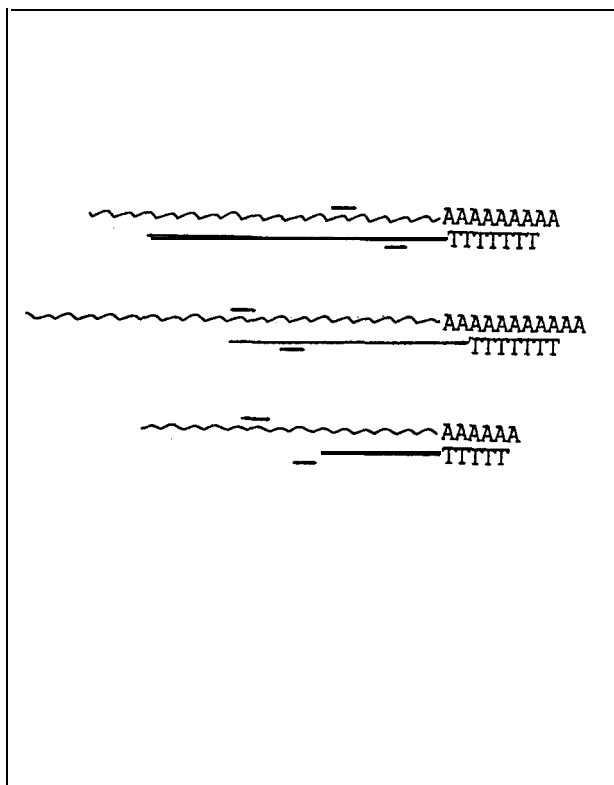


Fig. 8.-A) Para poder detectar un mensajero por PCR basta con que la síntesis de su cDNA progrese hasta el lugar de unión a los primers; el resto se perderán. B) Formas de cebado de la reacción de síntesis de cDNA.

ne Leukemia Virus), y b) la de AMV (Avian Myeloblastosis Virus). Ambas funcionan *in vitro* bajo condiciones similares y tienen aproximadamente la misma eficiencia, de modo que la elección de la enzima no parece ser crucial para el éxito del método RT-PCR¹⁹. Aunque la calidad de estas enzimas es generalmente buena, la cantidad de RNasa contaminante varía con el proveedor y es necesario incluir en la reacción potentes inhibidores de RNasas como vanadyl-ribonucleósidos o RNasin, que por su alta especificidad por las RNasas no afectan a la RT (10, p. 24). Para más detalles sobre los requerimientos de la reacción se pueden consultar otros textos^{10,11}. En la tabla IV se muestra un protocolo típico de transcripción inversa para RT-PCR.

Una especial atención merece el cebador (*primer*) utilizado para la transcripción inversa. Existen al menos tres formas de cebado de la reacción (fig. 8B): con «random primers» (hexanucleótidos con secuencias al azar), con oligo (dT) o con un oligonucleótido específico. El uso de un cebador específico de un mRNA se evita casi siempre, ya que el cDNA resultante no puede ser usado como molde para estudiar

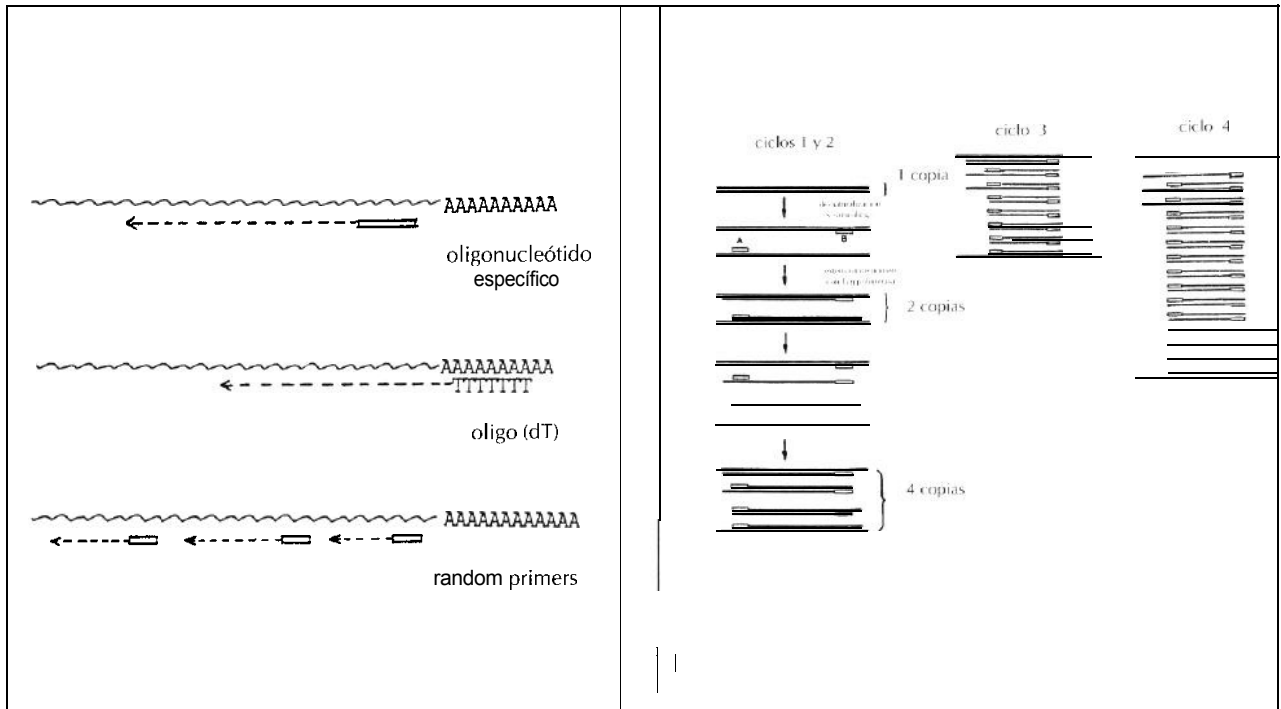


Fig. 8B

Fig. 9.-A) Mecanismo básico de amplificación de cDNA por PCR. 6) Perfil típico de temperaturas en cada ciclo del proceso.

por PCR otros mRNAs del tejido. La utilización de oligo (dT) tiene la teórica desventaja de producir cDNAs menos completos en la región 5' del mRNA, ya que usualmente la transcripción no progresa hasta el final, pero su gran ventaja es que sólo produce cDNA a partir de mRNAs poli (A)+ (que son los de interés), con lo cual se evitan amplificaciones inespecíficas durante la PCR. El uso de random primers permite síntesis representativas tanto de regiones 5' como 3', pero generalmente es preciso purificar mRNA a partir de RNA total mediante cromatografía de afinidad (oligo dT). De lo contrario, la transcripción inversa de RNA total con *random primers* rinde poco cDNA, ya que el mRNA es una fracción pequeña del RNA total.

Amplificación del cDNA por PCR

La PCR ha hecho posible la amplificación *in vitro* de segmentos específicos de DNA mediante la acción de una DNA polimerasa termorresistente que copia repetidamente un fragmento diana flanqueado por dos oligonucleótidos que actúan como *cebadores* o «*primers*». Así podemos *amplificar* un cDNA (específico del mRNA en estudio) para obtener una señal apreciable incluso cuando partimos de cantidades de RNA insuficientes para el análisis tipo

Northern. El proceso consiste en una serie repetitiva de ciclos que incluyen tres etapas (fig. 9A):

1. Desnaturalización de la doble hebra de DNA molde.

2. Unión o «*annealing*» de los primers a regiones específicas del molde.

3. Síntesis de DNA o *extensión* a continuación de esos primers por la acción de la Taq DNA polimerasa.

Dado que las hebras sintetizadas en un ciclo sirven de molde en el siguiente, el número de copias del DNA diana se duplica aproximadamente en cada ciclo, y todo ello sólo con someter a los componentes (DNA molde, primers, Taq polimerasa, dNTPs y buffer) a un continuo cambio de temperatura en el tubo donde la reacción se lleva a cabo (fig. 9B)¹³

Detección y cuantificación de la señal

Para detectar el fragmento de cDNA amplificado por PCR se somete el producto de esta reacción a una electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, para separar los posibles fragmentos de DNA de distinto tamaño. A continuación se tiñe el gel en una solución con bromuro de etidio y mediante una lámpara de luz UV se visualizan las bandas de DNA. Si hemos elegido las condiciones adecuadas (número

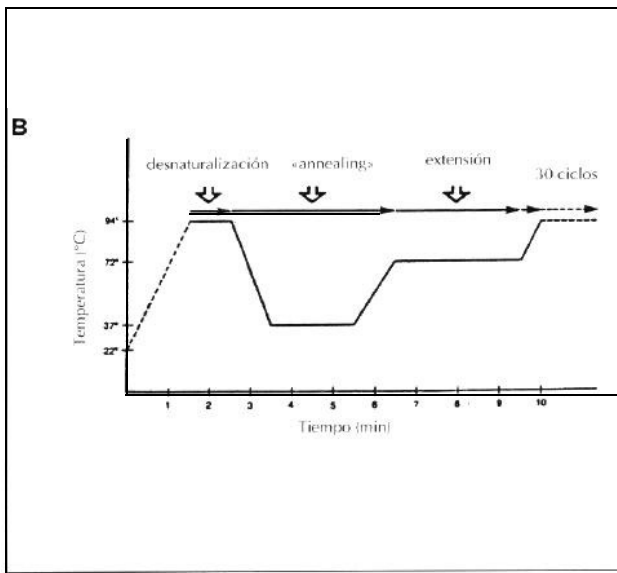


Fig. 9B.

de ciclos, temperaturas del proceso, etc.) y si no hay «splicing» alternativo, aparecerá una única banda correspondiente al cDNA amplificado, procedente del mRNA en estudio. En cambio, si no aparece tal banda, la conclusión es que en ese tejido no se expresa ese mensajero, o al menos no con la intensidad que nuestras condiciones experimentales son capaces de detectar.

Para comprobar la especificidad del producto amplificado se utilizan varios métodos:

1. Puesto que conocemos el tamaño esperado del producto amplificado, podemos comparar su migración en la electroforesis con DNA estándar de tamaño molecular.

2. Si disponemos de un oligonucleótido sintético complementario de la porción central del fragmento amplificado, podemos usarlo como sonda ^{24,25}.

3. Si existe en el fragmento esperado una diana de restricción, su digestión con el enzima correspondiente dará lugar a dos fragmentos de tamaños conocidos.

4. Podemos también secuenciar directamente el fragmento amplificado y comprobar que su secuencia es la esperada.

La posibilidad de detectar con gran sensibilidad un mRNA mediante la estrategia RT-PCR representa la mayor aportación de esta técnica al estudio de la expresión génica. No existe casi límite para su poder de detección: Rappolee, Wang y cols. ²⁰ han demostrado que es posible detectar un mRNA específico en cantidades muy limitadas de muestra (< 0,1 ng de RNA total), incluso aunque se trate de mensajeros con bajos niveles de transcripción.

Es obvio que el estudio de la expresión génica abarca más aspectos que la simple detección de un mensajero. De enorme interés en biología celular y fisiología es la posibilidad de cuantificar un mRNA. Esto es posible hacerlo de un modo relativamente preciso mediante RT-PCR. Existen fundamentalmente dos métodos para medir la cantidad de un producto de PCR que ha sido separado por electroforesis en gel:

1. Al observar mediante luz UV un gel teñido con bromuro de etidio (BrEt), la intensidad de la fluorescencia emitida por cada banda es proporcional a su contenido en DNA. Esta intensidad se puede medir con un sistema densitométrico de análisis de imagen.

2. Un método alternativo consiste en añadir a la mezcla de PCR una cierta proporción de uno de los nucleótidos marcado radiactivamente (p. ej., [³²P]-dCTP). Cuando se revele el gel con BrEt y se observe la banda de interés, se corta la porción del gel que contiene esta banda y se mide su radiactividad en un contador β de centelleo líquido, siendo proporcional la señal a la cantidad de producto amplificado.

En general es preferible utilizar el segundo método, ya que da estimaciones más exactas, aunque el primero es quizá el más extendido. En ambos casos, los datos son susceptibles de un tratamiento estadístico.

Pero ¿cuál es la utilidad de la cuantificación del producto de RT-PCR? La ecuación ideal que describe la generación de fragmentos en una reacción de PCR es exponencial, similar a la ecuación que describe el crecimiento bacteriano ²¹:

$$N = N_0 (1 + ef)^2$$

donde: N_0 es la cantidad inicial de cDNA molde, n es el número de ciclos y ef es la eficiencia de la reacción, que depende del grado de homología de los primers con el molde, de la $[Mg^{2+}]$, de la cantidad de enzima, del tamaño del molde, etc. ¹⁸ (0-1 de ef es equivalente a 0-100 % de eficiencia).

Sin embargo, en la realidad sólo se observa un crecimiento exponencial durante los primeros 10-25 ciclos de la PCR. Por encima de 30 ciclos se observa a menudo sólo un 10 % de eficiencia, y por encima de 60 ciclos el número de copias deja de crecer ²⁰. Esto depende mucho de la cantidad de molde inicial, pero siempre se aprecia un *plateau* tras un cierto número de ciclos. Por otro lado, dado que la PCR implica una amplificación exponencial, pequeños cambios en la eficiencia durante los primeros ciclos pueden causar grandes cambios durante la amplificación ¹⁸. Estos hechos explican que los datos empíricos no se ajusten fielmente a la ecuación teórica, por lo que resulta imposible deducir la cantidad inicial de cDNA, N_0 (o del mRNA de partida) midiendo la concentración del producto amplificado, N . A esto se une la

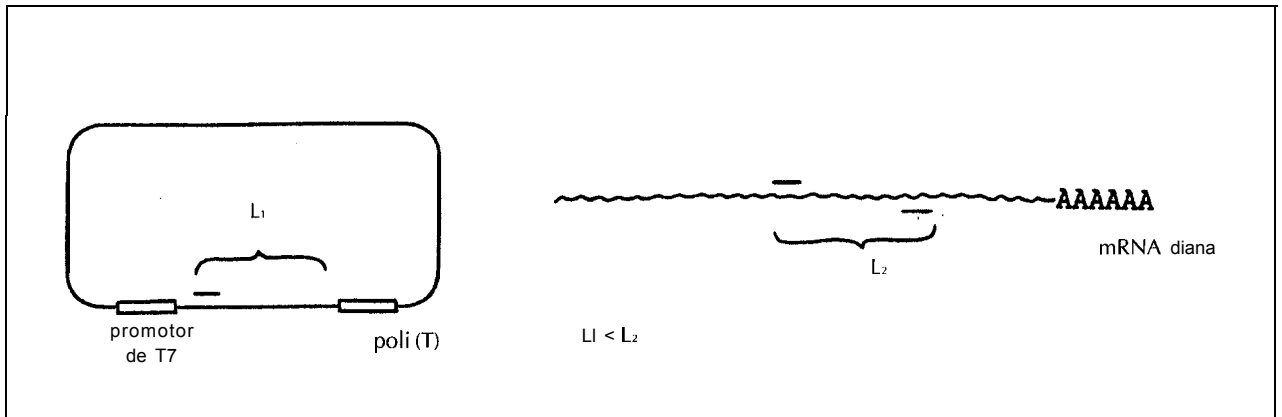


Fig. 10.-A) Estándar y molécula diana que se pretenden amplificar. B) Coamplificación de ambas moléculas. C) Concentraciones variables del molde cRNA (estándar interno) y RNA celular se representan frente a la radiactividad de sus productos de PCR y la extrapolación determina la cantidad de mRNA específico del estudio: por ejemplo, en este caso se observa que 1 ng de RNA de macrófagos contiene 1×10^4 moléculas de mRNA de IL 1 (tomado de 21).

falta de reproducibilidad de la síntesis de cDNA. Sin embargo, sí se puede estimar la cantidad inicial de un mRNA con gran exactitud utilizando un estándar interno, como veremos a continuación.

RT-PCR cuantitativa

Es obvia la importancia que tiene en biología celular básica conocer el número de copias de un mRNA que existe en una célula o el porcentaje que representa un determinado mRNA respecto al resto de mensajeros celulares, ya que ayudaría a comprender la importancia de este mensajero y de su producto proteico en la vida celular.

Wang y cols. han desarrollado una ingeniosa estrategia para **cuantificar de un modo absoluto transcritos específicos por RT-PCR**, basada en la utilización de un **control interno de RNA sintético** de concentración conocida ²¹. El primer paso consiste en sintetizar moléculas de **cRNA poli(A)+** utilizando un vector con el promotor del bacteriófago T7 y una secuencia poliadenilada (fig. 10). Este cRNA contiene en sus extremos las secuencias para los primers que se van a usar en la amplificación del mRNA en estudio (mRNA diana), pero separadas una distancia distinta de la existente en este último (fig. 10A). Tras una síntesis de cDNA con oligo(dT) a partir del RNA extraído del tejido de interés, **conjuntamente** con cRNA de concentración conocida, se realiza una PCR donde

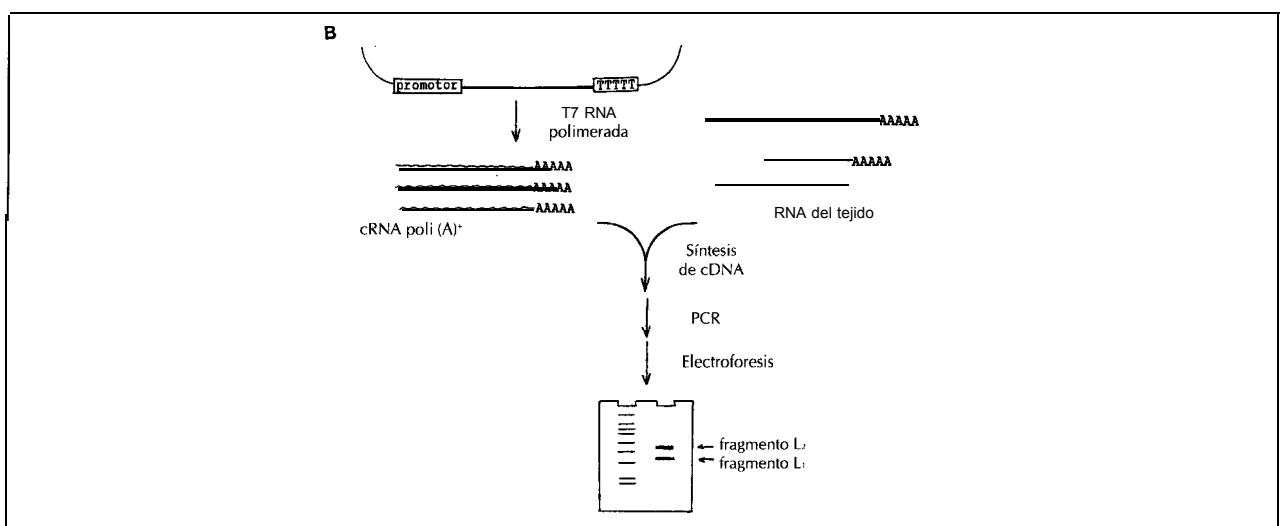


Fig. 10B.

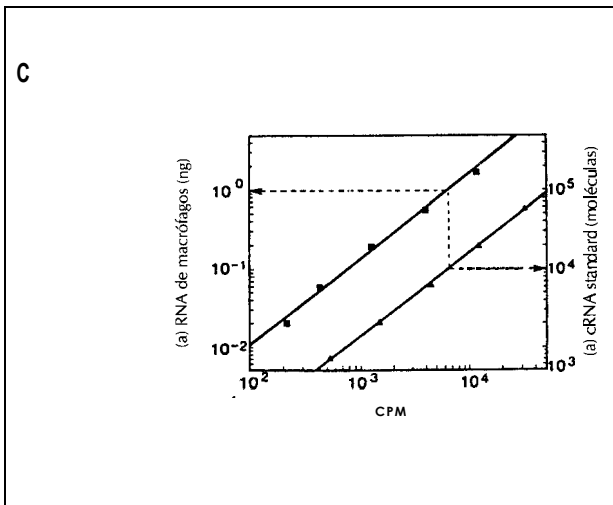


Fig. 10 C

amplifican ambas clases de cDNA (control y diana) utilizando la misma pareja de primers. Dado que los dos productos amplificados tienen tamaños diferentes, pueden ser separados por electroforesis y cuantificados independientemente (fig. 10B). Si hacemos diluciones seriadas de la mezcla de cDNAs podemos representar las concentraciones variables de molde cRNA (conocidas) y las cantidades de RNA total del tejido (determinadas por espectrofotometría a 260 nm) frente a la radiactividad de sus correspondientes productos de PCR (fig. 10 C), y la cantidad de mRNA diana puede ser determinada por extrapolación contra la curva estándar de cRNA.

Este procedimiento tiene la ventaja de **controlar internamente** errores producidos por diferencias en la preparación de la muestra, en las condiciones de la transcripción reversa o en la PCR, ya que estas variaciones afectarán por igual a los productos de PCR procedentes del mRNA diana y del cRNA estándar. El hecho de utilizar la misma pareja de primers también descarta diferencias en la eficiencia de amplificación. El único inconveniente que se puede atribuir al método es que las diferencias en secuencia y longitud de ambas moléculas pueden influir en la eficiencia de la reacción de PCR. Aunque éste es un problema menor, se ha propuesto una solución²⁴ utilizando un cRNA estándar con una secuencia idéntica a la del mensajero en estudio excepto en una mutación puntual que genera una diana de restricción que no posee el mRNA natural. De este modo, tras la conversión a cDNA y la PCR, el producto amplificado es digerido con la apropiada enzima de restricción para discriminar en el gel el producto derivado del mRNA diana del derivado de cRNA estándar y cuantificarlos independientemente (fig. 11). Ahora el

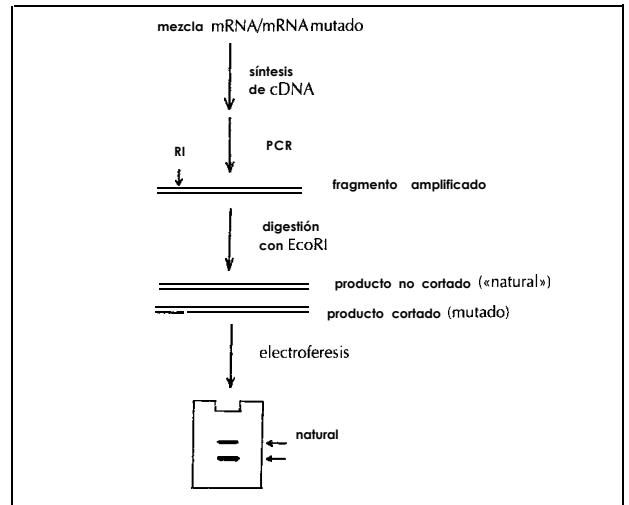


Fig. 11- Distinción entre los productos de PCR derivados del cRNA estándar y del mRNA diana mediante corte con un enzima de restricción (tomado de 24).

riesgo es que una digestión incompleta contribuye con moléculas del control a la banda del transcrito de interés.

Gracias a estas estrategias se ha puesto de manifiesto la **enorme sensibilidad** de la técnica RT-PCR, llegándose a detectar, por ejemplo, mRNA de β -actina **de un solo macrófago**. Se ha establecido la capacidad máxima de detección en una muestra que contenía tan sólo 100 copias de un cRNA; una sensibilidad 1.000 veces mayor que otras técnicas como el Northern blot o el dot blot^{20,21}.

Se puede además determinar con gran exactitud **qué porcentaje representa un mRNA específico dentro del RNA celular**, un dato muy interesante en biología celular que puede contribuir al entendimiento de una gran variedad de fenómenos genéticos. Teniendo en cuenta que es posible hacer también por PCR un análisis cuantitativo para medir el número de copias de un DNA genómico en una muestra (utilizando, p. ej., el gen HLA-DQ como diana), se podría estimar el **número de moléculas de un mensajero específico por genoma** (por célula).

Tabla IV. Procedimiento para una reacción de síntesis de cDNA a partir de 5 μ g de RNA total para RT-PCR

A la solución de RNA, **añadir secuencialmente:**
 0,5 μ l oligo y calentar a 68 °C, 15 minutos.
 2 μ l buffer de RT.
 0,75 μ l de dNTPs.
 0,25 μ l RNasin.
 0,5 μ l AMV-RT.
 Incubar 2 h a 42 °C.
 Diluir el cDNA con 30 μ l de Tris-EDTA.

Tabla V. Procedimiento general de una reacción de PCR típica para RT-PCR.

Mezclar secuencialmente:
40 µl agua destilada.
5 µl buffer para Taq polimerasa.
2 µl dNTPs.
1 µl primers específicos.
1 µl cDNA molde.
1 µl taq DNA polimerasa.
Someter a un perfil de 94 °C (1 min.), 55 °C (1 min.), 72 °C (1 min.), durante 30 ciclos.

RT-PCR semicuantitativa

Con frecuencia, el objetivo del análisis no es determinar de una forma absoluta el número de moléculas de un transcrito en una muestra, sino poder detectar diferencias cuantitativas en la expresión de un gen en distintas situaciones. Esta cuantificación relativa es el propósito de la mayoría de los experimentos de estudio de la expresión génica y también es ésta una de las principales aportaciones de la RT-PCR. Por tanto, midiendo la diferencia de densidad óptica (o de emisión radiactiva) de los productos de PCR procedentes de los dos grupos estudiados se puede determinar la diferencia en la expresión de un determinado mRNA. Sin embargo, es obvia la necesidad de eliminar la variación debida al «efecto tubo» (diferencias producidas por degradación parcial de RNA en alguna muestra, distinta eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc.). Como control interno para la normalización se puede elegir un mRNA abundante en la célula y relativamente invariable, como es el de la β -actina^{23,25,26} o la β 2-microglobulina^{27,29}. Para ello se suele hacer una *coamplificación* del cDNA diana y del estándar en el mismo tubo, utilizando dos parejas de primers simultáneamente.

Algunos autores²⁷ han observado que cuando se amplifican simultáneamente los mRNAs control y diana, los niveles de los productos de PCR son más bajos que cuando se amplifican separadamente. El resultado es una *prematura atenuación de la fase exponencial* de la PCR para el mRNA diana. Además, esta competición con el estándar interno es mayor a cantidades iniciales menores de mRNA, produciéndose así un error estadístico unidireccional que tergiversa la normalización. Este fenómeno no ha sido observado por otros autores²⁵.

De las tres etapas del procedimiento, la reacción de PCR es la más determinante para conseguir una verdadera estimación cuantitativa. Por ejemplo, cuando se elige arbitrariamente un número *elevado de ciclos*, la técnica tiende a subestimar las diferencias reales, ya que se ha permitido que la reacción alcance el *plateau* (saturación). Por esta razón es

aconsejable elegir un número de ciclos que no llegue a saturar el proceso. Usualmente, un número de 25-30 ciclos suele ser adecuado, aunque esto depende de la concentración del cDNA molde. A menudo sucede que el estándar (p. ej. β 2-microglobulina) alcanza el plateau mucho antes de que el mRNA de interés sea incluso detectable²⁷, en cuyo caso hay que utilizar para amplificar el standard una alícuota diluida de la solución de cDNA. Así pues, la determinación del rango exponencial de la reacción es un proceso previo en algunos casos muy laborioso, pero totalmente necesario: de hecho, una de las principales fuentes de fracaso de la cuantificación relativa por RT-PCR es que el análisis se realiza después de que el plateau ha sido alcanzado. Variando el factor de dilución de cDNA en combinación con la elección del número de ciclos de amplificación es posible estudiar por RT-PCR un rango muy amplio en la expresión de los distintos genes celulares²⁵.

La capacidad de resolución de un método de cuantificación relativa es una cuestión determinante. Rappolee y cols.²⁰ han encontrado que el límite máximo de poder resolutorio es de algo menos de 3 veces. Esto quiere decir que diferencias entre dos muestras menores de 2,5 veces posiblemente no puedan ser detectadas, lo cual es una limitación respecto a otros métodos.

Aunque se requieren más estudios para determinar el mejor método de normalizar los resultados, la RT-PCR semicuantitativa parece ser bastante reproducible, relativamente resolutoria y, desde luego, enormemente sensible y específica.

Criterios de selección de los primers

Uno de los aspectos más importantes del éxito de la técnica RT-PCR es la fabricación de los primers adecuados. Para ello existen criterios generales válidos para cualquier reacción de PCR y unos criterios aplicables específicamente a la técnica de PCR para estudio de RNA.

Criterios generales:

1. Para cualquier reacción de PCR se ha de cumplir que no exista complementariedad de los primers entre sí, especialmente en los extremos 3', ya que esto iría consumiéndolos durante la reacción por la formación de los llamados *dímeros de primer*.
2. El *tamaño* adecuado es de unos 19-23 nucleótidos, suficientemente grandes como para favorecer la unión con alta especificidad a la región de interés y no a otras regiones del genoma.
3. El porcentaje de (G+C) debe rondar el 50 % en ambos primers, lo cual da una temperatura media de hibridación de unos 60-65 °C para ambos.

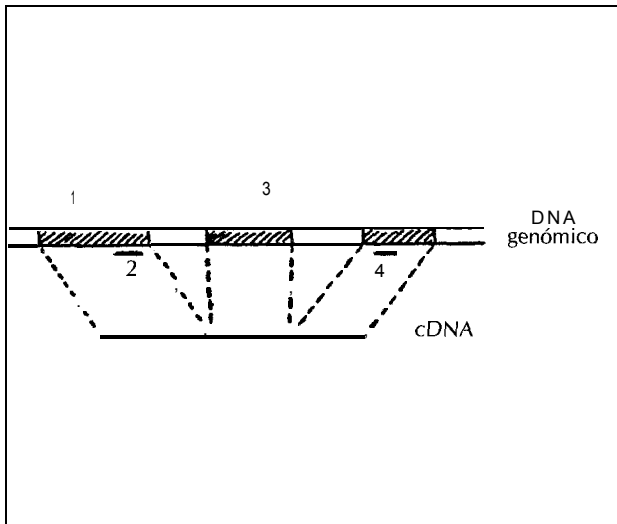


Fig. 12.-Criterios de elección de primers para RT-PCR. A) Primers 3 y 4 situados en exones diferentes. B) Primers situados a ambos lados del codón de parada. C) Los primers 1 y 2 tienen mayores probabilidades de éxito que los 3 y 4 por estar más alejados del extremo 3'. D) Los primers situados en la región trailer del mRNA (3 y 4) suelen dar mayores problemas cuando se utilizan en otras especies.

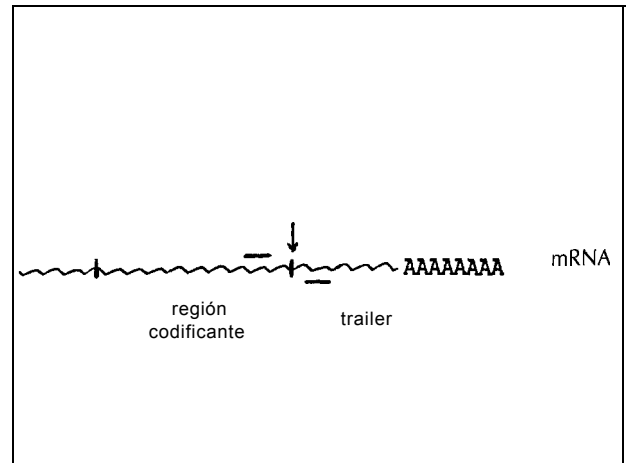


Fig. 12B.

3. Por otro lado, también es relativamente frecuente que antes o después del codón de parada de la traducción (Stop) exista un intrón en el gen ³¹. de manera que primers *situados a ambos lados del codón Stop* pueden ser también adecuados para evitar coamplificación genómica (fig. 12B).

4. Las condiciones necesarias para obtener una síntesis completa de cDNA primando con oligodT son difíciles de alcanzar, especialmente para los transcritos largos. Puesto que en la mayoría de los mRNAs la reacción no progresa hasta el extremo 5' del mismo, diseñando la pareja de primers *próxima al extremo 3'* las probabilidades de éxito en la amplificación del cDNA son mayores (fig. 12C).

5. Puede ocurrir que tengamos una información parcial de la secuencia del cDNA que sólo nos permita construir un primer. En este caso se podría pre-

4. Es recomendable además, acceder a un *banco de secuencias genómicas* para comprobar que no existe otra región en el genoma capaz de unirse con un 100 % de especificidad a alguno de los primers. Para mayor información se pueden consultar otras fuentes ^{18,19}.

Criterios específicos

1. Cualquier método de extracción de RNA lleva implícita una contaminación de DNA genómico, que porta las mismas secuencias que posee el mRNA. La coamplificación de DNA genómico se sumaría a la señal del transcrito que queremos estudiar y esto produciría una alteración de los resultados, *tanto si son cuantitativos como si no*. Esta coamplificación de DNA genómico se evita diseñando dos primers *situados en dos exones diferentes* (fig. 1 2A): la amplificación de un segmento tan grande de DNA es generalmente nula, pero aunque existiera tal producto su tamaño lo hace distinguible del cDNA tras la electroforesis.

2. Es muy frecuente que se disponga de la secuencia del mRNA que se quiere estudiar pero se desconozca la estructura del gen. En estos casos se suelen diseñar primers *separados más de 300-400 bases* en el mRNA: los exones mayores de este tamaño son poco frecuentes en vertebrados ¹, y de este modo la posibilidad de que exista un intrón por medio es bastante alta.

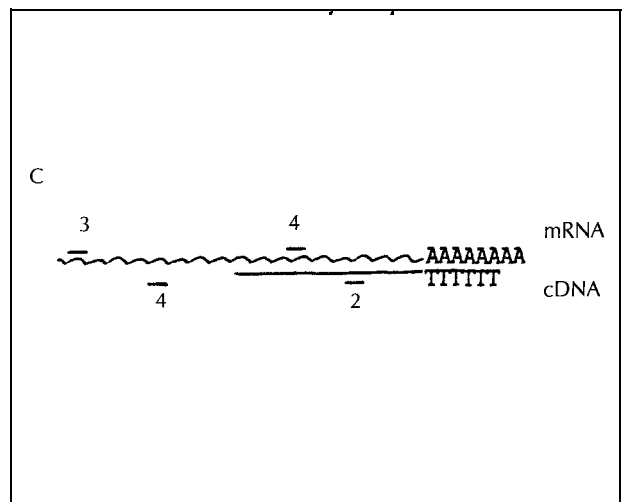


Fig. 12C.

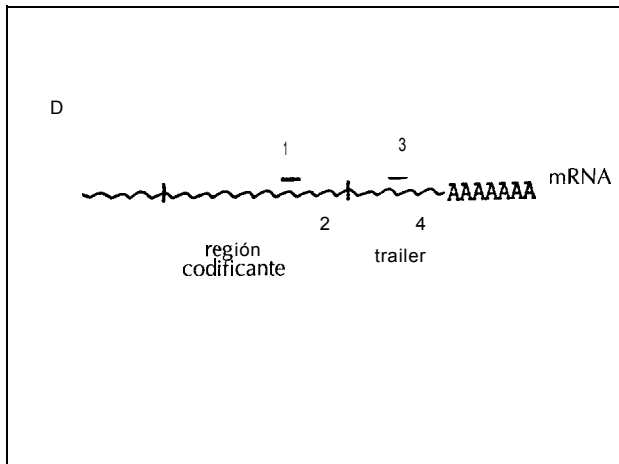


Fig. 12D.

parar la PCR con *oligo(dT)* como segundo primer ³², el cual será complementario al segmento poli(A). Sin embargo, como la cola poli(A) es una característica de casi todos los mRNAs, el riesgo de amplificaciones no específicas aumenta considerablemente.

6. En algunos casos ni siquiera disponemos de un mínimo de información acerca de la secuencia del cDNA que nos interesa. Un recurso que en ocasiones resulta exitoso es utilizar una pareja de primers específica del cDNA *de otra especie animal* con la que puede existir cierta homología génica. Se recomienda entonces no diseñar los primers a partir de la *región trailer* del mRNA, ya que ésta se encuentra sujeta a mayor variabilidad interespecífica (fig. 12D).

Finalmente, si el gen en estudio no tiene intrones, estamos estudiando la expresión de mRNAs de retrovirus o investigamos la transcripción de provirus integrados en el genoma, es *necesario tratar el RNA extraído con DNasa* antes de la etapa de síntesis de cDNA: de esta manera nos aseguramos de que no existe coamplificación de DNA genómico. Esto no es un problema trivial si tenemos en cuenta que minúsculas cantidades de DNA genómico contaminante pueden dar falsos positivos. No obstante, se debe evitar este tratamiento con DNasa siempre que no sea estrictamente necesario, especialmente en los casos en que las muestras son pequeñas, ya que hay que eliminar luego este enzima mediante una extracción fenólica y esto reduce la cantidad de RNA final que va a ser sustrato de la RT.

Ventajas e inconvenientes del procedimiento RT-PCR

En las tablas VI y VII se mencionan algunas de las ventajas y desventajas del método. De entre las ven-

Tabla VI. Principales ventajas del método RT-PCR

1. Rápido: resultados en 1-2 días.
 2. Sensible: < 100 moléculas de mRNA detectadas.
 3. Bajo número de células: se puede analizar RNA de 1 célula a varios miles.
 4. Fenotipaje por mRNA: posibilidad de estudiar más de 10 especies de mRNA diferentes en la misma muestra.
 5. Detección de transcritos con bajo nivel de expresión.
 6. Resolución: diferencias de < 3 veces se pueden detectar.
 7. Seguridad: el análisis no requiere ³²P.
 8. Facilidad: muchas muestras pueden ser analizadas al mismo tiempo.
-

Tabla VII. Principales inconvenientes del método RT-PCR

1. No da directamente tamaños de mRNA.
 2. Sensible a la estructura secundaria del mRNA.
 3. No da información tridimensional acerca de la distribución del transcrito en células y tejidos.
 4. La cuantificación requiere esfuerzo.
 5. Poca resolución (3:1) respecto a otros métodos.
 6. Se necesita información sobre la secuencia del transcrito.
 7. El error cometido por la Taq DNA polimerasa es alto (1/5.000).
-

tajas hay que destacar la enorme sensibilidad y la posibilidad de realizar un *fenotipaje para mRNAs*, ya que pueden ser estudiados varios mensajeros de la misma muestra.

De entre las desventajas, tal vez la más importante sea la necesidad de conocer, al menos parcialmente, la secuencia del gen, aunque esto se puede solventar en muchos casos si disponemos de secuencias de cDNA específicas de otras especies, con las que los primers suelen trabajar bien.

En resumen, debido a su *sensibilidad, rapidez y exactitud*, el método de RT-PCR puede ser usado para estudiar la expresión génica de un modo más extensivo que las técnicas convencionales, permitiendo medidas cuantitativas de la expresión génica en un número muy pequeño de células y en pequeñas muestras de tejidos. Además, la posibilidad de cuantificación relativa proporciona información sobre cambios en los niveles de expresión de moléculas de RNA específicas, que puede ser valiosa en el diagnóstico y análisis de enfermedades infecciosas, genéticas, metabólicas, neoplásicas, inmunes, etc.

Bibliografía

1. Lewin B: **Genes IV**. Oxford University Press, N. Y., 1990.
2. Nevins JR: The Pathway of Eukaryotic mRNA Formation. *Ann Rev Biochem* 52:441-466, 1983.

A. HERNANDEZ y cok.

3. Castrillo JL: Factores de Transcripción Específicos de Tejido. *Invest y Ciencia* 64-72, 1992.
4. Smith CW, Patton JG y Nadal-Ginard B: Alternative Splicing in the Control of Gene Expression. *Ann Rev Genet* 23:527-577, 1989.
5. Darnell JE: Variety in the Level of Gene Control in Eucaryotic Cells. *Nature* 297:365-371, 1982.
6. Martín-Vasallo P y cols.: Análisis del DNA-II: Clonaje, secuenciación y amplificación. *Nefrología* 1993 (en prensa).
7. Harrold S, Genovese C, Kobrin B, Morrison S y Milcarek C: A comparison of Apparent mRNA half-life using Kinetic techniques vs decay following the administration of transcriptional inhibitors. *Anal Biochem* 198:19-29, 1991.
8. Carter BZ y Malter JS: Regulation of mRNA stability and its relevance to disease. *Lab Invest* 65:61 O-621, 1991.
9. Ausubel FM, Brent R, Kingston RF, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons, N. Y., 1987.
10. Berger SL y Kimmel AR (eds): *Guide to Molecular Cloning Techniques. Methods Enzymol.* Vol 152. Academic Press Inc., Orlando, 1987.
11. Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Editor: Nolan, C. Ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989.
12. Cox RA: The use of Guanidium Chloride in the isolation of Nucleic Acids. *Methods Enzymol* 12B:120-129, 1968.
13. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ y Rutter WJ: Isolation of biologically active Ribonucleic Acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299, 1979.
14. Chomczynski P y Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
15. Davis LG, Dibner MD, Battey JF: *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishers Co., Inc. Amsterdam, 1986.
16. Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR: Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* 12:7035-7056, 1984.
17. Butler ET y Chamberlin MJ: Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. *J Biol Chem* 257:5772-5778, 1982.
18. Cibbs RA: DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Anal Chem* 62:1202-1 214, 1990.
19. Erlich HA (ed): *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifikation*. Stockton Press, N. Y., 1989.
20. Rappolee D, Wang A, Mark D y Werb Z: Novel Method for Studying mRNA Phenotypes in Single or Small Numbers of Cells. *J Cell Biochem* 39:1-1 1, 1989.
21. Wang AM, Doyle MV y Mark DF: Quantitation of mRNA by the Polymerase Chain Reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9717-9721, 1989.
22. Rappolee D, Mark D, Banda MJ y Werb Z: Would macrophages express TGF-alfa and other growth factors in vivo: Analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241:708-711, 1988.
23. Selvanayagam P, Graves K, Cooper C y Rajaraman S: Expression of the Parathyroid Hormone-Related Peptide Gene in Rat Tissues. *Lab Invest* 64:713-717, 1991.
24. Becker-André M y Hahlbrock K: Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction. A novel approach by a PCR aided transcript tritiation assay (PATTY). *Nucl Acids Res* 17:9437-9446, 1989.
25. Kinoshita T, Imamura J, Nagai H y Shimotohno K: Quantification of Gene Expression over a wide range by the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem* 206:231-235, 1992.
26. Koos RD y Seidel RH: Detection of acidic fibroblast growth factor mRNA in the ovary using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Amplification. *Biochem Biophys Res Commun* 165:182-88, 1989.
27. Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT y Bates SE: Use of the Polymerase Chain Reaction in the quantification of MDR-1 gene expression. *Biochemistry* 29:10351-1 0356, 1990.
28. Dallman MJ, Roake J, Hughes D, Toogood G y Morris PJ: Sequential analysis of IL-2 gene transcription in renal transplants. *Transplantation* 53:683-685, 1992.
29. Noonan KE y cols.: Quantitative analysis of MDRI (multidrug resistance) gene expression in human tumors by Polymerase Chain Reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7160-7164, 1990.
30. Chelly J, Concordet J, Kaplan J y Kahn A: Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2617-2621, 1989.
31. Seidel HM, Pompliano DL y Knowles JR: Exons as microgenes. *Science* 257:1489-1 490, 1992.
32. Frohman MA, Dush MK y Martin GR: Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8998-9002, 1988.