APLICACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO EN EL ANÁLISIS DE LA β- LACTOGLOBULINA Y LA κ-CASEÍNA CAPRINAS

M. H. Yahyaoui, A. Sánchez, A. Coll, R. N. Pena y J. M. Folch

Unitat de Genètica i Millora, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

INTRODUCCIÓN

La caracterización del polimorfismo de las lactoproteínas en los rumiantes, tanto a nivel bioquímico como molecular, y la comprobación de que dicho polimorfismo está implicado en la variación de la composición y propiedades de la leche han permitido utilizar los diferentes alelos de los genes que codifican estas proteínas como marcadores en la selección de caracteres lecheros (Grosclaude *et al.*, 1994). En caprino, se ha descrito un extenso polimorfismo en la caseína α_{s1} que tiene un efecto importante sobre la concentración de proteína en la leche y sobre el rendimiento en la producción de queso (Boulanger *et al.*, 1984, Barbieri *et al.*, 1995).

La β-lactoglobulina (β-LG) es la proteína sérica mayoritaria en la leche de los rumiantes y parece intervenir en el transporte de pequeñas moléculas hidrofóbicas (Pérez y Calvo, 1995). Las caseínas representan el 80% del contenido proteíco total de la leche, entre ellas la κ-caseína (κ-CN) es esencial para la formación y la estabilización de complejos de fosfato cálcico y caseínas denominados micelas.

En bovino se han caracterizado 6 variantes distintas de la β-LG (Martin, 1993) y en ovino se ha demostrado la existencia de 3 variantes A, B y C (revisado en Moioli *et al.*, 1998). Sin embargo, en caprino se ha detectado polimorfismo por electroforesis de proteínas pero no ha sido todavía caracterizado (Moioli *et al.*, 1998). Para la κ-CN, hay 4 variantes descritas en bovino (A, B, C y E) y parece ser monomórfica en ovino. En caprino, se han descrito 2 variantes, A y B, con movilidad electroforética diferenciada (Di luccia *et al.*, 1990) pero no han sido caracterizadas.

Se han desarrollado numerosos métodos para la detección y localización de mutaciones en el ADN, pero en la mayoría de los casos las técnicas empleadas son dificultosas, requieren de mucho tiempo o son muy costosas. Además, en general, la longitud de los fragmentos de ADN que pueden ser analizados es bastante reducida y la tasa de discriminación de mutaciones es baja (Cotton, 1997). Con el objetivo de caracterizar nuevas variantes de la β-LG y de la κ-CN caprinas, se han puesto a punto dos métodos recientes de detección de mutaciones, que son adaptables a sistemas automatizados de detección mediante marcaje fluorescente:

1. BESS (*Base Excision Sequence Scanning*; Hawkins *et al.*, 1997): El método permite la detección de mutaciones en fragmentos de hasta 1 Kb en tamaño. Se basa en la utilización durante la PCR de una cantidad limitada de dUTP, que se incorpora aleatoriamente en lugar de la dTTP durante la amplificación. El producto de PCR es posteriormente digerido con una mezcla enzimática que contiene la Uracil-glicosidasa y la endonucleasa IV, que generan un patrón de fragmentos equivalentes a una reacción de secuenciación para la Timina. La existencia de mutaciones se pone de manifiesto por comparación de los patrones de fragmentos obtenidos por electroforesis capilar entre una muestra control y la muestra problema. El método detecta sólo diferencias en la distribución de Timinas, pero 10 de las 12 posibles mutaciones puntuales del ADN

afectan a la Timina (sólo los cambios nucleotídicos entre Guanina y Citosina o viceversa quedan excluidos).

2. EMD (*Enzymatic Mutation Detection*; Del Tito *et al.*, 1998): El método utiliza enzimas como la T4 endonucleasa VII, capaces de reconocer y cortar bases no complementarias en un ADN de cadena doble (ADN heterodúplex). Permite analizar fragmentos amplificados de varias Kb de tamaño. El protocolo requiere la desnaturalización y posterior hibridación de las regiones candidatas entre un ADN control y el de la muestra que se quiere analizar. La existencia de diferencias en la secuencia nucleotídica de ambos fragmentos es reconocida por el enzima, que corta el ADN en las regiones donde se ubican estas diferencias, generando fragmentos de inferior tamaño que pueden detectarse mediante electroforesis capilar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de cabras de tres razas españolas: Murciana-Granadina (12), Payoya (10) y Malagueña (9). La extracción del ADN genómico se realizó básicamente según el método de precipitación salina (Miller *et al.*, 1988).

Las reacciones de amplificación (PCR) se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenía: tampón de PCR (1X), 0,4 µM de cada cebador marcados fluorescentemente (Hex y Fam), 0,2 mM de cada dNTP, 0,625 unidades de Taq ADN polimerasa, 2 mM de $MgCl_2$ y 100 ng de ADN genómico. El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 5 min. a 95ºC, seguida de 10 ciclos a 97ºC 15 seg., 63ºC 1 min., 72ºC 1 min. 30 seg. y de 25 ciclos a 95ºC 30 seg., 63ºC 1 min., 72ºC 1 min. 30 seg. Se añadió una extensión final de 5 min. a 72ºC y el resultado se comprobó en un gel de agarosa a 2%.

Las regiones amplificadas tienen un tamaño de 710 pb para la β-LG (región promotora e inicio del exón 1) y de 459 pb para la κ-CN (exón 4).

Se optimizaron los métodos BESS y EMD de detección de mutaciones para su utilización en equipos de secuenciación automática por fluorescencia. Ambos métodos están disponibles en forma de *kits* comerciales: BESS (BESS T-Scan; Epicentre Technologies) y EMD (Passport-EMD; Pharmacia Biotech).

Los productos fueron desnaturalizados y separados por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 de Perkin Elmer. Los señales fluorescentes (Fam y Hex) fueron analizadas por el programa GeneScan y los tamaños estimados gracias a un estándar interno (Genescan 500 Rox) añadido antes de la desnaturalización.

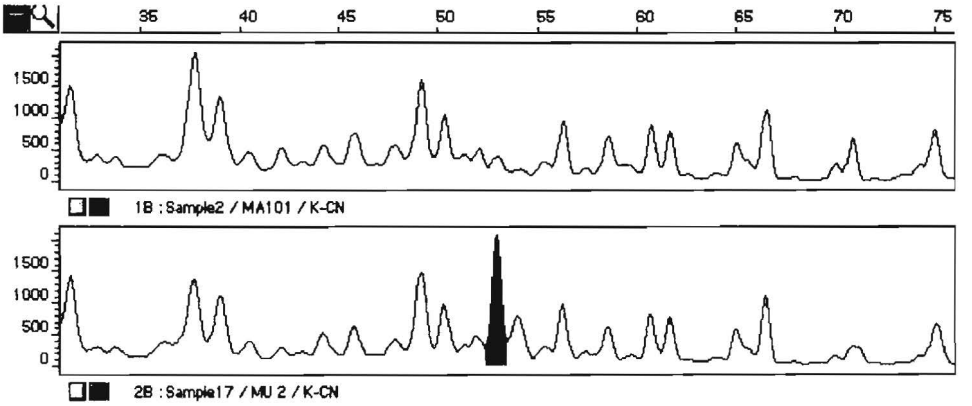
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las dos técnicas han sido probadas y adaptadas a la detección por electroforesis capilar en un ABI Prism 310. Para la β-LG se han utilizado como controles un clon de ADN genómico de cabra de secuencia conocida (Folch *et al.*, 1994) y ADN genómico de oveja. Para la κ-CN se ha utilizado ADN genómico de cabra y oveja (Coll *et al.*, 1993; Furet *et al.*, 1990). El conocimiento de las diferencias nucleotídicas entre la cabra y la oveja para los genes de la β-LG y de la κ-CN, ha permitido evaluar y poner a punto los protocolos BESS y EMD para la detección de mutaciones. Con el método BESS se han observado de forma consistente los fragmentos generados por el corte en los

nucleótidos Timina de la secuencia, aunque se han encontrado también picos adicionales inespecíficos. El método EMD ha permitido detectar 6 de las 9 diferencias nucleotídicas existentes entre las regiones amplificadas del exón 4 de la κ-CN caprina y ovina.

El protocolo BESS ha sido utilizado en un análisis preliminar sobre 22 animales de diferentes razas caprinas y se ha observado la presencia de 6 posibles posiciones polimórficas en el exón 4 de la κ-CN. En la Figura 1 se muestra el resultado de un posible polimorfismo detectado por la presencia de un pico adicional de Timina. Para la β-LG caprina se han encontrado 2 regiones potencialmente polimórficas en un primer análisis de 9 muestras de ADN de las razas Malagueña y Payoya. Las posiciones donde se han encontrado diferencias serán secuenciadas para comprobar y describir el polimorfismo en cuestión.

Figura 1. Resultado con el método BESS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbieri M.E., Manfredi M., Elsen J.M., Ricordeau G., Bouillon G., Grosclaude F., Mahé M.F., Bibé B. (1995). Génét. Sél. Evol. 27: 437-450.

Boulanger A., Grosclaude F., Mahé M.F. (1984). Génét. Sel. Evol. 16: 157-176.

Coll A., Folch y Sánchez A. (1993) Journal of Animal Science 71: 2833.

Cotton R.G.H. (1997). Trends in Genetics 13: 43-46.

Del Tito B.J., Poff H.E., Novotny M.A., Cartledge D.M., Walker R.I., Earl C.E. y Bailey A.L. (1998). Clin. Chem. 44: 731-739.

Di luccia L., Mauriello R., Chianese L., Moco L., Addeo B. (1990). Scienza e tecnica Lattiero casearia 41: 305-314.

Folch J.M., Coll A., Sánchez A. (1994) Journal of Dairy Science 77: 3493-3497.

Furet J.P., Mercier J.C., Soulier S., Gaye P., Hue-Delahaie D. y Vilotte J.L. (1990) Nucleic Acids Research 17: 5286.

Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remeuf F., Vassal L., Bouillon J. (1994). INRA Prod. Anim. 1994, 7: 3-19.

Hawkins G.A. y Hoffman L.M. (1997). Nature Biotechnology 15: 803-804.

Martin P. (1993). Lait 73: 511-532.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). Nucl. Acids Res., 16: 1215.

Moioli B., Pilla F., Tripaldi C. (1998). Small Ruminant Research 27: 185-195.

Pérez M.D. y Calvo M. (1995). Journal of Dairy Science 78: 978-988.