

# El polimorfismo conformacional de simple cadena en la caracterización del VHC

Ariel Viña, Idania González, Odalys García y Juan Morales Grillo.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162, Código Postal 10600, La Habana, Cuba.

Recibido: 5 de abril de 1999. Aceptado: 15 de marzo del 2000.

Palabras clave: PCSC, PCR, VHC, secuencia directa.  
Key words: SSCP, PCR, HCV, direct sequence.

**RESUMEN.** La infección por el virus de la hepatitis C constituye hoy un problema de salud en el mundo. En Cuba aproximadamente el 1 % de la población es seropositiva y se estima, por la práctica internacional, que en un 80 % de los infectados la enfermedad se hace crónica y de estos un 20 % desarrolla cirrosis hepática. Se ha planteado que el curso de la enfermedad guarda estrecha relación con la variante genómica del virus. De ahí, la importancia de contar con un método sencillo para caracterizar molecularmente las diferentes variantes genómicas en cada caso. En el presente trabajo se estableció una metodología sencilla en pacientes cubanos que facilita este estudio para el virus de la hepatitis C. Se optimizó el secuenciamiento directo de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN complementario de la región 5' no traducida (5'NT) del virus y debido a la baja heterogeneidad encontrada en las muestras estudiadas y a la imposibilidad de detectar coinfección, se desarrolló una técnica más sencilla y rápida de búsqueda de variantes del genoma viral: se describe un método no radiactivo para el estudio del Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena de los productos de la PCR que permite, mediante tinción con nitrato de plata, obtener una visualización directa y muy sensible del producto desnaturalizado de la PCR en gel no desnaturalizante de poliacrilamida. Se demuestra cómo cadenas simples de una misma longitud se separan por diferencias en sus secuencias. En particular, se muestra cómo se separan las dos cadenas complementarias del fragmento de ADN y cómo se diferencian cadenas con un solo cambio de base.

**ABSTRACT.** Type C viral hepatitis is a health concern in all around the world. In Cuba, about 1 % of the population is considered to be seropositive. International studies have shown that 80 % of the infected people becomes chronic and 20 % of them suffers from cirrhosis. It has been said that the evolution of the disease is closely related to the genome variant of the virus. Thus, it is important to have a simple method for molecular characterization of the different genome variants in each case. This paper describes a simple methodology developed to study HCV in Cuban patients. The direct sequencing of the products from the polymerase chain reaction (PCR) of the complementary DNA 5' non-translated region was optimized. Due to the low heterogeneity found among the studied samples and to the fact that it was not possible to detect coinfection, a simple and rapid technique was developed to search variants of the viral genome. A nonradioactive method is described for the study of Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) of the PCR products. A direct and very sensitive visualization of the SSCP bands is accomplished by silver staining. It is demonstrated how single chains of the same length are separated due to the difference in their sequences, specially how the two complementary chains of the DNA fragment are separated and how chains with only a single base change are differentiated.

## INTRODUCCION

Se estima que aproximadamente el 1 % de la población mundial está infectada por el virus de la hepatitis C (VHC). Se ha comprobado que hasta el 80 % de los infectados evolucionan a una hepatitis crónica y entre ellos, cerca del 20 % desarrolla cirrosis hepática.<sup>1,2,3</sup> Uno de los factores que se afirma influyen en la forma de evolución de la enfermedad en cada infectado es el genotipo del virus presente.<sup>4</sup> El VHC, que es miembro de la familia *Flaviviridae* tiene como material genético un ARN de simple cadena positiva de unos 10 000 nucleótidos<sup>5</sup> y existe en el hospedero en forma de cuasiespecie. Según la clasificación actualmente aceptada, se han definido al menos seis genotipos que se nombran con las cifras 1, 2, 3, etc.<sup>6</sup> Dentro de los genotipos se definen diferentes subtipos que se nombran con letras: 1a, 1b, 2a, 2b, etcétera.

Uno de los métodos más potentes de caracterización molecular de la infección por VHC y que ha ofrecido abundante información al analizar muestras provenientes de diferentes regiones del mundo<sup>7</sup> es el secuenciamiento directo de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).<sup>8</sup> Sin embargo, es frecuente la necesidad de buscar condiciones óptimas para el secuenciamiento de cada fragmento amplificado.<sup>9</sup>

Se han reportado otros métodos más sencillos: juegos de cebadores de PCR genotipo-específicos,<sup>10</sup> tiras de nitrocelulosa con oligonucleótidos genotipo-específicos sobre las que se hace hibridar el producto de

la PCR marcado con isótopos radiactivos<sup>11</sup> o análisis con enzimas de restricción del producto amplificado.<sup>12</sup> Estos métodos, sin embargo, permiten determinar sólo una parte de las posibles variantes genómicas, aumentando considerablemente su complejidad cuando se intenta abarcar un número mayor de variantes a diferenciar y exigiendo el diseño de nuevos oligonucleótidos o la modificación de los existentes. Además, están dirigidos fundamentalmente a encontrar secuencias ya conocidas y en caso de coexistencia de genomas, no permiten obtener una interpretación clara.

Estos inconvenientes pueden ser superados mediante el estudio del Polimorfismo Conformacional de Simple Cadena (PCSC) [Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)] aplicado a los productos de la PCR,<sup>13,14</sup> que consiste en realizar una electroforesis en gel de poli-acrilamida, en condiciones no desnaturantes, del ADN previamente desnaturado. En estas condiciones, las cadenas simples del ADN adquieren conformaciones estables debido al apareamiento entre bases de una misma cadena. De esta manera, la conformación final de la molécula y por tanto su movilidad electroforética, dependen directamente de su estructura primaria (secuencia nucleotídica).

El objetivo de este trabajo fue seleccionar y establecer una metodología sencilla que permitiera caracterizar molecularmente las diferentes variantes genómicas del VHC.

## MATERIALES Y METODOS

### Descripción de las muestras

Se emplearon dos grupos de muestras. El primero consistió en dos productos de la PCR con una sola base de diferencia en sus secuencias, que fueron obtenidos mediante amplificación de los clones Core 2 y 8. Estos, resultantes de la clonación de un fragmento de 230 pb de la región de la cápsida, tenían sólo una base diferente en sus secuencias, según se demostró por secuenciación "convencional" de los plasmidios (Fig. 1).

El segundo grupo consistió en 25 amplicones cuyas secuencias resultaron idénticas cuando fueron realizadas directamente al producto de la PCR. Estos fragmentos de ADN de 229 pb, se obtuvieron por reverso-transcripción acoplada a dos rondas de PCR (nested PCR), como ha sido descrito previamente,<sup>15</sup> a partir de 25 aislamientos virales de 9 provincias

del país. El RNA viral se extrajo del suero de los pacientes utilizando el método de Chomczynski.<sup>16</sup>

Todos los productos de las PCR fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa (2 %) de bajo punto de fusión para ser secuenciados y/o analizados por PCSC.

### Secuencia directa

Para la selección de las condiciones de la secuencia directa de los productos de la PCR, se siguieron las instrucciones del "fmol DNA sequencing system kit" (Promega, USA) excepto que las reacciones se prepararon con diferentes relaciones molde:cebador (1:10 y 1:5) y sin incluir los ddNTP (terminadores específicos de la extensión) en las cuatro mezclas finales (PCR lineal o L-PCR). Estas cuatro mezclas idénticas para cada relación molar molde:cebador fueron sometidas a diferentes cantidades de ciclos de desnaturación a 95 °C por 30 s e hibridación-extensión a 70 °C por 30 s, para ser analizadas posteriormente mediante electroforesis en geles desnaturantes de secuenciación. De esta forma, con cada relación molar molde:cebador se estudiaron cuatro diferentes cantidades de ciclos: 5, 10, 20 y 30. La mejor condición de secuencia se definió como

aquella relación molar molde:cebador y cantidad de ciclos, para los cuales desaparecían las paradas inespecíficas. En las condiciones escogidas se realizó la secuencia según las indicaciones del sistema de secuenciación.

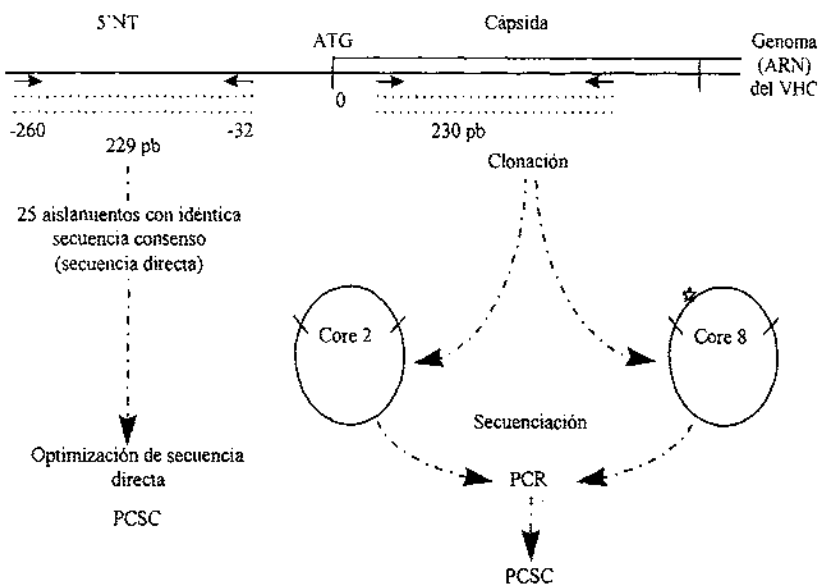
### PCSC radioactivo

Para la variante radiactiva del PCSC se realizó una PCR adicional con ambos cebadores (o uno de ellos) marcados con <sup>32</sup>P. La electroforesis se practicó en las mismas condiciones que la secuencia directa, pero en un gel no desnaturante (sin urea). Este fue secado y realizada su radiografía.

### PCSC no radioactivo

La electroforesis se realizó en condiciones no desnaturantes, en gel de poli-acrilamida (15x15x0,08) cm<sup>3</sup> al 12,5 % en TBE 0,5x que también sirvió como regulador de corrida. Se realizó corrida previa de 1 h a 4 °C, 15 mA y 9 W para alcanzar la composición iónica adecuada dentro del gel. La electroforesis se mantuvo durante 3 h bajo el régimen descrito.

Una mezcla de 6 µL de disolución de ADN (de 0,5 a 50 ng), 4 µL de disolución de parada (95 % formamida, 20 mmol/L EDTA, 0,05 % bromofenol azul y 0,05 % cianol de



**Fig. 1.** Descripción de los dos grupos de muestras utilizados para demostrar las características del PCSC. Su habilidad de detectar diferencias de sólo una base entre secuencias se demostró empleando las PCR de los plasmidios Core 2 y 8, con sólo una base diferente (★), obtenidos por clonación de la PCR de un fragmento de 230 pb de la región de la cápsida. Para el estudio de su utilidad en la detección de secuencias minoritarias dentro de una cuasiespecie, se tomaron 25 PCR con igual secuencia consenso demostrada mediante secuenciación directa. Estos 25 fragmentos corresponden a los nucleótidos (-260) al (-32) de la región 5'NT del VHC (numerados a partir del ATG que inicia la poliproteína).

xileno) y 2  $\mu$ L de formamida, se aplicó al gel directamente del bloque térmico donde fue calentada al menos 3 min a 95 °C, para producir su desnaturalización.

Para la tinción del gel se procedió según protocolo descrito por Promega.<sup>3</sup> El gel fue fijado 20 min en ácido acético 10 % (v/v) y lavado dos veces con agua durante 2 min cada vez. La tinción se realizó durante 30 min en disolución de nitrato de plata 0,1 % (p/v) con formaldehído 0,06 % (v/v). Se lavó muy brevemente con agua (5-10 s) antes del revelado. Se reveló a 4 °C con una mezcla compuesta por carbonato de sodio 3 % (p/v), tiosulfato de sodio 0,02 % (p/v) y formaldehído 0,04 % (v/v), hasta la aparición de las bandas (2 a 5 min). La reacción de revelado se detuvo añadiendo disolución de fijación enfriada previamente a 4 °C. En todos los pasos se empleó agua ultrapura y volúmenes de 800 mL.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Debido al elevado contenido de guanina y citocina del genoma del VHC (61 %), se decidió usar el secuenciamiento cíclico, que permite utilizar una pequeña cantidad de muestra (ADN) y una purificación menos exigente. Con este método, sin embargo, es frecuente la necesidad de buscar las condiciones óptimas para cada fragmento a causa de las particularidades de cada uno de ellos.

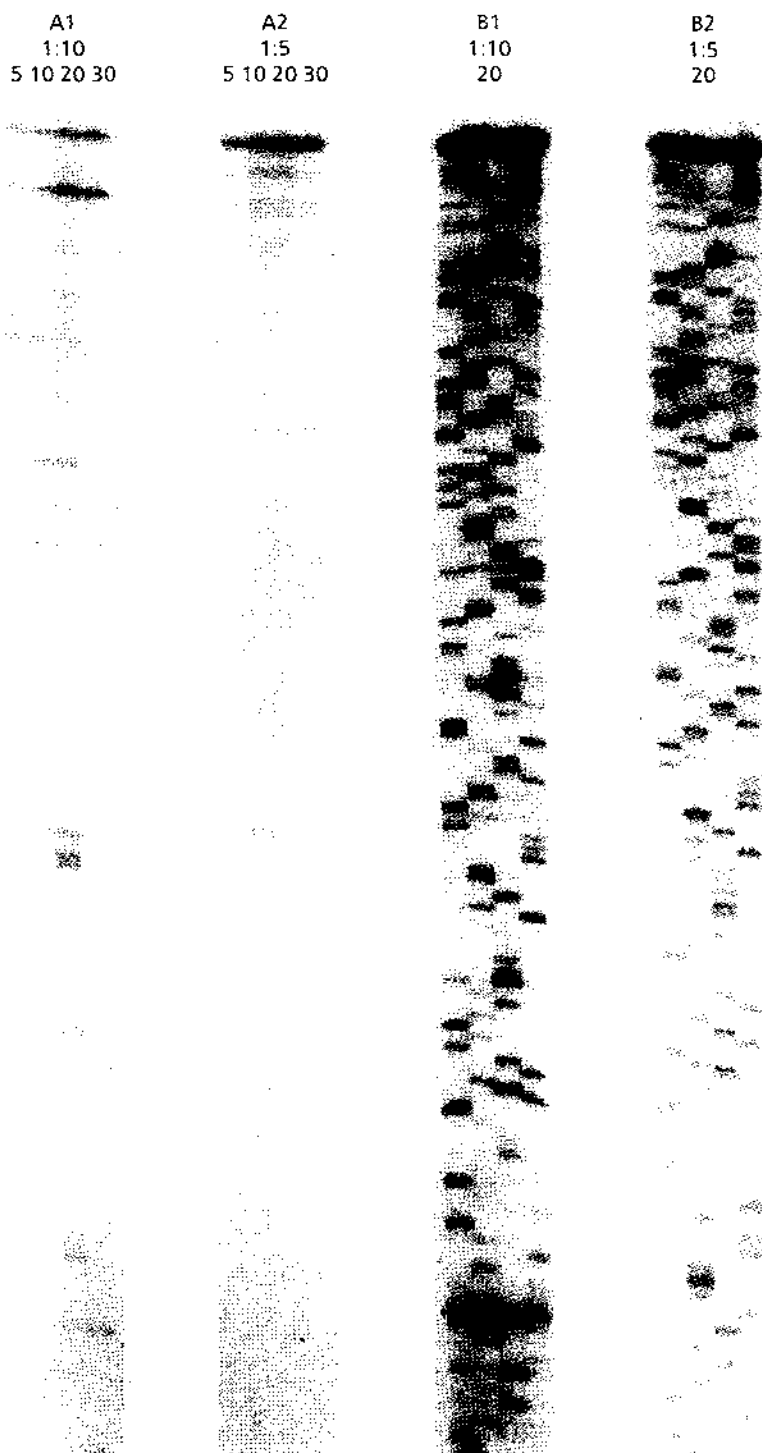
### Optimización del secuenciamiento

Tres magnitudes definen una condición de secuenciamiento cíclico: la relación molar molde:cebador, el número de ciclos y el perfil cíclico de temperaturas (desnaturalización, hibridación y extensión). El método más preciso para ajustar una condición de secuencia es empírico: es la propia reacción de secuencia, pero el procedimiento se hace impracticable por el gran número de variantes a analizar. Mediante reacciones típicas, pero omitiendo los ddNTP, se evaluó, al mismo tiempo, la relación molar molde:cebador y el número de ciclos más apropiado, fijando solamente el perfil cíclico de temperaturas adecuado a las características del cebador utilizado.

Al estudiarse diferentes condiciones de secuenciamiento para el producto de la PCR de 229 pb de la región 5'NT del VHC, se comprobó que de las variantes ensayadas la mejor secuencia (B2) se obtiene en las condiciones para las cuales no existen paradas inespecíficas de la

polimerasa, causadas por las estructuras secundarias y la hibridación de las cadenas complementarias del molde durante la L-PCR (A2) que corresponden a la relación molar 1:5 y 20 ciclos (Fig. 2). En las condiciones

de relación molar 1:5 y 5 ciclos, no se realizó secuencia por la débil señal que aparecía en la zona superior del gel, lo que denotaba una incompleta extensión de los cebadores. Además, se concluyó, que con el



**Fig. 2.** Optimización de las condiciones de secuenciamiento directo de la PCR del fragmento de 229 pb de la región 5'NT del VHC. A1 y A2 son la L-PCR con relación molar molde:cebador 1:10 (0,15:1,5 pmol) y 1:5 (0,3:1,5 pmol) respectivamente, ensayadas a 5, 10, 20 y 30 ciclos. B1 y B2 reacciones de secuencia con relación molar molde:cebador 1:5 y 20 ciclos de la L-PCR y con 1:10 de relación molar y 20 ciclos respectivamente. El cebador usado [5'-TCGCAAGCACCTATCAGGCAG-3'] fue marcado con <sup>32</sup>P y el orden de aplicación en la secuencia fue TCGA.

cebador utilizado no es necesario realizar la secuencia en 30 ciclos debido a que a los 20, ya tiene lugar su agotamiento.

Así, se determinó que las condiciones óptimas de secuenciación son aquellas para las cuales se logra la extensión completa del cebador sobre el molde y como consecuencia, resultados más legibles y confiables en la secuencia directa.

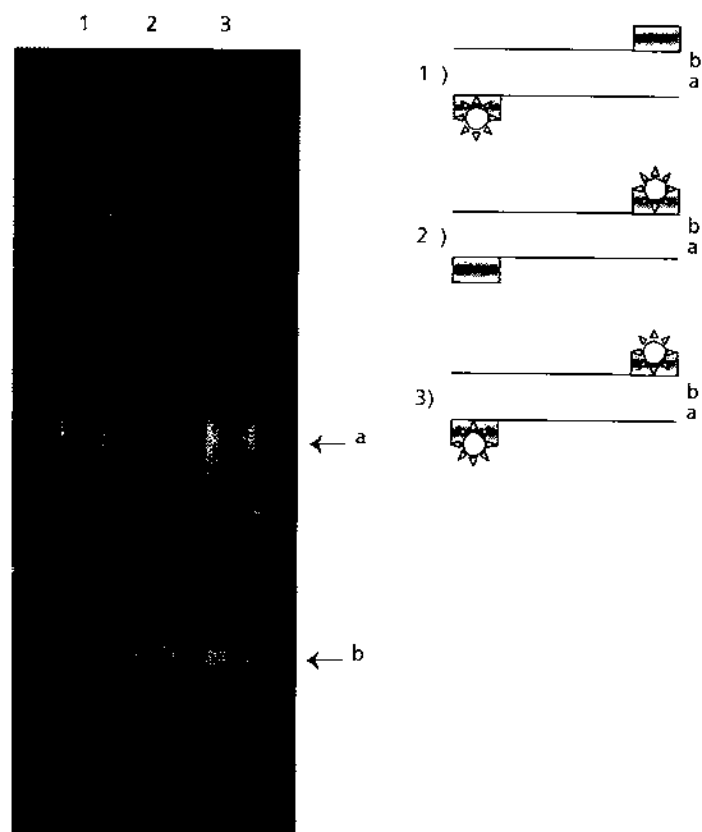
### PCSC

La baja heterogeneidad demostrada entre las regiones 5' NT del VHC de aislamientos de diferentes zonas del país sugirió el uso de una técnica más sencilla y rápida de búsqueda de variantes genómicas del VHC. El experimento de PCSC con cebadores de PCR radiactivos demostró la aplicabilidad de este método al comprobarse la separación de las cadenas simples durante la electroforesis (Fig. 3). En el carril 3, se visualizaron ambas cadenas (como ocurre durante la tinción con nitrato de plata) y se observó que las bandas obtenidas se correspondían con las cadenas simples de los carriles 1 y 2.

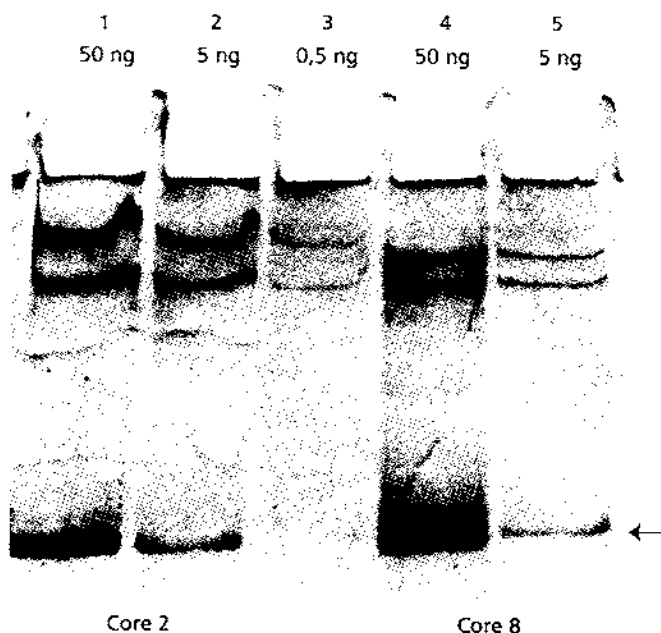
El análisis de PCSC no radiactivo de los clones Core 2 y 8 que se diferencian en sólo una base (determinado por secuencia "clásica" de los plasmidios) demostró que en las condiciones descritas el método es capaz de detectar una mutación puntual: las bandas de ADN renaturalizado migran exclusivamente según su talla, que es la misma; en cambio las cadenas simples migran de manera diferente. Esto demuestra que la diferencia en la migración de las cadenas simples se debe sólo a cambios en su secuencia y no en el número de sus nucleótidos (talla).

La resolución lograda con el PCSC no radiactivo fue superior a la que se obtiene normalmente con la radiografía de un gel (Figuras 4 y 5). Esta ventaja unida a las de una adecuada sensibilidad, rapidez y sencillez de la ejecución del revelado con nitrato de plata en lugar de radiactividad, que requiere de las precauciones propias del trabajo con isótopos radiactivos, hacen del PCSC no radiactivo una técnica muy ventajosa para la mayoría de los laboratorios.

El PCSC de las muestras con idéntica secuencia consenso demostró, como se esperaba, un mismo patrón de migración de las cadenas simples para todas ellas (Fig. 5); sin embargo, en algunas se detectó la presencia de bandas adicionales de



**Fig. 3.** Variante radiactiva del PCSC. Durante la reamplificación (PCR de marcaje), se usó el cebador directo radiactivo (1), el inverso (2), o ambos (3), con lo que se logró la visualización selectiva de cada una de las cadenas simples del ADN (o de ambas).



**Fig. 4.** Gel de PCSC teñido con nitrato de plata. Líneas 1, 2 y 3 -Clon Core 2 en cantidades de 50, 5 y 0,5 ng respectivamente, líneas 4 y 5 -Clon Core 8, 50 y 5 ng respectivamente. Las secuencias de los fragmentos Core 2 y 8 se diferencian en sólo una base. Aparecen señaladas, para ambos clones, las bandas de ADN renaturalizado que migran exclusivamente según su talla, apreciándose que es la misma. En cambio, las cadenas simples migran de manera diferente. Esto demuestra que la diferencia en la migración de las cadenas simples se debe sólo a cambios en su secuencia y no en el número de nucleótidos (talla).

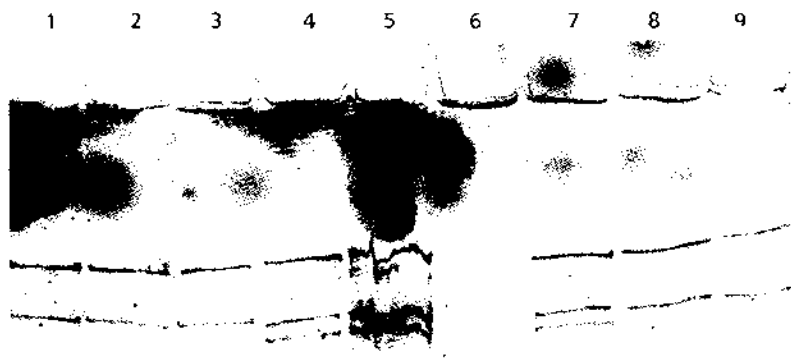


Fig. 5. Gel de PCSC teñido con nitrato plata donde aparecen algunas de las muestras de idéntica secuencia consenso. Se observa el mismo patrón "principal" en todas, pero en algunas aparecen bandas minoritarias adicionales.

menor intensidad. Esto se explica por la posible coexistencia de dos o más variantes genómicas en un mismo aislamiento, manteniéndose una de ellas como mayoritaria.

## CONCLUSIONES

Se demostró que la mejor secuencia directa de productos de la PCR se obtiene en las condiciones para las cuales no aparecen paradas inespecíficas en la L-PCR, por lo que este método se propone para la optimización de la secuencia directa de PCR. Su aplicación al secuenciamiento directo de los fragmentos de ADN de 229 pb, de la región 5'NT del VHC, permitió obtener una buena proporción señal:ruido y por tanto, buena legibilidad de los geles de secuencia.

Se demostró la utilidad del PCSC, técnica sencilla, que permite obtener información acerca de la complejidad de la cuasi-especie del VHC, al detectar secuencias minoritarias que no se hacen visibles por secuenciamiento directo por visualizarse sólo la secuencia consenso.

Siguiendo una variante que evita reamplificar el producto de la PCR usando cebadores radiactivos y sustituye la radiografía de un gel grande por la tinción con nitrato de plata de un gel pequeño, se obtiene una resolución mucho mayor y una sensibilidad apropiada (~0,1 ng/banda). Esta técnica permite agilizar considerablemente el estudio de las variantes genómicas circulantes: los resultados se obtienen a sólo unas

horas después de terminada la PCR, siendo posible procesar aproximadamente 20 muestras en un mismo gel. Resultan innecesarios además, las precauciones y los medios propios del trabajo con radiactividad y se requiere una purificación menos exigente del producto de la PCR, evitándose así nuevas reacciones y otras manipulaciones complicadas, lo que trae asociado una disminución en la frecuencia de repeticiones debidas a errores.

Con el empleo del PCSC, el uso de la secuenciación se puede limitar a aquellos aislamientos que tengan un patrón diferente (nuevo), los cuales pudieran ser incluidos en geles sucesivos como identificadores de esas "nuevas" variantes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alter H. To C or not to C: These are the questions. *Blood*, 85, 1681, 1995.
2. Farci P, Alter H.J., Wong D. Long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 325, 98, 1991.
3. Alter M.J., Margolis H.S., Krawczynski K. The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 327, 1899, 1992.
4. Wang Y.M., Ray S.C., Laeyendecker O., Ticehurst J.R., Thomas D.L. Assessment of hepatitis C virus sequence complexity by electrophoretic mobilities of both single- and double-stranded DNAs. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2982, 1998.
5. Choo Q.-L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., and Houghton M. Isolation of cDNA Clone Derived from

- a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science*, 244, 359, 1989.
6. Stuyver L., Wyseur A., Van Arnhem W., Hernández F., Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 67, 4665, 1996.
7. Bukh J., et al. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 4942, 1992.
8. García C., Barro M., Viña A., García O., Guerra I., Padrón G. and Morales J. Predominance of type 1b hepatitis C virus infection in Cuban carriers. *Biología Aplicada*, 12, 71, 1995.
9. Bevan I.S., Rapley R. and Walker M.R. Sequencing of PCR-amplified DNA. *PCR Methods and Applications*, 1, 222, 1992.
10. Okamoto H., Sugiyama Y., Okada S., Kurai K., Akahane Y., Sugai Y., Tanaka T., Sato K., Tsuda F., Miyakawa Y., et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J. Gen. Virol.*, 73, 673, 1992.
11. Stuyler L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborght B., Van Heaverswyn H., Maertens G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.*, 74, 1093, 1993.
12. Nakao T., Enomoto N., Takada A. and Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J. Gen. Virol.*, 72, 2105, 1991.
13. Orita M., Suzuki Y., Sekita T., Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5, 874, 1987.
14. Dockhorn-Dworniczak B., Dworniczak B., Brömmelkamp L., Büllers J., Horst J. and Böcker W.W. Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. *Nucleic Acids Research*, 19, 2500, 1991.
15. Morales J., Barro M., Viña A., Gómez C., García O., García C. Presence of hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic Non-A, Non-B hepatitis in Cuba detected by PCR. *Biología Aplicada*, 12, 86, 1995.
16. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156, 1987.
17. Promega Technical Bulletin, DNA Silver Staining System, 1993.