MAPEO GENETICO DEL LOCUS BOVINO CSN2

García-Muro, E.; Martín-Burriel, I. ; Zarazaga, I. y Zaragoza, P.
Laboratorios de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria. C/ Miguel Sevet, 177. 50013 Zaragoza.

Introducción

El locus CSN2 codifica la proteína de la leche β-caseína, que constituye el 30% de la caseína total. El gen completo en bovino fue descrito por Bonsing y cols. (1988). La β-caseína es una de las proteínas que han mantenido más constante su secuencia entre las distintas especies, variando solo en el tamaño de sus intrones. Asimismo, al igual que el resto de las caseínas, se relacionan ciertos polimorfismos con factores de calidad tecnológica de la leche, sobre todo en la leche destinada a la producción de la queso (Marzialli y Ng-Kwai, 1986).

Los cuatro alelos más comunes de esta proteína son el A_1, A_2, A_3 y B, que difieren en mutaciones puntuales en la secuencia de los aminoácidos 67, 106 y 122 (Bonsing y cols., 1988). Este número de alelos hace difícil su discriminación con el uso de RFLPs. Han sido descritos varios métodos: ACRS que diferencia los cuatro alelos mencionados (Lien y cols, 1992); PCR alelo específico que solo diferencia el alelo B de los demás (Schlee y Rottmann, 1992); BAS-PCR, que también diferencia el B de los demás (Damiani y cols, 1992) y la técnica ADPL (Lindersson y cols., 1995) que diferencia todos los alelos usando un secuenciador automático. En todos los casos, o bien la técnica es dificultosa y requiere en algunos casos medios técnicos costosos (uso de un secuenciador automático), o bien es insuficiente ya que no llega a discriminar los cuatro alelos principales.

Por las razones anteriores expuestas, se intenta conseguir con este trabajo el encontrar un nuevo método más sencillo y económico que nos permita resolver los problemas antes expuestos. La técnica PCR/SSCPs se presenta como candidata para la discriminación de los alelos de la β-caseína. La combinación de la PCR ("polymerase chain reaction") y los SSCPs ("single-strand conformation polymorphisms") permite detectar mutaciones puntuales debidas a un cambio de un nucleótido en la secuencia de un gen (Orita y cols, 1989), siendo una técnica sencilla, muy sensible, fiable y relativamente barata.

Como consecuencia del objetivo que antes se ha expuesto, la posibilidad de detectar polimorfismos en este locus, nos permitirá realizar por primera vez el análisis de ligamiento del mismo en un panel internacional de familias de referencia (IBRP).

Material y Métodos

El estudio de análisis de ligamiento se realizó en el panel internacional de familias de referencia (IBRP) que consta de 21 familias con un total de 370 animales

Se procedió a la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de un fragmento de 233 pb del exon VII que comprende las mutaciones de los alelos A_1, A_2, A_3 y B. Los cebadores utilizados fueron los descritos por Medrano y Sharrow (1991).

Cada reacción de amplificación tuvo un volumen final de 50 ml que contienen: 50 ng de ADN; 150 pmol de cada cebador; 1,25 U de Taq Polimerasa; 50 mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH=9); 0,01% gelatina; 0,1 triton x-100; 1,5 mM MgCl2, dNTPs (200 mM).

Asimismo se siguió el siguiente ciclo de temperaturas en el termociclador: 94ºC durante 5 min., y 29 ciclos de 94ºC durante 45 seg., 59ºC durante 1 min. y 73ºC durante 1 min.

La visualización del fragmento amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y bajo luz ultravioleta.

Posteriormente a la comprobación de la amplificación, se procedió a la separación de una alicuota de 10 ml de producto amplificado y posterior desnaturalización (95ºC durante 10 min.). Esta fue cargada en un gel al 40% de MDE, 5% de glicerol y se realizó el corrido electroforético usando como tampón de corrido 0,5% TBE, durante aproximadamente 15 horas, a 15ºC y a 8w constantes.

El gel se tiñó con plata para visualizar las diferentes variantes encontradas en el total de individuos analizados. Por último los datos individuales se enviaron a la CGD (Cattle Genotypic Database) donde se realizó el estudio de ligamiento con el programa CRI-MAP (v2.4 SunOs).

Resultados y Discusión

Se encontraron 14 familias (222 animales) informativas de un total de 21, en las cuales se diferenciaron un total de cuatro alelos, no apareciendo ningún animal que presentase el alelo A_3. Sin embargo en 4 familias, apareció un nuevo patrón de bandas que podría corresponder a un nuevo alelo.

Estudios paralelos en nuestro laboratorio nos han permitido establecer la correspondencia entre cada modelo electroforético obtenido mediante el análisis del ADN por PCR/SSCPs y el alelo proteico identificado en leche por Isoelectroenfoque (García-Muro y cols., 1996).

Este nuevo alelo (Z), detectado en individuos de híbridos Friesian x Sahiwal, pertenecientes a familas australianas (25 individuos) y africanas (N'Dama x Boran, 69 individuos) fue analizado en el panel de familias, comprobándose su caracter

hereditario y control mendeliano y codominante. En este momento se está realizando la secuenciación del mismo, con el objetivo de asegurar que no corresponde con alguno de los descritos a nivel proteico en razas no europeas.
Con el nuevo polimorfismo detectado se realizaron los estudios de ligamiento. CSN2 no mostró recombinantes con CSN1S1, lo cual vuelve a confirmar que se encuentra en el mismo grupo de ligamiento. Sin embargo, al analizar CSN2 con CSN3, si bien en dos casos no aparecen recombinantes, con los datos de un tercer laboratorio aparece una frecuencia de recombinación de 0,04 (Barendse, comunicación personal) y con un valor superior a 3 del "load square" (17,86), que indica, como es de suponer, ligamiento, pero a una cierta distancia de CSN2 y CSN1S1. Además, los datos de ligamiento obtenidos en nuestro estudio con otros marcadores del cromosoma BTA6, sugieren que CSN3 podría estar separado de CSN2 y CSN1S1. Estos resultados corroborarían los datos obtenidos por Ferreti y cols. (1991), los cuales utilizando electroforesis en campos pulsados (PFGE), determinaron el orden del cluster de las caseínas. Según este orden, el locus CSN3 estaría alejado de las demás caseínas por lo menos 70 kb. Los datos mostrados indican la posibilidad de que CSN2, CSN3 y CSN1S1 no formen un cluster cerrado, estando separado el locus CSN3 del resto de las caseínas.

Bibliografía

1. Bonsing J y cols. 1988. *Aust. J. Biol. Sci.* , **41**(4):527
2. Damiani, G. Y cols. 1992. *Anim. Genet.*, **23**: 561
3. Ferreti y cols. 1991. *Nucleic Acids Res.*, **18** (23): 6829
4. García-Muro y cols. (1996). *XXV th Internacional Conference on Animal Genetics*. Tours (France)
5. Lien, P. y cols. 1992. *Anim. Genet.*, **23**: 333
6. Lindersson, M. y cols. 1995. *Anim. Genet.*, **26**: 67
7. Marziali, S.A. y Ng-Kwai, K.F. 1986. *J. Dairy. Sci.*, **69**: 1193
8. Medrano JF y Sharrow L. 1991, *J. Dairy. Sci.*, **74**: 282
9. Orita, M. Y cols. 1989. *P.N.A.S. USA*, **86**: 2766
10. Schlee, P. Y Rottmann, O. 1992. *J. Anim. Breed. Genet.*, **109**: 456