BÚSQUEDA DE SNPS EN GENES CANDIDATOS RELACIONADOS CON LA CALIDAD DE CARNE EN LA ESPECIE BOVINA

Checa M.L.[1], Miranda M.E.[1], Amarger V.[2], Crisa A.[3], Delourme D.[2], Leveziel H.[2], Marchitelli C.[3], Razzaq N.[4], Valentini A.[3], Williams J.[4], Dunner S.[1]

[1] Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria de Madrid. [2] INRA-Centre de Clermont-Fd/ Theix (URH). Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, Francia. [3] Instituto di Zootecnia. Universita della Tuscia. 01100 Viterbo, Italia. [4] Roslin Institute, Roslin, Midlothian, Scotland.EH25 9PS, Reino Unido.

INTRODUCCIÓN

Las estrategias de asociación entre genes candidatos y fenotipos de interés (Taylor *et al.*, 1998; Page *et al.*, 2002) despiertan un creciente interés. La primera etapa de esta estrategia consiste en la elección de los genes candidatos, bien por su papel en rutas metabólicas implicadas en procesos básicos de la expresión fenotípica, bien por su ubicación (candidatos posicionales) en QTLs previamente descritos. En una segunda etapa se trata de identificar variabilidad en los genes candidatos seleccionados, de manera que pueda aplicarse alguna prueba estadística de asociación entre el polimorfismo detectado en los genes y los diferentes niveles de expresión fenotípica (Cardon y Bell, 2001).

La identificación de mutaciones de tipo SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) es una labor intensa para la que se pueden usar varios métodos. Todos se basan en la comparación de secuencias específicas de locus generadas a partir de cromosomas distintos para determinar las diferencias puntuales (Marth *et al.*,1999). La información de la que se parte procede generalmente de secuencias localizadas en bases de datos públicas correspondientes a los genes elegidos para la especie en estudio o en su defecto para la especie humana o murina, pero también de secuencias generadas en proyectos de ESTs (Expressed Sequence Tags o marcadores codificantes) (Schultz *et al.*, 2000).

La secuenciación directa del fragmento producido por PCR perteneciente al gen candidato es la forma más sencilla de identificación del SNP. Sin embargo, la información con la que se diseñan las regiones de estudio es a menudo escasa, los fragmentos analizados son por lo tanto pequeños y se necesitan diseñar y sintetizar muchos cebadores distintos, contribuyendo todo ello a limitar este abordaje.

Existen estrategias de búsqueda basadas en el llamado RRS o *Reduced Representation Shotgun* utilizada para la identificación de SNPs a gran escala en la especie humana (Altshuler *et al.*, 2000). Esta estrategia consiste en mezclar ADNs de diferentes individuos genéticamente distantes y en construir genotecas de plásmidos después de su digestión con enzimas de restricción. La secuenciación siguiendo la estrategia de *shotgun,* genera pequeñas moléculas solapantes al azar que una vez alineadas permiten obtener una representación reducida de estos genomas para determinar las diferencias y por tanto los SNPs existentes.

Sin embargo, esta estrategia ignora que los genes elegidos son candidatos por estar implicados en rutas metabólicas de interés y por lo tanto es válida solamente en los casos en los que el objetivo sea el de describir SNPs en el genoma de una especie.

El objetivo de esta presentación es describir una estrategia rápida de búsqueda de polimorfismos del tipo SNP en genes candidatos elegidos por su posible influencia sobre diversas características de calidad de carne en ganado bovino. Estos trabajos se desarrollan en el marco del proyecto europeo GeMQual (QLRT-CT2000-0147, www.gemqual.org).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico. Se utilizó ADN extraído de muestras de sangre de terneros pertenecientes a las razas Asturiana de Valles, Asturiana de Montaña, Pirenaica, Avileña, Limousine, Charolaise, Piedmontese, Marchigiana, Danish Red Cattle, Holstein, Aberdeen-Angus, Hereford, Jersey, Highland y South-Devon. Un panel de referencia constituido por dos individuos de cada raza sirvió para la localización de los SNPs.

Amplificación de fragmentos. A partir de la información disponible en la especie humana o murina y su comparación con la especie bovina (ARNm, ESTs), se diseñan cebadores localizados preferentemente en exones no contiguos para incrementar la probabilidad de detectar polimorfismo. En la mayoría de los casos, al ser los intrones muy largos, los fragmentos amplificados serán de 1 a 5 kb de longitud. Esta operación se realiza utilizando la polimerasa *Long Range* Expand (Roche).

Digestión mediante enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos se someten a una digestión conjunta con *Hae*III, *ScrF*I y *Sau96*I (incubando con 1U de cada enzima durante 1h a 37°C).

Análisis SSCP. El producto digerido es desnaturalizado antes de su carga en geles de acrilamida no desnaturalizantes y sometido a electroforesis (700 V durante 6-7h). Estas condiciones permiten que al estar las moléculas en hebra simple, la migración dependa directamente de su secuencia, obteniéndose un patrón de bandas más o menos complejo, en dónde las diferencias nucleotídicas entre individuos se reconocerán por la modificación del patrón de migración.

Identificación de polimorfismos. Los individuos que muestran un polimorfismo (Figura 1) son secuenciados para identificar la/s mutacion/es que contienen. El tamaño de los fragmentos estudiados requiere el diseño de cebadores internos sobre exones incluidos en el fragmento o sobre secuencia nueva generada, de forma que permitan reconstruir la secuencia del fragmento original.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra la imagen de 3 amplicones distintos estudiados por esta técnica RFLP-SSCP (Iwahan *et al.*, 1992) que pertenecen a un fragmento de 1,8 Kb del gen CPE (Carboxypeptidase E) y 2 fragmentos de 1,5 y 1,2 Kb del gen MYOZ (Myozenin) respectivamente. Como se ve en la imagen, este análisis permite la identificación rápida del polimorfismo existente, siendo tan sólo necesario secuenciar un individuo por cada patrón de migración diferente observado. Esta estrategia permitió la identificación de 3 polimorfismos en el caso del gen CPE y otros 3 polimorfismos distintos en el del gen MYOZ. De este manera, aunando digestión de secuencias largas con la migración por SSCP de los fragmentos resultantes, se pueden rastrear amplias regiones genómicas con tan sólo el conocimiento de parte del ADN codificante, identificando un número suficiente de SNPs que servirá para llevar a cabo la posible asociación entre determinados genes y fenotipos.

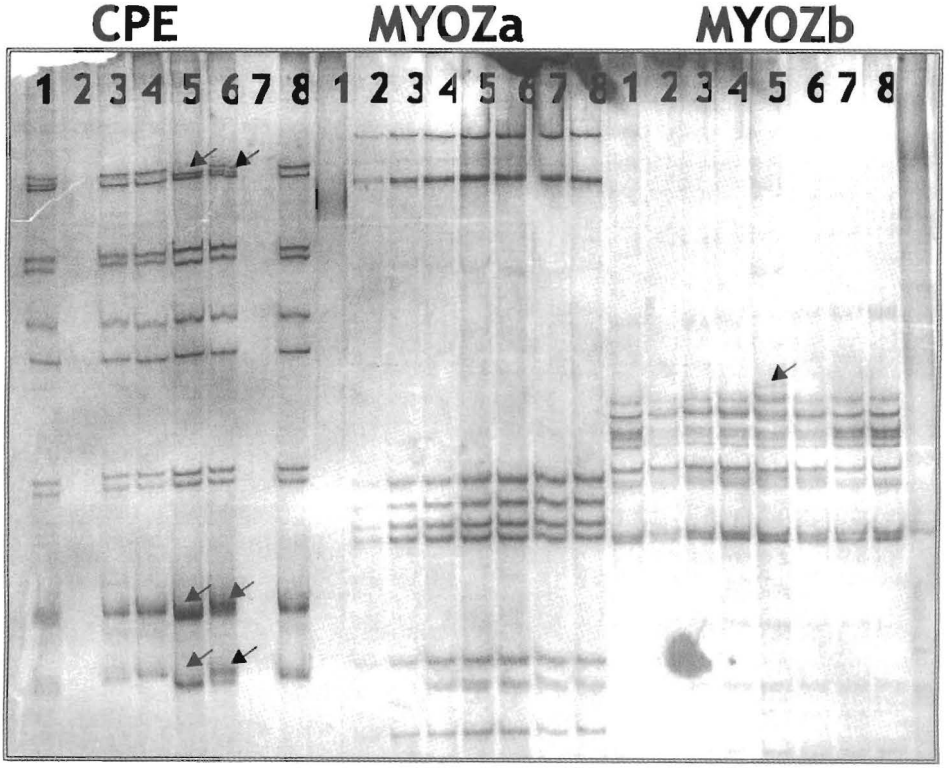


Figura 1- Muestra de un patrón de bandas SSCP generado a partir de la digestión de 3 amplicones diferentes (CPEa, MYOZa y MYOZb). Cada calle es un animal distinto (1-8). Se indican con flechas los patrones que muestran polimorfismo.

AGRADECIMIENTOS

Además del proyecto europeo mencionado hemos recibido financiación del MCyT a través del INIA, proyecto nº CAL01-009-C02-1. Nuestro agradecimiento a las asociaciones de ganaderos españolas, francesas, italianas, inglesas y danesas por proporcionar los animales incluidos en el estudio.

REFERENCIAS

Altshuler *et al.*, (2000). An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. *Nature* 407: 513-516.

Cardon y Bell., (2001). Association study designs for complex diseases. *Nature Rev. Genet.* 2: 91-99

Iwahan *et al.*, (1992) Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. *BioTechniques* 12: 64-66.

Marth *et al.*, (1999). A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nature Genetics* 23: 452-456.

Page *et al.*, (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J.Anim.Sc.* 80(12):3077-85

Schultz *et al.*, (2000). More than 1,000 putative new human signalling proteins revealed by EST data mining. *Nature Genetics* 25: 201-204.

Taylor *et al.*, (1998). Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Anim Genet.* 29(3):194-201.