

Diseño y validación de cebadores para el gen Calmegin en alpacas

Ganoza, L.; Moscol, F.S.; Ugarelli, A.; Evangelista, V.S.

Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Panamericana Sur Km 19, Villa El Salvador, Lima, Perú.
E-mail: sevangelista@cientifica.edu.pe

Resumen

Ganoza, L.; Moscol, F.S.; Ugarelli, A.; Evangelista, V.S.: Diseño y validación de cebadores para el gen Calmegin en alpacas. *Rev. Vet.* 33: 1, 69-70, 2022. En la presente comunicación breve se describe el primer diseño y validación de cebadores para el gen Calmegin en alpacas. Se observó mediante electroforesis horizontal que los amplicones diseñados cumplían con el tamaño predicho en forma *in silico* por lo que se concluyó que es posible diseñar cebadores *in silico* para el gen de Calmegin en alpaca y validarlos mediante la técnica de PCR.

Palabras clave: alpaca, Calmegin, diseño de cebadores, PCR.

Abstract

Ganoza, L.; Moscol, F.S.; Ugarelli, A.; Evangelista, V.S.: Design and validation of primers for the gene Calmegin in alpacas. *Rev. Vet.* 33: 1, 69-70, 2022. This brief communication describes the first design and validation of primers for the Calmegin gene in alpacas. It was observed by horizontal electrophoresis that the designed amplicons complied with the predicted size *in silico*, so it was concluded that it is possible to design *in silico* primers for the Calmegin gene in alpaca and validate them using the PCR technique.

Key words: alpaca, Calmegin, cebador design, PCR.

INTRODUCCIÓN

El gen Calmegin⁴ es esencial para conferir la capacidad fecundante a los espermatozoides y se expresa en tejido testicular de mamíferos^{8,6}. Ha sido estudiado en seres humanos, roedores y otras especies^{7,10} encontrando que es determinante sobre la función reproductiva, ya que sin el gen (*knockout CLGN-*), se observa que el macho llega a ser estéril¹⁰.

Asimismo, se ha demostrado que la deficiencia de Calmegin no altera la morfología y motilidad normal de los espermatozoides, motivo por el cual se podría clasificar a los espermatozoides como aptos para fecundar, a pesar de ser estériles³.

En alpacas, la secuencia del gen descrita en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) fue obtenida por perdigonada, encontrándose dentro del cromosoma² pero sin una ubicación específica y con un tamaño aproximado de 41493 bp.

Es por este motivo que, para continuar estudios en este gen, es necesario contar con cebadores específicos diseñados y validados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el diseño *in silico* de los cebadores, se empleó el software *primer 3 versión 0.4.0* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), utilizando como base la secuencia del gen Calmegin en alpacas (*Gene ID: 102536054*) obte-

nido del *GenBank* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

La selección de cebadores se realizó en dos fases: primero se consideraron las parejas de cebadores que cumplían con los criterios establecidos por Abdelsalam¹ y en la segunda fase, se evaluaron las características físicas de los mismos empleando el programa *Oligo Analyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies (IDT)* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Por otro lado, se determinó la ubicación de los cebadores diseñados con respecto a la secuencia del gen y la variante x2 de ARNm (código acceso NCBI: NW_005882945.1) de Calmegin mediante alineamiento, empleando el programa *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Para la validación de los primers mediante PCR convencional, se emplearon 20 muestras de tejido testicular provenientes de alpacas beneficiadas en el camal municipal de Huancavelica (Perú).

Para la extracción del ADN se empleó el kit *innuPREP DNA Mini Kit* (Analytik Jena), mientras que para la amplificación se empleó el *innuMIX Standard PCR MasterMix* (Analytik Jena) y un protocolo de amplificación de 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C de 40 s, 58°C de 40 s, 72°C de 40 s y, finalmente, elongación final 72°C de 10 min en un termociclador *Thermal Cycler 0.2 ml x 64 PCR-300* (mcr).

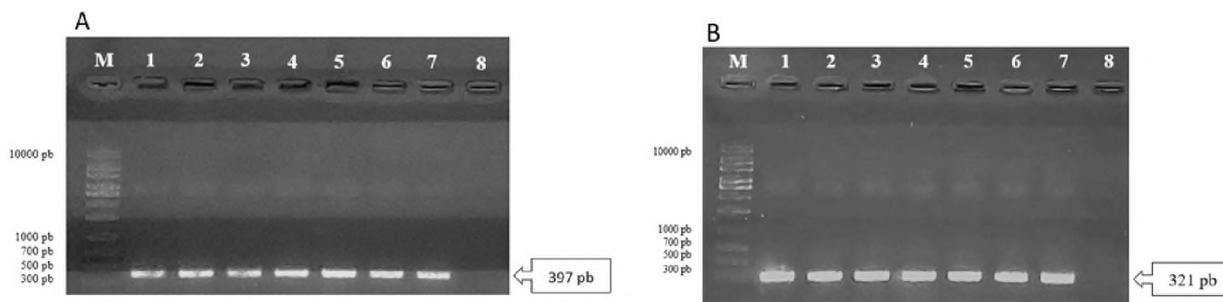


Figura 1. A: cebadores Calmegin-CG1; tamaño de amplicón CG1: 397 pb. B: cebadores Calmegin-CG2, tamaño de amplicón CG2: 321 pb. En ambos casos: carril M: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 1-7: amplicones de muestras de alpaca y carril 8: control negativo.

Los amplicones fueron visualizados por electroforesis horizontal en gel de agarosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el empleo del programa *primer 3* se obtuvieron un total de 20 pares de cebadores; sin embargo, se seleccionaron 10 pares que cumplieron con los criterios ya anteriormente mencionados ¹.

Posteriormente, se evaluaron las características físicas de los mismos, seleccionándose finalmente sólo 2 pares: Calmegin-CG1 y Calmegin-CG2.

Con el objeto de determinar la zona de hibridación de estos pares de cebadores, se realizó el alineamiento de ellos con las secuencias nucleotídicas de la variante x2 de ARNm y el gen Calmegin de alpaca, determinándose que para el caso de Calmegin-CG, el forward se hibrida entre los nucleótidos 40322 y 40342 y el reverse de Calmegin-CG1 está entre los 40700 y 40720 del exón 16 en ambos casos; mientras que, en el caso de Calmegin-CG2 el forward se hibrida entre los 28252 y 28272 y el reverse entre los 28553 y 28573 del intrón 1.

El alineamiento de la secuencia de ADN y ARNm permite tener mayor confiabilidad en casos como este, que no se cuenta con suficiente información sobre la especie a investigar en la base de datos del NCBI ⁹.

En el presente trabajo, al igual que Flores ², se han considerado válidos los cebadores cuyos amplicones obtenidos por PCR convencional y visualizados en gel de agarosa (Figura 1) coinciden con el tamaño de pares de bases obtenido *in silico*, siendo para Calmegin-CG1 y Calmegin-CG2, 397 pb y 321 pb respectivamente.

Este es el *primer* reporte de diseño y validación de cebadores específicos para la identificación del gen *Calmegin* en tejido testicular de alpaca. Debido a la importancia de este gen en la reproducción de otras especies ^{3, 5, 6}, consideramos que es imprescindible continuar con investigaciones que empleen los hallazgos del presente estudio.

Agradecimientos. Esta investigación se realizó gracias al proyecto “Caracterización de marcadores moleculares en genes relacionados a espermatogénesis y fertilidad espermática a partir de transcriptomas de

testículo y epidídimo de alpaca” (código: E0 41 - 2016 - 01), contrato 118-2016 financiado por el *Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica* (FONDECYT).

REFERENCIAS

1. **Abdelsalam K.** 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR cebador design. *African Journal of Biotechnology* 2: 91-95.
2. **Flórez F.** 2016. Caracterización de marcadores genéticos en genes que codifican a proteínas asociadas a queratina y evaluación de la asociación del gen KRTAP11-1 al diámetro de fibra en alpaca (*Vicugna pacos*) siguiendo una aproximación de gen candidato. *Tesis de Maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia*, Perú.
3. **Ikawa M et al.** 2011. Calsperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 5639-5646.
4. **Ikawa M et al.** 1997. The putative chaperone calmegin is required for sperm fertility. *Nature* 387: 607-611.
5. **Inoue N, Yamaguchi R, Ikawa M, Okabe M.** 2007. Sperm-egg interaction and gene manipulated animals. *Society of Reproduction & Fertility Supplement* 65: 363-371.
6. **Inoue N, Ikawa M, Okabe M.** 2011. The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian Journal of Andrology* 13: 81-87.
7. **Muro Y, Okabe M.** 2011. Mechanisms of fertilization. A view from the study of gene-manipulated mice. *Journal of Andrology* 32: 218-225.
8. **Siep M et al.** 2004. Basic helix-loop-helix transcription factor Tcf15 interacts with the calmegin gene promoter in mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Research* 32: 6425-6436.
9. **Tataje L.** 2013. Expresión testicular de ciclina A1 (CCNA1) en alpacas (*Lama pacos*). *Tesis de Maestría, Universidad Mayor de San Marcos*, Perú.
10. **Yamagata K et al.** 2002. Sperm from the calmegin-deficient mouse have normal abilities for binding and fusion to the egg plasma membrane. *Elsevier Science* 250: 348-357.