

## CLONAJE DE LAS SECUENCIAS QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS RSVP14, RSVP20 Y RSVP22 DEL PLASMA SEMINAL OVINO

Serrano, E., Beamonte, R., Guillén, N., Calleja, L., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T. y Cebrián-Pérez, J.A.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón, Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177, 50013. Zaragoza. España. E-mail: edith@unizar.es

### INTRODUCCIÓN

La pérdida de capacidad fecundante de los espermatozoides ovinos como resultado del proceso de congelación ha sido extensivamente estudiada siendo la presencia del plasma seminal, y/o de sus componentes, en los medios de criopreservación un aspecto controvertido. Nuestro grupo de investigación ha identificado varias proteínas del plasma (RSVP14, RSVP20 y RSVP22) sintetizadas exclusivamente en las vesículas seminales y componentes, que poseen la capacidad de reparar y prevenir los daños ejercidos a los espermatozoides por un choque térmico por frío (Barrios et al., 2000; Barrios et al., 2005; Fernández-Juan et al., 2006). La utilización de estas proteínas como agentes crioprotectores podría ser útil para el desarrollo de un protocolo de congelación con alto porcentaje final de espermatozoides viables y con una mayor capacidad fecundante. El uso de estas proteínas depende de la disponibilidad de las mismas, siendo esto dependiente de su presencia en el plasma seminal y de la posibilidad de su aislamiento a partir del mismo. Su presencia en el plasma seminal es baja y está sujeta a la estacionalidad reproductiva (Cardozo et al., 2006; Martí et al., 2007), existiendo una alta variabilidad entre individuos. Además, debido a su extraordinaria hidrofobicidad, su aislamiento constituye un proceso difícil y muy poco rentable. La alternativa de mayor interés es la posibilidad de obtenerlas *in vitro*. El objetivo final de esta línea de trabajo es llegar a conseguir la expresión de estas proteínas para su uso como agentes crioprotectores. Inicialmente, se ha pretendido desarrollar las etapas que aseguren su expresión en células eucariotas, presentándose aquí todos los pasos realizados.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### ***Amplificación del ADNc de RSVP14, RSVP20 y RSVP22***

Se obtuvieron muestras de tejido de vesícula seminal de un macho de raza Rasa Aragonesa sacrificado en las instalaciones de la facultad. A partir de ARN extraído de estos tejidos mediante homogenización en Tri Reagent (Sigma, St. Louis, Missouri) según el método de Chomczynski y Sacchi (1987), se llevó a cabo la obtención de cDNA mediante transcripción reversa (RT) con el kit SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, California). Los oligonucleótidos se diseñaron en base a las secuencias de ARNm descritas por nuestro grupo y añadiendo las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción necesarias para introducir el amplificado en plásmidos. Así, para RSVP14 (número de referencia GenBank: NM\_001143665) los oligonucleótidos fueron 14Fw; 5'-ATC GGC GAT CGC CAT GGC GCC GCA GCT GGG GCT-3' y 14Rv; 5'- ATC GGT TTA AAC CTA GCA ATA CTT CCA AGC TC-3' y para RSVP20 y RSVP22 (NM\_001093782 y NM\_001143666) fueron 2022Fw; 5'- ATC GGC GAT CGC CAT GGC ACC GCG TCT GGG GCT CTT-3' y 2022Rv; 5'- ATC GGT TTA AAC TTA ATA CCG ATC GCA GTA CTG CC-3'. La composición las reacciones de PCR fue 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 0,3 μM de cada oligonucleótido, 0,6 U de Taq polimerasa y 1 μl de reacción de RT en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico para obtener RSVP14 fue de un ciclo a 94 °C-2 minutos, 30 ciclos con un primer paso de temperatura constante a 94 °C-15 segundos, un segundo paso de temperatura variable (disminuyendo un grado cada ciclo) de 70 °C a 40 °C-30 segundos y un paso final también constante a 70 °C-30 segundos, 10 ciclos a 94 °C-15 segundos, 50 °C-30 segundos, 70 °C-30 segundos y una extensión final a 72 °C-10 minutos, mientras que para RSVP20 y RSVP22 fue de un ciclo a 94 °C-1 minuto, 30 ciclos a 94 °C-45 segundos, 54 °C- 45 segundos, 72 °C-1 minuto con

extensión final a 72 °C-5 minutos. La separación de las secuencias de RSVP20 y RSVP22 se realizó por el corte con las enzimas de restricción BclI (T/GATCA) y SmaI (C/TYRAG) y posterior extracción de un gel de agarosa al 1% (Gene JET Gel Extraction Kit de Fermentas, Canadá).

#### **Obtención de plásmidos recombinantes**

El plásmido utilizado fue pF25A ICE T7 Flexi Vector (Promega, Madison, Wichita). Las secuencias se introdujeron siguiendo las instrucciones del fabricante y los plásmidos se utilizaron para transformar bacterias JM109 Competent Cells (Promega). Las bacterias se sembraron en placas con agar LB y 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se aislaron 10 colonias de cada secuencia y se incubaron en medio LB a 37 °C, 16 horas y en agitación. Los plásmidos se extrajeron con PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) y se comprobó mediante secuenciación qué colonias contenían el inserto correcto para posteriormente congelarlas a -80 °C en un 15% de glicerol. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica del Parque científico de Madrid en un equipo ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, Foster City, California).

#### **Expresión de las proteínas**

Las proteínas se expresaron en un extracto de células de insecto usando el kit TNT T7 Insect Cell Extract Protein Expression System (Promega) y se comprobó su presencia mediante Western Blot utilizando anticuerpos policlonales generados contra ellas en conejo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A pesar de realizar diferentes intentos de amplificación de la secuencia que codifica para RSVP14, no se obtuvieron resultados hasta que finalmente se diseñó un protocolo de PCR *touchdown*, que se caracteriza por utilizar temperaturas variables durante la fase de hibridación y permitir así el uso de oligonucleótidos con diferentes Tm como ocurre en este caso. Con este protocolo se consiguió un producto de 416 pb (Figura 1) que contiene la secuencia que codifica para la proteína RSVP14 como se comprobó por secuenciación y alineamiento.

Las secuencias RSVP20 y RSVP22 son muy similares a excepción de un grupo de 30 nucleótidos entre las posiciones 147 y 178, por lo que los oligonucleótidos diseñados amplifican ambas simultáneamente (Figura 1). Usando la enzima BclI que reconoce la secuencia T/GATCA, presente en RSVP22 pero no en RSVP20, se digirió el amplificado obtenido. Tras realizar una electroforesis se extrajo la banda de mayor tamaño. Este producto fue sometido a una PCR posterior obteniéndose una única secuencia de 485 pb que se corresponde con la que codifica para RSVP20.

Para obtener RSVP22 se realizó un protocolo similar pero usando la enzima SmaI (C/TYRAG) que únicamente corta la secuencia de RSVP20. El resultado es un fragmento de 461 pb.

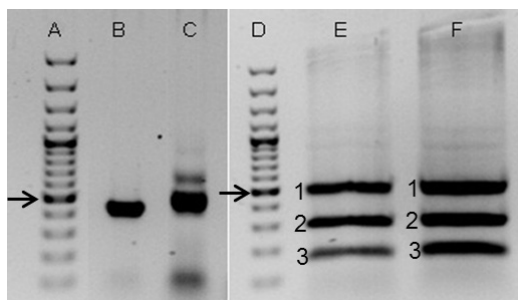
Las tres secuencias obtenidas se insertaron en vectores que se usaron para transformar bacterias. Posteriormente se corroboró qué líneas bacterianas contenían los plásmidos con la secuencia correctamente insertada.

Actualmente, se está poniendo a punto el protocolo para la expresión de estas proteínas en células de insecto a partir de los plásmidos conseguidos en este estudio. Se ha expresado la proteína de 20 KD en extractos de células de insecto, como se ha comprobado por Western Blot (Figura 2).

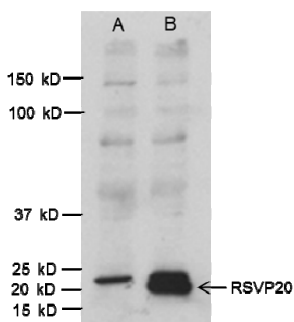
## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. 2000. *Biol Reprod* 63(5): 1531-1537. • Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. 2005. *J Androl* 26(4): 539-549. • Cardozo, J.A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. 2006. *Theriogenology* 66(4): 841-850. • Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-159. • Fernández-Juan, M., Gallego, M., Barrios, B., Osada, J., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2006. *J Androl* 27(4): 588-595. • Martí, E., Mara, L., Martí, J.I., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. 2007. *Theriogenology* 67(9): 1446-1454.

**Agradecimientos:** Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas CICYT-FEDER AGL 2010-18975, DGA A-26/2010, proyecto OTRI 2010/0597 y beca IUCA 2010.



**Figura 1.** Amplificación de RSVP14 (B) y amplificación conjunta de RSVP20 y 22 (C). Resultado de la digestión con enzima BclI (E), RSVP20 completa (E1), fragmentos de RSVP22 (E2 y E3). Resultado de la digestión con enzima BmoI (F), RSVP22 completa (F1), fragmentos de RSVP20 (F2 y F3). Marcador de pesos moleculares (A y D), la flecha indica 500 pb.



**Figura 2.** Western Blot de la expresión de la proteína RSVP20 en un extracto de células de insecto (B). Control negativo: extracto de células de insecto sin expresión de la proteína (A).

### CLONING OF DNA SEQUENCES ENCODING RSVP14, RSVP20 AND RSVP22 PROTEINS FROM OVINE SEMINAL PLASMA

**ABSTRACT:** The adsorption of seminal plasma proteins (SPP) to the ram sperm surface partially restores the functional characteristics of damaged spermatozoa, reproducing those of live cells. Previously, we have reported that three ram SPP, RSVP14, RSVP20 and RSVP22 are responsible for this protective effect. They can both prevent and repair the cold-shock damage on the sperm membrane surface. Obtaining these proteins in vitro would allow us to formulate better cryopreservation diluents. In this study, we present the polymerase chain reaction (PCR) profile necessary to amplify the DNA sequences that codify for these proteins and its inclusion into plasmids. RNA extracted from the seminal vesicles of Rasa Aragonesa rams was retrotranscribed to obtain cDNA, which was used in order to carry out the PCR reactions. Primers were designed for each sequence. Direct sequencing confirmed that cycling conditions of 94 °C 1 minute; [94 °C-45 seconds; 54 °C-45 seconds; 72 °C-1 minute] x 30; 72 °C-5 minutes for RSVP20 and RSVP22 are the most appropriate conditions to obtain the desired sequences and that RSVP14 can only be amplified using a touchdown PCR protocol with cycling conditions of 94 °C-2 minutes; [94 °C-15 seconds; from 70 °C to 40 °C (decreasing the temperature one grade each cycle)-30 seconds; 70 °C-30 seconds] x 30; [94 °C-15 seconds, 50 °C-30 seconds, 70 °C-30 seconds] x 10, 72 °C-5 minutes.

**Keywords:** ram spermatozoa, proteins, cold-shock, cloning