

Transfección rápida y eficiente de células de eucariotas superiores utilizando la electroporación

M.P. ESTRADA,¹ P. ORAMAS,² J.A. RUBÍ,² A. HERNÁNDEZ,³ S. PÉREZ² y J. DE LA FUENTE.¹

¹ Agrupación de Genética de Células de Mamíferos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

² Agrupación de Plantas y Fertilizantes (CIGB)

³ Laboratorio de Electrónica (CIGB)

Recibido en diciembre de 1989

Aprobado en junio de 1990

INTRODUCCION

Una gran variedad de métodos han sido desarrollados para la transferencia de ADN desnudo a células eucariotas. Ellos se basan en principios físicos y químicos que permiten a la molécula de ADN traspasar la barrera de la membrana celular y expresar en el interior de la célula la información genética que porta.

Entre los métodos más usados para la clonación de genes en células de eucariotas superiores se encuentran: incubación de las células con el ADN exógeno precipitado en solución de fosfato de calcio (Graham y Van der Eb, 1973); inyección directa del ADN en el núcleo o en el citoplasma de la célula (Griesbach, 1983; Crossway *et al.*, 1985); uso de vectores virales (Hamer y Leder, 1979); utilización de liposomas como vehículos para la transferencia génica (Wong *et al.*, 1980; Schaefer-Ridder *et al.*, 1982); fusión de protoplastos (Zimmermann y Scheurich, 1981; Bates *et al.*, 1983); técnica de DEAE-DEXTRAN y del Polietilenglicol (PEG) (McCutchan y Pagano, 1968; Paszkowski *et al.*, 1984) usada exitosamente para células en suspensión y para el estudio de expresión

transitoria; uso de microproyectiles acelerados (Klein *et al.*, 1987) y la electroporación (Neumann *et al.*, 1982; Potter *et al.*, 1984; Fromm *et al.*, 1985; Langridge *et al.*, 1985; Fromm *et al.*, 1986; Chritou *et al.*, 1987). Esta última fue la seleccionada por nosotros para la transfección de células de plantas y mamíferos por su alta eficiencia, sencillez y factibilidad de realización.

Este método se basa en la creación de poros o huecos en la membrana celular, de forma reversible, a partir de la reorganización de sus lipoproteínas al crearse un campo eléctrico homogéneo (E) entre los electrodos de la cubeta de electroporación (ver figura 1). Este campo es aprovechado para la introducción de macromoléculas al interior de las células (Neumann *et al.*, 1982; Zimmermann y Vienken, 1982).

MATERIALES Y METODOS

Células

Se utilizaron como hospederos los protoplastos de *Nicotiana tabacum* y las células COS 7 (células de riñón de mono verde africano).

Los protoplastos fueron aislados del mesófilo de las hojas de plantas estériles del *N. tabacum* cv. Petit Habana línea SR1 (Maliga *et al.*, 1973). El protocolo utilizado para su purificación fue según Saul *et al.* (1988).

Las células COS 7 fueron crecidas en medio Eagle Modificación de Dulbecco (DMEM), suplementado con 5% de suero fetal de ternero.

Plasmidios

En ambos casos se utilizó como reportero el gen que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), enzima de bacteria que está ausente en las células eucarióticas y que nos permite ensayar la actividad de una forma rápida y sensible entre las 24 y las 48 horas, en forma transitoria (Gorman *et al.*, 1982; Hauptmann *et al.*, 1987).

El plasmidio utilizado en las células de planta fue el pCaMVCAT, el cual posee el gen del CAT bajo el promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y en su extremo 3' la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (NOS).

El plasmidio utilizado para las células de mamíferos fue el pSV₂CAT (Gorman *et al.*, 1982), el cual posee el gen que codifica para la CAT, bajo el promotor del SV40 y con la señal de poliadenilación de dicho gen en el extremo 3'.

Electroporación

Para lograr este objetivo se diseñó y se construyó un equipo sencillo de electroporación (figura 1), que dispone de un banco de capacitores que permite usar capacitancias de: 220, 440, 660, 880, 1 000, 1 220, 1 440, 1 660 y 1 880 μF . Con estos capacitores pueden obtenerse pulsos exponenciales, donde la duración está en dependencia de la capacitancia designada y la resistencia de la solución de electroporación. La cubeta de electroporación utilizada fue construida a partir de una cubeta de espectrofotómetro plástica, en la cual se introdujo papel de aluminio en caras opuestas que sirvió como electrodo plano, quedando separado uno del otro a una distancia de 0,5 cm. El volumen de trabajo fue entre 0,5 ml y 0,8 ml.

Para el ensayo de electroporación se utilizaron $1,5 \times 10^6$ protoplastos en 0,5 ml de solución de electroporación (BE), BE#2 (Glucosa 0,5 M, CaCl_2 1,4 mM, Mes 10 mM, pH 5,5) y BE#3 (Manitol 0,2 M, NaCl 0,15 M, CaCl_2 5 mM, y Hepes 10 mM, pH 7,2).

Se utilizaron 10 μg de plasmidio pCaMVCAT por muestra y en todos los casos se añadieron 50 μg de ADN de timo de ternera.

Se utilizó siempre la misma capacitancia de 440 μF y se varió el voltaje utilizándose 100 y 200 V. Después de producir el pulso en la cubeta de electroporación,

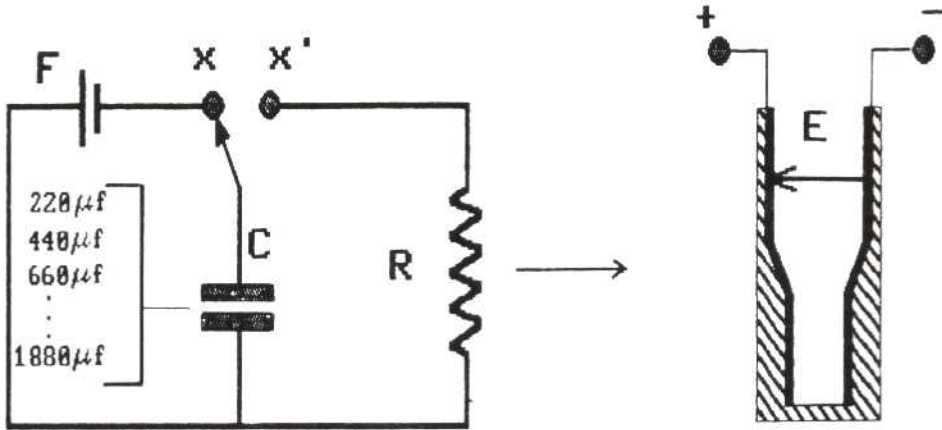


FIG. 1. Esquema simplificado del electroporador. F: fuente de voltaje y corriente variable (EPS 500/400, Pharmacia); C: banco de capacitores (4 de 220 y 1 de 1 000 μF); X: posición de carga de los capacitores; X': posición de descarga de los capacitores; R: cubeta de electroporación; E: campo de corriente homogéneo creado entre los electrodos planos.

los protoplastos fueron incubados en hielo durante 10 minutos y luego cultivados en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) durante 20 horas a 25°C en la oscuridad, antes de ensayar la actividad de CAT.

Para el ensayo en COS 7 se utilizaron, por experimento, 2×10^6 células, a las cuales se les realizaron dos lavados con PBS 1X (PBS 10X: 80 g NaCl, 20 g KCl, 15 g NaHPO₄, 20 g KH₂PO₄, para un litro de agua bidestilada); posteriormente fueron resuspendidas en 0,8 ml de solución HBS 2X (HBS 10X: 8,18% NaCl, 5,94% Hepes, 0,2% NaH₂PO₄, pH 7,12 ajustado con NaOH 1 N) y mezcladas con 10 µg de plasmidio pSV₂CAT. Más tarde las células fueron colocadas en hielo durante 10 minutos y finalmente se les aplicó un pulso con un voltaje inicial de 350 V y la capacitancia deseada en cada caso. Inmediatamente después fueron pasadas a placas con 5 ml de medio DMEM enriquecido con 5% de suero fetal de ternero, e incubadas en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C por 48 horas, antes de ensayar la actividad de CAT.

Ensayo de CAT

El ensayo de CAT se realizó básicamente según Shaw (1983), y Crabb y Dixon (1987).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en la electroporación de protoplastos (figura 2), muestran que todas las condiciones utilizadas produjeron transfección y que la mayor eficiencia se obtuvo con el BE#3 y 200 V. En estas condiciones fue donde único apareció el 1,3- diacetylcloranfenicol.

Se debe señalar que un papel muy importante lo desempeñan la calidad y la viabilidad de los protoplastos. Esta última, en nuestro caso, osciló entre 75%-80% medida con diacetato de floraceína (FDA). Por otra parte, fueron usados voltajes mayores, pero la viabilidad obtenida fue menor del 40%¹.

En la figura 3 se muestra el ensayo de actividad de CAT de las células de mamíferos transfectadas utilizando 440, 880 y 1 660 µF, observándose una buena expresión de CAT cuando se usó una

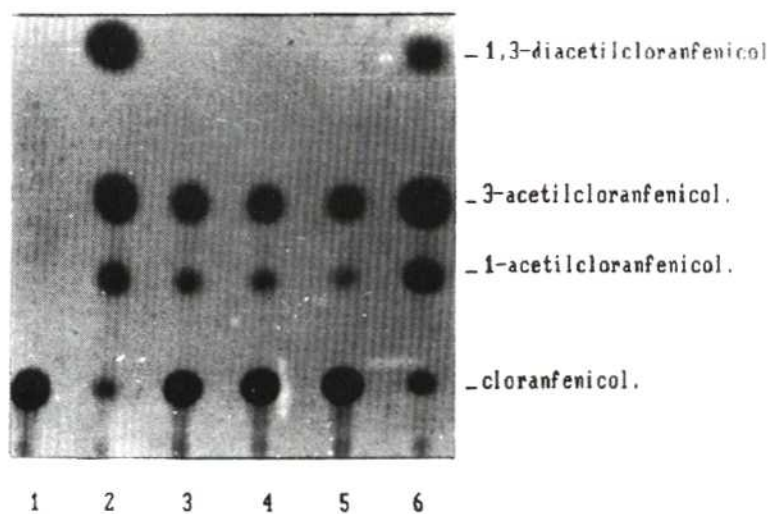


FIG. 2. Ensayo de CAT en protoplastos de *N. tabacum* con el plasmidio pCaMVCAT: 1) protoplastos electroporados sin plasmidio; 2) acetilación producida por 1 unidad de CAT; 3 y 4) protoplastos electroporados utilizando BE#2 con 100 y 200 V respectivamente; 5 y 6) protoplastos electroporados utilizando BE#3 con 100 y 200 V respectivamente.

¹ Datos no mostrados

capacitancia de 440 μF . Con estas condiciones se alcanzó el 50% de sobrevivencia celular después del pulso. Por otra parte, en los casos de 880 y 1 660 μF , no se observó actividad enzimática y esto correspondió con 5% y 0% de sobrevivencia celular después del pulso. En todos los casos se realizó conteo de células teñidas con *Trypan blue* para estimar sobrevivencia después de la electroporación. Nuestro resultado coincide con el de otros autores que reportan buena eficiencia de transfección con 50% de sobrevivencia celular.

Podemos concluir que el equipo diseñado y construido por nosotros permite la transfección de células de eucariotas superiores, tanto de plantas como de mamíferos, con alta eficiencia, bajo costo y poca manipulación, lo que disminuye, entre otras cosas, el riesgo de contaminación y posibilita ajustar condiciones óptimas de transfección en poco tiempo.

REFERENCIAS

- BATES, G.W.; J.J. GAYNOR y N.S. SCHEKHWAT (1983). Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiol.* **72**: 1110-1113.
- CHRITOU, P.; J.E. MURPHY y W.F. SWAIN (1987). Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3962-3966.
- CRABB, D.W. y J.E. DIXON (1987). A method for increasing the sensitivity of chloramphenicol acetyltransferase assay in extracts of transfected cultured cells. *Anal. Biochem.* **163**: 88-92.
- CROSSWAY, A.; J.V. OAKES; J.M. IRVINE; B. WARD; V.C. KNAUF y C.K. SHEWMAKER, (1985). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 179- 185.
- FROMM, M.E.; L.P. TAYLOR y V. WALBOT (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5824-5828.
- FROMM, M.E.; L.P. TAYLOR y V. WALBOT (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature.* **319**: 719-793.
- GORMAN, C.M.; L.F. MOFFAT y B.H. HOWARD (1982). Recombinant genomes which express

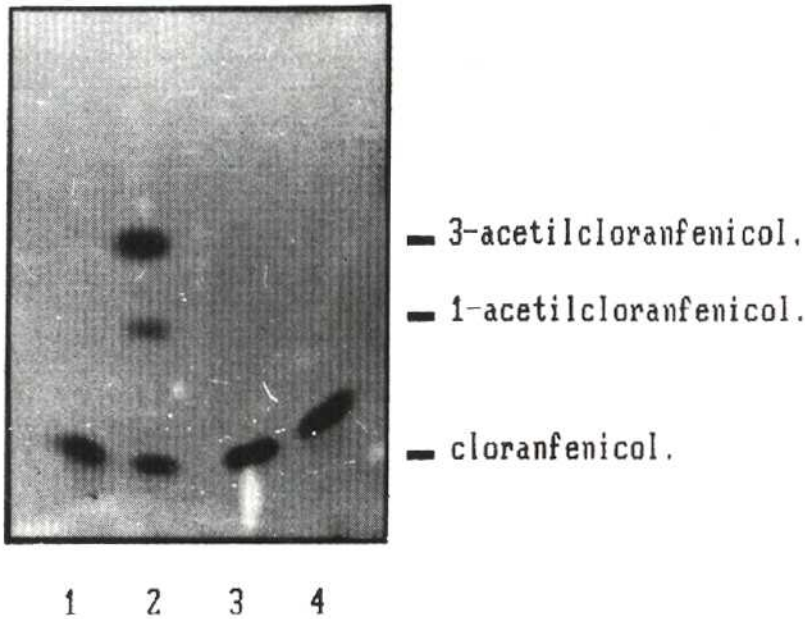


FIG. 3. Ensayo de CAT en células COS 7: 1) células electroporadas sin plasmidio; 2,3 y 4) células electroporadas, con capacitancia de 440, 880 y 1 660 μF respectivamente.