ITEA (2001), Vol. 97A N.° 1, 11-28

APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE LA GENÉTICA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS DE LOS RUMIANTES DOMÉSTICOS. REVISIÓN

A. Barroso, S. Dunner, J. Cañón

Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria
Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, España
e-mail: dunner@eucmax.sim.ucm.es
Internet: www.ucm.es/info/genetvet

RESUMEN

Hasta hace una década, los estudios de polimorfismo genético de las proteínas lácteas se basaban en la caracterización de la estructura primaria de las mismas, con lo que el espectro de análisis se reducía a hembras adultas en fase de lactación, amén de otras limitaciones en cuanto a la sensibilidad de detección. Desde entonces, el rápido desarrollo de las técnicas moleculares del ADN ha hecho posible el conocimiento del genotipo de las lactoproteínas en ambos sexos y a cualquier edad, aumentando en gran medida su valor potencial como herramientas de selección. Así, el genotipado de los machos de inseminación artificial integrados en programas de mejora, de interés creciente merced a las diferencias significativas en cuanto a las características físico-químicas y tecnológicas de la leche asociadas a determinadas variantes, es posible sin necesidad de recurrir a la información indirecta proporcionada por ascendientes, apareamientos e hijas.

En este trabajo, se revisan diversas técnicas de detección de mutaciones más sobresalientes, desde los procedimientos iniciales de tipificación molecular basados en la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción y posterior hibridación con una sonda específica –técnica de *Southern*–, hasta los métodos basados en la amplificación previa de un fragmento específico del genoma por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). La revisión se circunscribe a los métodos que ya han sido aplicados al campo del polimorfismo genético de las proteínas lácteas de las tres especies de rumiantes domésticos: vaca (*Bos taurus*), cabra (*Capra hircus*) y oveja (*Ovis aries*).

Palabras clave: Lactoproteínas, Detección de Mutaciones, Southern, PCR, SSCP, ARMS, ASO, RFLPs, ACRS.

SUMMARY

APPLICATIONS OF MOLECULAR GENETIC TECHNIQUES FOR THE STUDY OF GENETIC POLYMORPHISM OF MILK PROTEINS IN DOMESTIC RUMINANTS. A REVIEW

Until last decade, genetic polymorphism screenings on lactoproteins relied on direct characterisation of their primary structures, restricting the analysis spectrum to adult lactating females, as well as other limitations concerning sensitivity of detection.

The fast development of DNA molecular techniques since then has made possible the identification of milk protein genotypes in both sexes at birth, considerably increasing their potential value as an aid for genetic selection. Genotyping of A.I. sires integrated in breeding programs, of growing interest due to significant differences in physico-chemical and technological properties of milk associated with certain variants, is now feasible, circumventing the need of indirect information as deduced from ancestors, mates and daughters.

In this work, several mutation detection techniques are reviewed, from initial molecular typing protocols based on restriction enzyme digestion of genomic DNA coupled to hybridisation with specific probes –the *Southern* technique–, to those procedures based on previous amplification of a specific genomic segment through Polymerase Chain Reaction (PCR). Here, we focuse on methods already applied to the field of genetic polymorphism of lactoproteins in domestic ruminants: cow (*Bos taurus*), goat (*Capra hircus*), and sheep (*Ovis aries*).

Key words: Lactoproteins, Mutation Detection, Southern, PCR, SSCP, ARMS, ASO, RFLPs, ACRS.

El gran desarrollo de las técnicas moleculares de detección de mutaciones durante la última década ha hecho posible tanto la identificación de un gran número de nuevos genes causantes de enfermedad como el descubrimiento de mutaciones nuevas, así como la agilización en el genotipado de las ya conocidas, especialmente importante en los estudios de correlación estructura-función. En la actualidad, el esfuerzo investigador no se centra exclusivamente en aumentar la sensibilidad de detección sino también en los aspectos de procesabilidad de un gran número de muestras, rapidez y economía, de lo que se benefician notablemente los campos del diagnóstico y de la genética de poblaciones.

La utilización de los procedimientos de la genética molecular en el mundo del polimorfismo genético de las proteínas lácteas se fundamenta en el hecho de que todas las variantes genéticas de las mismas (revisadas en BARROSO *et al.*, 1999a) tienen su correspondiente mutación en el ADN genómico, lo que explica su modelo mendeliano de herencia. Estas técnicas han de ser muy sensibles, pues gran parte de las variantes difieren entre sí por sustituciones puntuales –transiciones o transversiones– sobre la región codificante, que dan lugar a diversas sustituciones aminoacídicas. En casos muy concretos, las mutaciones están situadas en regiones exónicas no traducidas (como ocurre con la variante E de la caseína α_{s1} caprina, que presenta una inserción de 457 pares de bases (pb) en el exón XIX –JANSÀ *et al.*, 1994–, amén de varias sustituciones aminoacídicas con respecto a A, B y C –BRIGNON *et al.*, 1989, 1990–). O en los intrones, bien sobre las secuencias de procesamiento de los mismos (*splice sites*), como ocurre con la variante A de la caseína α_{s1} bovina (MOHR *et al.*, 1994); bien fuera de ellas, caso de la variante F de la caseína α_{s1} caprina (LEROUX *et al.*, 1992).

Es conveniente aclarar, por lo tanto, que esta revisión no se va a centrar en las técnicas que trabajan sobre la propia proteína, sean electroforesis clásicas (es decir, aquéllas cuyo criterio de separación se basa en las diferencias de carga neta de la proteína), isoelectroenfoques (tipo especial de electroforesis en el que las proteínas migran a través de un gradiente de pH hasta alcanzar su punto isoeléctrico –pI–) o perfiles cromatográficos (especialmente, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución –HPLC–). Su enorme contribución al campo del polimorfismo genético de las lactoproteínas está fuera de toda duda y de todas ellas existen excelentes revisiones (vgr. SEIBERT *et al.*, 1985; JAUBERT y MARTIN, 1992; NG-KWAI-HANG y GROSCLAUDE, 1992).

Técnica de Southern Blot

La técnica de *Southern blot* (SOUTHERN, 1975) consiste, en síntesis, en digerir el ADN con alguna de las enzimas de restricción bacterianas que cortan los ácidos nucleicos en secuencias específicas, normalmente palíndromos de 4 a 6 pb. Los fragmentos resultantes se someten a una separación electroforética en agarosa, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de nylon y se hibridan con una *sonda* específica del gen bajo estudio marcada radiactiva o enzimáticamente. Bajo condiciones de temperatura y concentración salina adecuadas, la sonda se une sólo a aquellos fragmentos de restricción que son perfectamente complementarios, visualizables por métodos autorradiográficos o colorimétricos (figura 1).

Los polimorfismos que se pueden detectar por Southern son grandes inserciones o deleciones, o bien mutaciones puntuales que alteren alguna diana de restricción de la enzima utilizada en los fragmentos complementarios a la sonda. Esta técnica tiene la gran ventaja de que no requiere un conocimiento detallado ni de la estructura ni de la secuencia del gen, por lo que se utilizó con mucha frecuencia antes del advenimiento de las técnicas basadas en producto amplificado, que veremos posteriormente, incluido el campo de los genes de las lactoproteínas (cuadro 1). Sin embargo, tiene el enorme inconveniente de que requiere ADN de muy buena calidad y en grandes cantidades (en torno a los 10 µg., por los 10 ng. necesarios para las técnicas basadas en la PCR).

Técnicas moleculares sobre producto amplificado

El espectro de mutaciones genómicas abarca desde grandes reorganizaciones cromosómicas hasta alteraciones de un solo nucleótido, por lo que su estudio se ha de abordar desde perspectivas diferentes. Los métodos de detección de alteraciones a gran escala (como la técnica de *Southern*) no son apropiados para el estudio de mutaciones puntuales, pero tampoco es económicamente viable la secuenciación de grandes segmentos de ADN en un elevado número de individuos si no se tiene ningún conocimiento previo de la existencia y localización de mutaciones de interés.

Las técnicas que se van a comentar a continuación sirven, pues, para seleccionar las muestras anómalas candidatas para su posterior secuenciación. Todas ellas tienen como punto de partida una región discreta de ADN previamente amplificada de forma exponencial por medio de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa) (SAIKI *et al.*, 1985;

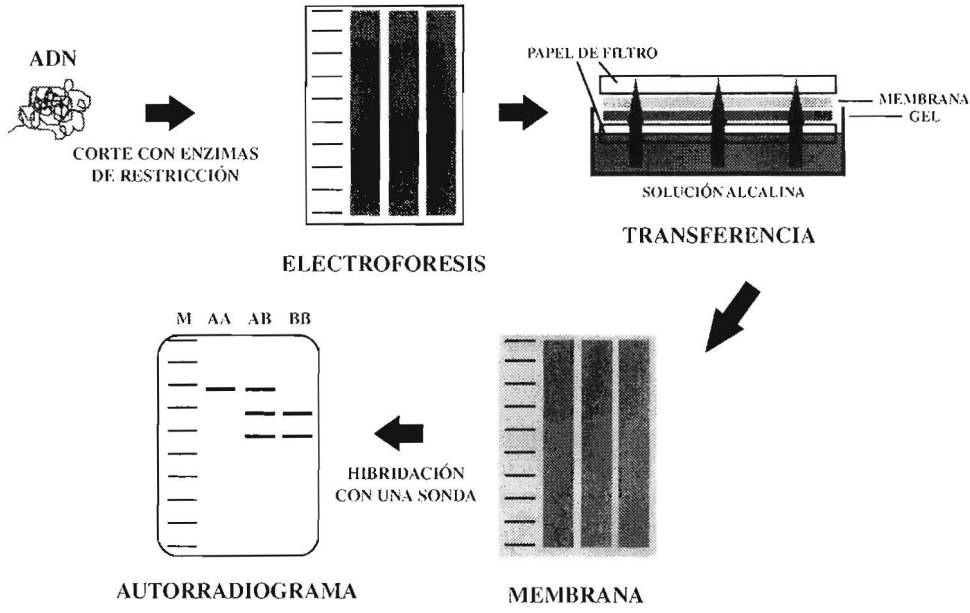


Figura 1. Representación esquemática de la técnica de Southern.
Figure 1. Schematic representation of the Southern technique.

MULLIS y FALOONA, 1987). La amplificación previa al análisis de mutaciones, además de delimitar la zona de interés, nos permite partir de cantidades mínimas de ADN, que puede incluso estar muy degradado.

Durante los últimos años se han publicado una gran cantidad de estas técnicas "PCR dependientes" (revisadas en ROSSITER y CASKEY, 1990; DIANZANI *et al.*, 1993; GROMPE, 1993; LESSA y APPLEBAUM, 1993; LANDEGREN, 1996; COTTON, 1997). En esta revisión, nos centraremos exclusivamente en aquéllas que se han utilizado en el genotipado de las proteínas lácteas.

1. **SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphisms)** (ORITA *et al.*, 1989a,b)

El fundamento de esta técnica radica en las estructuras secundarias específicas de secuencia (*confórmeros*) que adquiere el ADN de cadena simple, de tal forma que dos moléculas que se distingan por una diferencia puntual pueden formar confórmeros diferentes, que migran de distinta manera en poliacrilamida no desnaturalizante (figura 2). Inicialmente diseñada para la búsqueda de mutaciones sobre ADN genómico (ORITA *et al.*, 1989a), los mismos autores la adaptaron a fragmentos PCR (ORITA *et al.*, 1989b).

Cuadro 1. Protocolos Southern publicados para el estudio y caracterización de los genes de las proteínas lácteas. Se indican las enzimas que dan lugar a patrones polimórficos, así como su correlación –cuando se conoce– con variantes genéticas

Table 1. Southern protocols published for the study and characterisation of the lactoprotein genes. Enzymes that give rise to polymorphic patterns are shown, as well as their correlation –whenever known– with genetic variants

Proteína	Especie	Enzimas	Variantes	Bibliografía
Caseína αs_1	BOVINA	*Bgl*II/*Eco*RI	B/C	RANDO *et al.*, 1990
		*Eco*RI/*Hind*III/*Msp*I/*Taq*I	–	THREADGILL y WOMACK, 1990
	CAPRINA	*Pst*I/*Taq*I/*Rsa*I	A/B-C/D-F/E/0	LEROUX *et al.*, 1990
	OVINA	*Bgl*I/*Rsa*I/*Taq*I	–	LEVÉZIEL *et al.*, 1991
		*Eco*RI/*Taq*I	–	DI GREGORIO *et al.*, 1991
		*Eco*RI/*Taq*I	–	ORDÁS *et al.*, 1997
Caseína α_{s2}	BOVINA	*Msp*I/*Taq*I	–	THREADGILL y WOMACK, 1990
	CAPRINA	*Mse*I	–	COSENZA *et al.*, 1998
	OVINA	*Pvu*II	–	LEVÉZIEL *et al.*, 1991
		*Eco*RV	–	DI GREGORIO *et al.*, 1991
		*Eco*RI	–	PHUA *et al.*, 1992
		*Eco*RV	–	ORDÁS *et al.*, 1997
β-caseína	BOVINA	*Hin*dIII/*Msp*I/*Taq*I	–	THREADGILL y WOMACK, 1990
	CAPRINA	*Bal*I	–	PAPPALARDO *et al.*, 1996
	OVINA	*Bgl*I/*Rsa*I/*Taq*I/*Hin*dIII	–	LEVÉZIEL *et al.*, 1991
		*Eco*RV/*Hin*dIII/*Taq*I	–	DI GREGORIO *et al.*, 1991
		*Hin*dIII	–	ORDÁS *et al.*, 1997
k-caseína	BOVINA	*Hin*dIII/*Taq*I	A/B	LEVÉZIEL *et al.*, 1988
		*Pst*I	A/B	RANDO *et al.*, 1988
		*Hin*dIII/*Hin*fI	A/B	ROGNE *et al.*, 1989
		*Hin*dIII/*Taq*I	A/B	DAMIANI *et al.*, 1990
		*Hin*dIII/*Msp*I/*Taq*I	A/B (*Hin*dIII/*Taq*I)	THREADGILL y WOMACK, 1990
	OVINA	*Pvu*II	–	LEVÉZIEL *et al.*, 1991
		*Hin*dIII/*Pvu*II/*Pst*I	–	DI GREGORIO *et al.*, 1991
		*Hin*dIII/*Pvu*II/*Pst*I	–	ORDÁS *et al.*, 1997
α-lactoalbúmina	BOVINA	*Eco*RI/*Hin*dIII/*Msp*I/*Taq*I	A/B (*Msp*I)	THREADGILL y WOMACK, 1990
b-lactoglobulina	BOVINA	*Hae*III	A/B	LIEN *et al.*, 1990
		*Hph*I/*Hae*III	A/B	TEE *et al.*, 1990
		*Msp*I/*Taq*I	–	THREADGILL y WOMACK, 1990

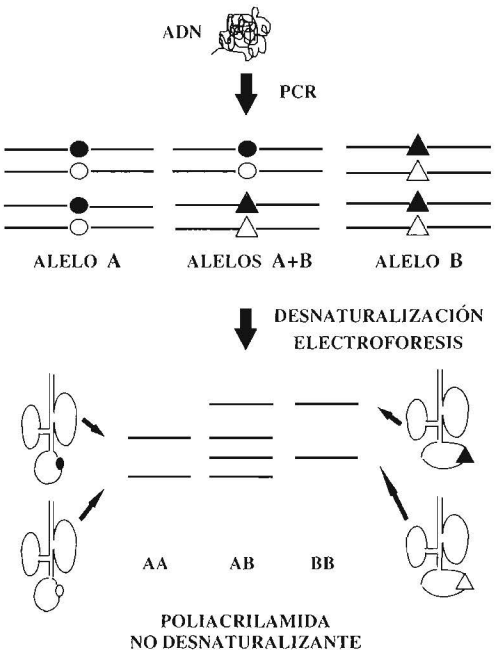


Figura 2. Representación esquemática de la técnica de SSCP.
Figure 2. Schematic representation of the SSCP technique.

Por tratarse de ADN desnaturalizado, los patrones se duplican con respecto al ADN de cadena doble, de tal manera que los homocigotos presentan típicamente dos bandas y los heterocigotos, cuatro. Es, con mucho, la técnica de búsqueda de mutaciones más extendida (con casi 3.000 citas en MEDLINE), por su sencillez, y ha sido utilizada con éxito en campos tan variados como la detección de mutaciones responsables de enfermedades (DEMERS *et al.*, 1990) y cánceres hereditarios (HOWE *et al.*, 1998), el diagnóstico de cánceres somáticos (KURVINEN *et al.*, 1995), el mapeo de genes (HARLIZIUS *et al.*, 1996), el análisis de ligamiento (HARUMI *et al.*, 1995), la genética de poblaciones (ORTÍ *et al.*, 1997) o el sexado molecular de aves (CORTÉS *et al.*, 1999).

Es, con todo, una técnica limitada, pues no posiciona las mutaciones dentro de los fragmentos analizados. Además, su optimización es puramente empírica, de forma que la sensibilidad para la detección de mutaciones en una región determinada de ADN se ha de verificar por ensayo-error de diferentes parámetros. Entre los más comúnmente utilizados destacan: la fuerza iónica de la solución tampón, la adición o no de glicerol a la matriz del gel, la temperatura, el porcentaje de poliacrilamida, el tamaño del fragmento a analizar, con un óptimo en torno a los 150-250 pb (SEKIYA, 1993; SHEFFIELD *et al.*, 1993), o la relación acrilamida:bisacrilamida.

La técnica de SSCP se ha utilizado también con éxito para el genotipado de polimorfismos genéticos ya conocidos de las

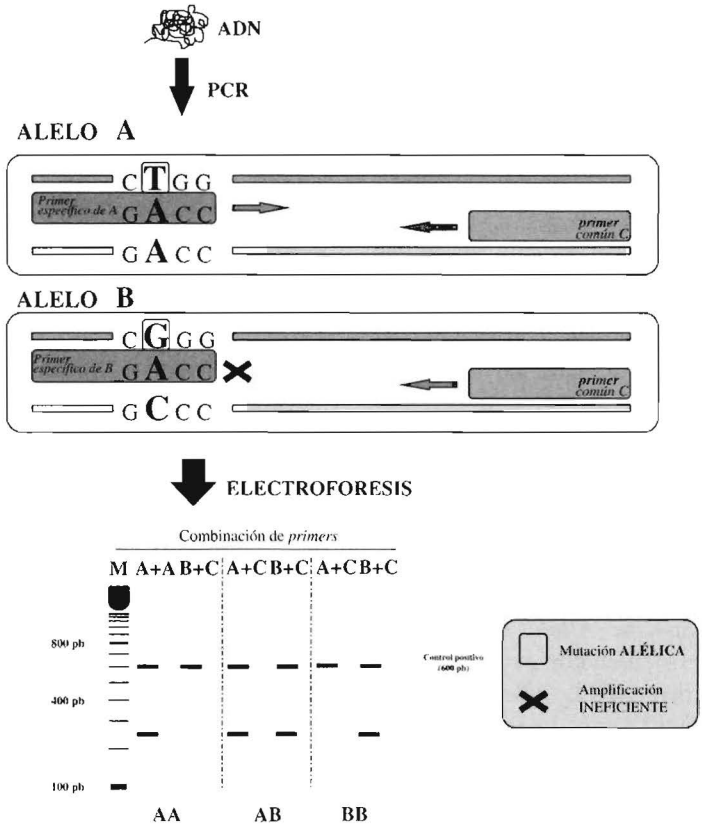


Figura 3. Representación esquemática de la técnica de ARMS. Tan sólo se muestra el primer específico del alelo A.

Figure 3. Schematic representation of the ARMS technique. The A allele specific primer is shown.

proteínas lácteas de la especie bovina, en concreto las variantes A^1, A^2, A^3, B (BARROSO *et al.*, 1999b) y C (BARROSO *et al.*, 1999c) de la β-caseína, la variante D de la caseína α_{s1} (PRINZENBERG y ERHARDT, 1997a) y las variantes A, B, C, E (BARROSO *et al.*, 1997, 1998), F y G (PRINZENBERG *et al.*, 1999) de la *k*-caseína.

2. **ARMS (Amplification Refractory Mutation System)** *(*NEWTON *et al., 1989)/* **ASA (Allele Specific Amplification)** *(*OKAYAMA *et al., 1989)/* **PASA (PCR Amplification of Specific Alleles)** *(*SOMMER *et al., 1989)/* **AS-PCR (Allele Specific-PCR)** (WU *et al.*, 1989)

Esta técnica, descrita por cuatro grupos de investigación el mismo año, no es sino una modificación de la reacción de amplificación convencional en la que uno de los dos *primers* se diseña de tal forma que incluya en o cerca de su extremo 3' la mutación característica del alelo a detectar, lo que favorece su amplificación *preferencial* (figura 3). Dado que el genotipado es por presencia-ausencia, es necesario en todos los casos coamplificar un segmento

control con el fin de distinguir los falsos negativos provocados por fallos en la reacción de PCR de las reacciones de amplificación ineficientes. De esta forma, se pueden detectar sustituciones o inserciones/deleciones de pequeño tamaño, o conocer la fase de ligamiento de loci cercanos en ausencia de parientes por medio de un doble ensayo (*double* PASA –SARKAR y SOMMER, 1991–).

Los protocolos iniciales de la técnica hacían necesario duplicar las reacciones por muestra (figura 3). Mejoras posteriores permiten el genotipado simultáneo de dos alelos en una única reacción utilizando *primers* alelo-específicos de diferente longitud, bien perfectamente complementarios al ADN molde (PAMSA: *PCR Amplification of Multiple Specific Alleles* –DUTTON y SOMMER, 1991–), bien con extremos 5' no complementarios (ADPL: *Allele Discrimination by Primer Length* –LI *et al.*, 1990–).

Se trata de una técnica rápida, automatizable y altamente reproducible, siempre y cuando se diseñen correctamente los *primers* alelo-específicos (SOMMER *et al.*, 1992) y no se utilicen en las reacciones de amplificación ADN polimerasas con actividad 3' → 5' exonucleasa. Es, además, muy sensible, con un umbral de detección del 2,5% (esto es, un alelo mutante por cada 40 copias de alelo salvaje –Sommer *et al.*, 1989–). Y, asimismo, relativamente económica, teniendo en cuenta que se evita el uso de endonucleasas de restricción, aunque es necesario diseñar tantos *primers* como alelos a detectar.

En el cuadro 2 se resumen los trabajos publicados hasta la fecha para el genotipado de las proteínas lácteas por medio de esta técnica.

3. **PCR-S/ASO (PCR-Sequence/Allele Specific Oligonucleotides)** (SAIKI *et al.*, 1986; IITIÄ *et al.*, 1994)

Cuadro 2. Protocolos AS-PCR publicados para la detección de variantes genéticas de las lactoproteínas

Table 2. AS-PCR protocols published for detection of genetic variants of lactoproteins

Proteína	Especie	Variantes detectadas	Bibliografía
caseína αs_1	BOVINA	B/C	David y Deutch, 1992
		B/C	SCHLEE y ROTMANN, 1992a
		F	PRINZENBERG *et al.*, 1998
	OVINA	D (*Welsh*)	RAMUNNO *et al.*, 1997
k-caseína	BOVINA	A/B/E (ADPL)	LINDERSSON *et al.*, 1995
β-caseína	BOVINA	B (*Bidirectional* AS-PCR)	DAMIANI *et al.*, 1992
		$A^1/A^2/B/C$	SCHLEE y ROTMANN, 1992b
		$A^1/A^2/A^3/B$ (ADPL)	LINDERSSON *et al.*, 1995
β-lactoglobulina	BOVINA	A/B	SCHLEE y ROTMANN, 1992b
		A/B (ADPL)	LINDERSSON *et al.*, 1995

Esta técnica consiste en *hibridar* oligonucleótidos específicos o *sondas* de cada alelo que se pretende detectar a secuencias diana previamente amplificadas por PCR, bajo condiciones suficientemente restrictivas como para que una diferencia puntual entre el oligonucleótido y la cadena molde evite tal unión (figura 4). La hibridación de oligonucleótidos para distinguir variantes genéticas es anterior al advenimiento de la PCR; sin embargo, el método se universalizó cuando fue posible aumentar de forma exponencial el número de copias de la secuencia diana, dada la enorme dificultad que entrañaba la unión específica de sondas a secuencias de copia única en genomas complejos (KIDD *et al.*, 1983).

Se distinguen tres variantes de esta técnica, según qué componente de la reacción permanezca en solución, la sonda (*Forward Dot Blot*), el producto PCR (*Reverse Dot Blot*), o ambos (*Liquid Phase Hybridization*) (GYLLENSTEIN y ALLEN, 1996).

En el campo de las proteínas lácteas, se han publicado protocolos de genotipado

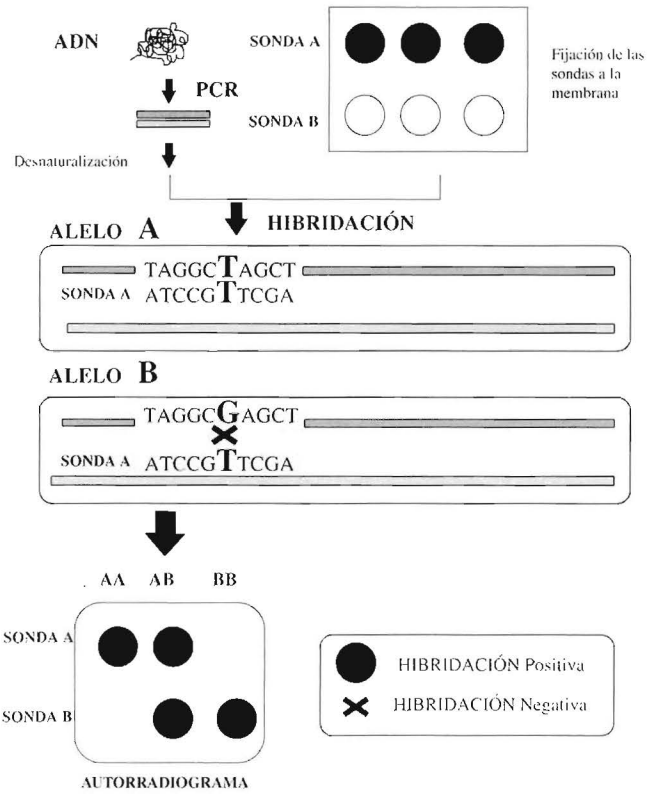


Figura 4. Representación esquemática de la técnica de PCR-SSO, variante Reverse Dot Blot. Sólo se muestra la sonda específica del alelo A.

Figure 4. Schematic representation of the PCR-SSO technique, Reverse Dot Blot variant. The A allele specific probe is shown.

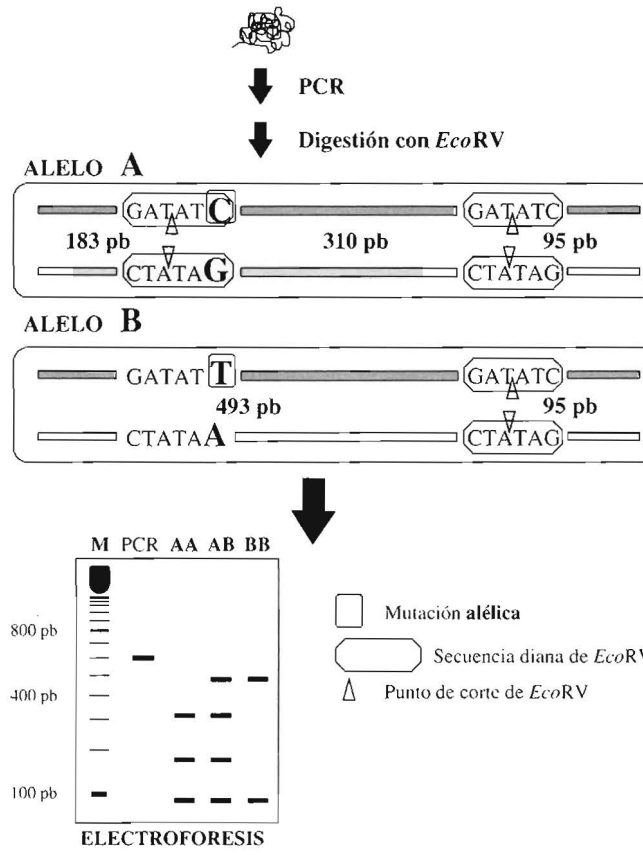


Figura 5. Representación esquemática de la técnica de PCR-RFLPs para un producto PCR de 588 pb.
Figure 5. Schematic representation of the PCR-RFPL technique for a 588bp PCR product.

por PCR-SSO para las variantes A^1, A^2, A^3 y B de la β-caseína (PINDER *et al.*, 1991) y A/B de la β-lactoglobulina (JADOT *et al.*, 1992), ambas en la especie bovina.

4. **PCR-RFLPs (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms)** (Saperstain y Nickerson, 1991)

En este caso, a diferencia de lo comentado para la técnica de *Southern*, es el producto PCR y no el ADN genómico el que se somete a una digestión por medio de una o más enzimas de restricción (figura 5). Los fragmentos resultantes se separan electroforéticamente en geles de agarosa o de poliacrilamida.

Se trata de la técnica molecular más universalmente utilizada para el genotipado rutinario de mutaciones conocidas, lo que también es aplicable a las lactoproteínas bovinas (cuadro 3), pues no precisa ni del diseño de *primers* alelo-específicos ni de

Cuadro 3. Protocolos PCR-RFLPs publicados para el genotipado de variantes genéticas de las proteínas lácteas bovinas

Table 3. PCR-RFLP protocols published to genotype genetic variants of bovine lactoproteins

Proteína	Enzimas utilizadas	Variantes	Bibliografía
caseína α_{s1}	MaeIII	C	KOCZAN *et al.*, 1993
caseína α_{s2}	*Mnl*I	A/D	OSTA *et al.*, 1995
k-caseína	*Hin*dIII/*Taq*I	A/B	DENICOURT *et al.*, 1990
	*Hin*fI	A/B	MEDRANO y AGUILAR-CÓRDOVA, 1990a
	*Mbo*II/*Taq*I	A/B	ZADWORNY y KUHNLEIN, 1990
	*Hin*dIII	A/B	PINDER *et al.*, 1991
	*Hin*dIII/*Hin*fI/*Hae*III	A/B/E	SCHLIEBEN *et al.*, 1991
	*Mae*I	C	SCHLEE y ROTMANN, 1992c
	*Pst*I	A/B	ZSOLNAI y FÉSÜS, 1996
	*Hae*III/*Hha*I/*Hin*dIII/*Mae*II	A/B/C/E/F/G	PRINZENBERG *et al.*, 1996
α-lactoalbúmina	*Msp*I	A/B	SCHLEE y ROTMANN, 1992b
β-lactoglobulina	*Hae*III	A/B	MEDRANO y AGUILAR-CÓRDOVA, 1990b
	*Hph*I	A/B	WILKINS y KUYS, 1992
	*Hae*III	A/B	ZHOU *et al.*, 1992

una optimización previa de las condiciones, amén de permitir posicionar las mutaciones dentro de los fragmentos analizados. Entre los pequeños rumiantes, tan sólo se ha aplicado en el genotipado de las variantes ovinas A, B (FEGLINI *et al.*, 1998) y C (PRINZENBERG y ERHARDT, 1999) de la β-lactoglobulina y A/D de la caseína α_{s1} (PILLA *et al.*, 1998).

Sin embargo, además de las limitaciones inherentes a su propia capacidad discriminante –sólo detecta aquellos cambios que crean o destruyen alguna diana de restricción para la/s enzima/s utilizada/s–, su principal inconveniente radica en el elevado coste de las endonucleasas, sobre todo cuando es necesario emplear más de una. Es el caso del genotipado de los alelos A, B, C y E de la *k*-caseína bovina, cuya asignación inequívoca hace necesario digerir con *Hin*fI, *Hae*III y *Mae*II (PRINZENBERG *et al.*, 1996).

5. **ACRS (Amplification Created Restriction Sites)** (HALIASSOS *et al.*, 1989)

Variante de la PCR-RFLPs en la que uno de los *primers* introduce una diana de restricción para una o varias de las variantes a genotipar (figura 6). Su aplicación está indicada en todos aquellos casos en los que las mutaciones a detectar no crean ni destruyen la secuencia diana de una enzima de restricción comercial y, por ende, no es factible un diseño de PCR-RFLPs. Goza de las mismas ventajas que ésta en cuanto a facili-

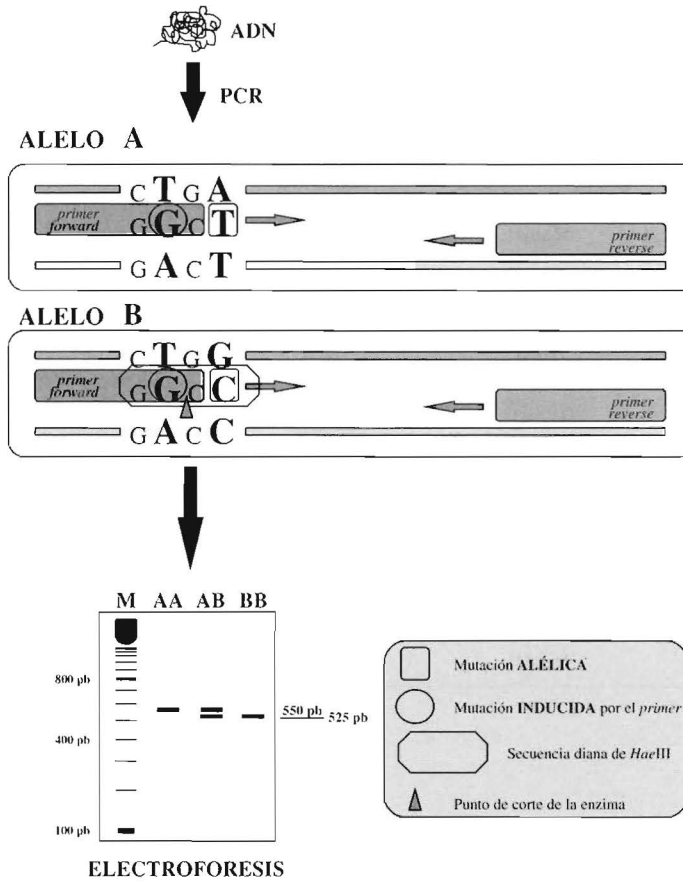


Figura 6. Representación esquemática de la técnica de ACRS para un producto PCR de 550 pb y un primer forward de 26 pb.

Figure 6. Schematic representation of the ACRS technique for a 550 bp PCR product and a forward primer of 26 bp in size.

dad de optimización y visualización. Sin embargo, los costes son aún más elevados que con la técnica anterior, pues es necesario utilizar *primers* muy largos y en mayor número –tantos como alelos a detectar–, así como disponer de agarosas de elevada resolución en geles muy concentrados, merced a la escasa diferencia de tamaño entre los fragmentos de digestión alelo-específicos resultantes –en torno a los 20-25 pb–. Aun así, los genotipados pueden no ser totalmente inequívocos, como ocurre con el método de Lien *et al.* (1992), que no discrimina el alelo A^3 de la β-caseína bovina en heterocigosis de los homocigotos A^3A^3.

En la especie bovina, la técnica de ACRS se ha utilizado para el genotipado de las variantes: A/B (Medrano y Sharrow, 1991), $A^1/A^2/A^3/B$ (Lien *et al.*, 1992) y C (Velmala *et al.*, 1994) de la β-caseína; B/C de la caseína α_{s1} (Lien *et al.*, 1993); C

de la *k*-caseína (Prinzenberg, comunicación personal); y la variante I (PRINZENBERG y ERHARDT, 1997b) de la β-Lg.

Algunos autores (vgr. DIANZANI *et al.*, 1993) proponen como criterio de clasificación de las técnicas de PCR el grado de conocimiento de las mutaciones a detectar: hablaríamos entonces de Técnicas de Búsqueda de Mutaciones Desconocidas (dentro de las cuales se incluyen los SSCPs) y de Técnicas de Diagnóstico de Mutaciones Conocidas (ARMS, PCR-ASO, PCR-RFLPs, ACRS).

Este criterio, sin embargo, se ha desechado en esta revisión por no ser mutuamente excluyente: así, es posible la utilización de protocolos SSCP con fines diagnósticos, como ocurre en la hipertermia maligna de los cerdos (NAKAJIMA *et al.*, 1996) o, tal y como hemos visto, en el caso de las proteínas lácteas (PRINZENBERG y ERHARDT, 1997a; BARROSO *et al.*, 1997, 1998, 1999b, 1999c; PRINZENBERG *et al.*, 1999). Y viceversa en el caso de las técnicas de diagnóstico, como ocurre cuando sometemos un producto de amplificación a la digestión con una batería de enzimas de restricción (PCR-RFLPs) con el fin de encontrar polimorfismos no descritos (KAMINSKI, 1996). Asimismo, es posible aprovechar las ventajas que ambos grupos de métodos ofrecen por medio de protocolos mixtos, como por ejemplo ARMS-SSCP (LO *et al.*, 1992) o PCR-RFLP-SSCP (IWAHANA *et al.*, 1992), de especial interés en sistemas con una gran complejidad alélica.

La elección entre un método u otro de los comentados dependerá de factores tales como las características del gen o los genes bajo estudio y el grado de polimorfismo de los mismos, el número de muestras a procesar, el umbral de sensibilidad necesario o el nivel de preparación técnica del personal disponible, sin olvidar el coste del análisis individual. Existen, incluso, centros de investigación que ofrecen servicios de detección de mutaciones por suscripción (COTTON, 1997).

Finalmente, no hay que olvidar la aplicabilidad de todos estos métodos, no sólo en la búsqueda de mutaciones de las regiones codificantes de los genes, sino también en los promotores, que explicarían diferencias en los niveles de expresión, y en las secuencias intrónicas.

Agradecimientos

Agradecemos la ayuda de la Cooperativa Castellana de Ganaderos en la realización de este trabajo.

Bibliografía

BARROSO, A., DUNNER, S., CAÑÓN, J., 1997. Use of a single-strand conformation polymorphism analysis to perform a simple genotyping of bovine *k*-casein A and B variants. Journal of Dairy Research 64: 535-540.

BARROSO, A., DUNNER, S., CAÑÓN, J., 1998. Technical Note: Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). Journal of Animal Science 76: 1535-1538.

BARROSO, A., DUNNER, S., CAÑÓN, J., 1999. Polimorfismo genético de las lactoproteínas de los rumiantes domésticos - Revisión. ITEA 95A: 143-179.

BARROSO, A., DUNNER, S., CAÑÓN, J., 1999a. Technical Note: use of PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism ananlysis for detection of bovine b-casein variants A^1, A^2, A^3, and B. Journal of Animal Science 77:2629-2632.

BARROSO, A., DUNNER, S., CAÑÓN, J., 1999b. A multiplex PCR-SSCP test to genotype bovine β-casein

alleles A^1, A^2, A^3, B, and C. Animal Genetics 30: 322-323.

BRIGNON, G., MAHÉ, M.F., GROSCLAUDE, F., RIBADEAU-DUMAS, B., 1989. Sequence of caprine α_{s1}-casein and characterization of those of its genetics variants which are synthesized at a high level. α_{s1}-Cn A, B and C. Protein Sequences and Data Analysis 2: 181-188.

BRIGNON, G., MAHÉ, M.F., RIBADEAU-DUMAS, B., MERCIER, J.C., 1990. Two of the three genetic variants which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. European Journal of Biochemistry 193: 237-241.

CORTÉS, O., BARROSO, A., DUNNER, S., 1999. Avian sexing: an optimized protocol using Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 11: 297-299.

COSENZA, G., RANDO, A., LONGOBARDI, E., MASINA, P., RAMUNNO, L., 1998. A *Mse*I RFLP at the goat α_{s2}-casein gene. Animal Genetics 29: 150.

COTTON, R.G.H., 1997. Slowly but surely towards better scanning for mutations. Trends in Genetics 13: 43-46.

DAMIANI, G., FERRETTI, L., ROGNONI, G., SGARAMELLA, V., 1990. Restriction fragment length polymorphism analysis of the *k*-casein locus in cattle. Animal Genetics 21: 107-114.

DAMIANI, G., PILLA, F., LEONE, P., CACCIÒ, S., 1992. Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine β-casein B variant. Animal Genetics 23: 561-566.

DAVID, V.A., DEUTCH, A.H., 1992. Detection of bovine α_{s1}-casein genomic variants using the allele-specific polymerase chain reaction. Animal Genetics 23: 425-429.

DEMERS, S.B., ODELBERG, S.J., FISHER, L.McA., 1990. Identification of a factor IX point mutation using SSCP analysis and direct sequencing. Nucleic Acids Research 18: 5575.

DENICOURT, D., SABOUR, M.P., MCALLISTER, A.J., 1990. Detection of bovine *k*-casein genomic variants by the polymerase chain reaction method. Animal Genetics 21: 215-216.

DI GREGORIO, P., RANDO, A., PIERAGOSTINI, E., MASINA, P., 1991. DNA polymorphism at the casein loci in sheep. Animal Genetics 22: 21-30.

DIANZANI, I., CAMASCHELLA, C., PONZONE, A., COTTON, R.G.H., 1993. Dilemmas and progress in mutation detection. Trends in Genetics 9: 403-405.

DUTTON, C., SOMMER, S.S., 1991. Simultaneous detection of multiple single-base alleles at a polymorphic site. Bio/Techniques 11: 700-702.

FEGLINI, M., PARMA, P., ALEANDRI, R, GREPPI, G.F., ENNE, G., 1998. PCR-RFLP test for direct determination of b-lactoglobulin genotype in sheep. Animal Genetics 29: 473-474.

GROMPE, M., 1993. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. Nature Genetics 5: 111-117.

GYLLENSTEIN, U.B., ALLEN, M., 1996. SSO: Genetic typing with sequence-specific oligonucleotides. En Laboratory Protocols for Mutation Detection, Oxford University Press Inc., New York: 78-81.

HALIASSOS, A., CHOMEL, J.C., TESSON, L., BAUDIS, M., KRUH, J., KAPLAŃ, J.C. *et al.* 1989. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. Nucleic Acids Research 17: 3606.

HARLIZIUS, B., GUÉRIN, G., FERRETTI, L., 1996. IDVGA65 (*D6S29*), a SSCP marker assigned to BTA6 by means of FISH, genetic and synteny mapping. Animal Genetics 27: 379.

HARUMI, T., KIMURA, M., YASUE, H. 1995. Survey on swine SINEs (PRE-1) as candidates for SSCP markers in genetic linkage analysis. Animal Genetics 26: 403-406.

HOWE, J.R., ROTH, S., RINGOLD, J.C., SUMMERS, R.W., JÄRVINEN, J., SISTONEN, P. *et al.* 1998. Mutations in the *SMAD4/DPC4* gene in juvenile polyposis. Science 280: 1086-1088.

IITIÄ, A., MIKOLA, M., GREGERSEN, N., HURSKAINEN, P., LÖVGREN, T., 1994. Detection of a point mutation using short oligonucleotide probes in allele-specific hybridization. Bio/Techniques 17: 566-573.

IWAHANA, H., YOSHIMOTO, K., ITAKURA, M., 1992. Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. Bio/Techniques 12: 64-66.

JADOT, M., LALOUX, J., BURNY, A., KETTMANN, R., 1992. Detection of bovine b-lactoglobulin genomic

variants by the polymerase chain reaction method and molecular hybridization. Animal Genetics 23: 77-79.

JANSÀ, M., LEROUX, C., SÁNCHEZ-BONASTRE, A., MARTIN, P., 1994. Occurrence of a LINE sequence in the 3' UTR of the goat α_{s1}-casein E encoding allele associated with reduced protein synthesis level. Gene 147: 179-187.

JAUBERT, A., MARTIN, P., 1992. Reverse-phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of α_{s1} and α_{s2} genetic variants. Le Lait 72: 235-247.

KAMINSKI, S., 1996. *Dde*I RFLP at the 5' region of bovine kappa-casein gene. Journal of Applied Genetics 37: 173-178.

KIDD, V.J., WALLACE, R.B., ITAKURA, K., WOO, S.L.C., 1983. α_1-Antitripsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. Nature 304: 230-234.

KOCZAN, H.R., HOBOM, G., SEYFERT, H.M., 1993. Characterization of the bovine α_{s1}-casein gene C allele, based on a MaeIII polymorphism. Animal Genetics 24: 74.

KURVINEN, K., HIETANEN, S., SYRJÄNEN, K., SYRJÄNEN, S., 1995. Rapid and effective detection of mutations in the p53 gene using nonradioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique applied on PhastSystem™. Journal of Virological Methods 51: 43-54.

LANDEGREN, U., 1996. Laboratory Protocols for Mutation Detection. Oxford University Press Inc., New York.

LEROUX, C., MARTIN, P., MAHÉ, M.F., LEVÉZIEL, H., MERCIER, J.C., 1990. Restriction fragment length polymorphism identification of goat a_{s1}-casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. Animal Genetics 21: 341-351.

LEROUX, C., MAZURE, N., MARTIN, P,. 1992. Mutations away from splice site recognition sequences might *cis*-modulate alternative splicing of goat a_{s1}-casein transcripts. STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE RELEVANT GENE. The Journal of Biological Chemistry 267: 6147-6157.

LESSA, E.P., Applebaum, G., 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. Molecular Ecology 2: 119-129.

LEVÉZIEL, H., MÉTÉNIER, L., MAHÉ, M.F., CHOPLAIN, J., FURET, J.P., PABOEUF, G. *et al.* 1988. Identification of the two common alleles of the bovine *k*-casein locus by the RFLP technique. using the enzyme HindIII. Genetics, Selection and Evolution 20: 247-254.

LEVÉZIEL, H., METENIER, L., GUERIN, G., CULLEN, P., PROVOT, C., BERTAUD, M. *et al.* 1991. Restriction fragment length polymorphism of ovine casein genes: close linkage between the α_{s1}, α_{s2}, β and *k*-casein loci. *Animal Genetics* 22: 1-10.

LI, H., CUI, X., ARNHEIM, N., 1990. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87: 4580-4584.

LIEN, S, ALESTRÖM, P., STEINE, T., LANGSRUD, T., VEGARUD, G., ROGNE, S., 1990. A method for β-lactoglobulin genotyping of cattle. Livestock Production Science 25: 173-176.

LIEN, S., ALESTRÖM, P., KLUNGLAND, H., ROGNE, S., 1992. Detection of multiple β-casein *(CASB)* alleles by amplification created restriction sites (ACRS). Animal Genetics 23: 333-338.

LIEN, S., KAMINSKI, S., ALESTRÖM, P., ROGNE, S., 1993. A simple and powerful method for linkage analysis by amplification of DNA from single sperm cells. Genomics 16: 41-44.

LINDERSSON, M., LUNDÉN, A., ANDERSSON, L., 1995. Genotyping bovine milk proteins using allele discrimination by primer length and automated DNA sizing technology. Animal Genetics 26: 67-72.

LO, Y.M.D., PATEL, P., MEHAL, W.Z., FLEMING, K.A., BELL, J.I., WAINSCOAT, J.S., 1992. Analysis of complex genetic systems by ARMS-SSCP: application to HLA genotyping. Nucleic Acids Research 20: 1005-1009.

MEDRANO, J.F., AGUILAR-CÓRDOVA, E. 1990a. Genotyping of bovine *k*-casein loci following DNA sequence amplification. Bio/Technology 8: 144-146.

MEDRANO, J.F., AGUILAR-CÓRDOVA, E., 1990b. Polymerase chain reaction amplification of bovine b-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. Animal Bio/Technology 1: 73-77.

MEDRANO, J.F., SHARROW, L., 1991. Genotyping of bovine β-casein loci by restriction site modifica-

tion of polymerase chain reaction (PCR) amplified genomic DNA. Journal of Dairy Science 74 (Supl. 1): 282 (Abstract).

MOHR, U., KOCZAN, D., LINDER, D., HOBOM, G., ERHARDT, G., 1994. A single point mutation results in A allele-specific exon skipping in the bovine α_{s1}-casein mRNA. *Gene* 143: 187-192.

MULLIS, K.B., FALOONA, F., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. Methods in Enzymology 155: 335-350.

NAKAJIMA, E., MATSUMOTO, T., YAMADA, R., KAWAKAMI, K., TAKEDA, K., OHNISHI, A. *et al.* 1996. Technical Note: use of a PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) for detection of a point mutation in the swine ryanodine receptor (RYR1) gene. Journal of Animal Science 74: 2904-2906.

NEWTON, C.R., GRAHAM, A., HEPTINSTALL, L.E., POWELL, S.J., SMITH, J.C., MARKHAM, A.C., 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research 17: 2503-2516.

Ng-KWAI-HANG, K.F., GROSCLAUDE, F., 1992. Genetic polymorphism of milk proteins. En Advanced Dairy Chemistry (P.F. Fox) 1: Proteins, Applied Science Publishers, London: 405-455.

OKAYAMA, H., CURIEL, D.T., BRANTLY, M.L., HOLMES, M.D., CRYSTAL, R.D., 1989. Rapid and nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. Journal of Laboratorial and Clinical Medicine 114: 105-113.

ORDÁS, J.G., RANDO, A., SENESE, C., MASINA, P., 1997. DNA polymorphisms of casein genes in Spanish dairy sheep. Small Ruminant Research 26: 9-13.

ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K., SEKIYA, T., 1989a. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 2766-2770.

ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T., HAYASHI, K., 1989b. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5: 874-879.

ORTÍ, G., HARE, M.P., AVISE, J.C., 1997. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. Molecular Ecology 6: 575-580.

OSTA, R., MARCOS, S., RODELLAR, C., 1995. A *MnlI* polymorphism at the bovine α_{s2}-casein gene. Animal Genetics 26: 201.

PAPPALARDO, M., RANDO, A., COSENZA, G., CAPUANO, M., RAMUNNO, L., 1996. A *BalI* RFLP at the goat β-casein gene. Animal Genetics 27: 123-124.

PILLA, F., BEVILACQUA, C., LEROUX, C., FRAGHI, A., MARTIN, P., 1998. Genotyping of α_{s1}-casein in sheep. Animal Genetics 29: 472-473.

PHUA, S.H., COLLINS, L., LEWIS, P., WOOD, N., MCNABB, L., BROAD, T. *et al.* 1992. An *Eco*RI restriction fragment length polymorphism at the ovine α_{s2}-casein (CASAS2) locus. Animal Genetics 23: 475.

PINDER, S.J., PERRY, B.N., SKIDMORE, C.J., SAVVA, D., 1991. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. Animal Genetics 22: 11-20.

PRINZENBERG, E.M., ERHARDT, G., 1997b. Bovine β-lactoglobulin I is identified by amplification created restriction site using *SmaI*. Animal Genetics 28: 379.

PRINZENBERG, E.M., ERHARDT, G., 1997a. SSCP identifies bovine *CSN1S1*^{D}. Animal Genetics 28: 460.

PRINZENBERG, E.M., ERHARDT, G., 1999. Molecular genetic characterization of ovine β-lactoglobulin C allele and detection by PCR-RFLP. Journal of Animal Breeding and Genetics 116: 9-14.

PRINZENBERG, E.M., HIENDLEDER, S., IKONEN, T., ERHARDT, G., 1996. Molecular genetic characterization of new bovine kappa-casein alleles CSN3^{F} and CSN3^{G} and genotyping by PCR-RFLP. Animal Genetics 27: 347-349.

PRINZENBERG, E.M., ANGLADE, P., RIBADEAU-DUMAS, B., ERHARDT, G., 1998. Biochemical characterization of bovine α_{s1}-casein F and genotyping with sequence-specific primers. Journal of Dairy Research 65: 223-231.

PRINZENBERG, E.M., KRAUSE, I., ERHARDT, G., 1999. SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1). Animal Bio/Technology 10: 49-62.

RAMUNNO, L., COSENZA, G., RANDO, A., MACCIOTTA, N.P.P., PAPPALARDO, M., MASINA, P., 1997. Identification of carriers of the Welsh α_{s1} variant using

an allele-specific PCR method. Animal Genetics 28: 154-155.

RANDO, A., DI GREGORIO, P., MASINA, P., 1988. Identification of bovine *k*-casein genotypes at the DNA level. Animal Genetics 19: 51-54.

RANDO, A., DI GREGORIO, P., DAVOLI, R., DALL'OLIO, S., MASINA, P., RUSSO, V., 1990. Identification of the two common alleles of the bovine α_{s1}-casein locus by means of RFLP's. Proceedings of the 4th World Congress Applied to Livestock Production, Edinburgh, Scotland 14: 241-244.

ROGNE, S., LIEN, S., VEGARUD, G., STEINE, T., LANGSRUD, T., ALESTRÖM, P., 1989. A method for *k*-casein genotyping of bulls. Animal Genetics 20: 317-321.

ROSSITER, B.J.F., CASKEY, C.T., 1990. Molecular scanning methods of mutation detection. The Journal of Biological Chemistry 265: 12753-12756.

SARKAR, G., SOMMER, S.S., 1991. Haplotyping by double PCR amplification of specific alleles. Bio/-Techniques 10: 436-440.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. *et al.* 1985. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

SAIKI, R.K., BUGAWAN, T.L., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A., 1986. Analysis of enzymatically amplified β-globin and HLA-DQα DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature 324: 163-166.

SAPERSTAIN, D.A., NICKERSON, J.M., 1991. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis using PCR coupled to restriction digests. Bio/Techniques 10: 488-489.

SCHLEE, P. ROTMANN, O., 1992c. Identification of bovine *k*-casein C using the polymerase chain reaction. Journal of Animal Breeding and Genetics 109: 153-155.

SCHLEE, P. ROTMANN, O., 1992a. Determination of bovine α_{s1}-casein alleles B and C by allele-specific polymerase chain reaction. Journal of Animal Breeding and Genetics 109: 316-319.

SCHLEE, P. ROTMANN, O., 1992b. Genotyping of bovine β-casein, β-lactoglobulin and α-lactalbumin using the polymerase chain reaction. Journal of Animal Breeding and Genetics 109: 456-464.

SCHLIEBEN, S., ERHARDT, G., SENFT, B., 1991. Genotyping of bovine *k*-casein (*k*-Cn^A, *k*-Cn^B, *k*-Cn^C, *k*-Cn^E) following DNA sequence amplification and direct sequencing of *k*-Cn^E PCR product. Animal Genetics 22: 333-342.

SEIBERT, B., ERHARDT, G., SENFT, B., 1985. Procedure for simultaneous phenotyping of genetic variants in cow's milk by isolectric focusing. Animal Blood Groups and Biochemical Genetics 16: 183-191.

SEKIYA, T., 1993. Detection of mutant sequences by single-strand conformation polymorphism analysis. Mutation Research 288: 79-83.

SHEFFIELD, V.C., BECK, J.S., KWITEK, A.E., Sandstrom, D.W., Stone, E.M. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 16: 325-332.

SOMMER, S.S., CASSADY, J.D., SOBELL, J.L., BOTTEMA, C.D.K., 1989. A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. Mayo Clinical Proceedings 64: 1361-1372.

SOMMER, S.S., GROSZBACH, A.R., BOTTEMA, C.D.K., 1992. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. Bio/Techniques 12: 82-87.

SOUTHERN E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 98: 503-517.

STOPPA-LYONNET, D., LAURENT-PUIG, P., ESSIOUX, L., PAGÈS, S., ITHIER, G., LIGOT, L. *et al.* 1997. BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. The American Journal of Human Genetics 60: 1021-1030.

TEE, M.K., MORAN, C., NICHOLAS, F.W., 1990. Genotyping of the A and B variants of cattle β-lactoglobulin using restriction length polymorphisms. Proceedings of the Australasian Gene Mapping Workshop, Sydney, Australia: 62 (Abstract).

THREADGILL, D.W., WOMACK, J.E., 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. Nucleic Acids Research 18: 6935-6942.

VELMALA, R., GROHS, C., MAHÉ, M.F., LIEN, S., LEVÉZIEL, H., 1994. Genotyping of the bovine β-

casein C allele by amplification created restriction site. Animal Genetics 25: 429.

WILKINS, R.J., KUYS, Y.M., 1992. Rapid β-lactoglobulin genotyping of cattle using the polymerase chain reaction. Animal Genetics 23: 175-178.

WU, D.Y., UGOZZOLI, L., PAL, B.K., WALLACE, R.B., 1989. Allele-specific amplification of β-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 2757-2760.

ZADWORNY, D., KUHNLEIN, U. 1990. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. Theoretical and Applied Genetics 80: 631-634.

ZHOU, J.F., ZADWORNY, D., KUHNLEIN, U., 1992. Genotyping of the β-lactoglobulin locus of Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. Journal of Dairy Science 75 (Supl. 1): 284.

ZSOLNAI, A., FÉSÜS, L., 1996. Simultaneous analysis of bovine *k*-casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes. Animal Genetics 27: 207-209.

(Aceptado para publicación el 27 de junio de 2000)