

COMUNICACIÓN

PROPUESTA DE METODOLOGÍA PARA LA LOCALIZACIÓN DE MICROSATÉLITES EN EL GENOMA EQUINO

METHODOLOGY PROPOSAL FOR THE LOCATION OF MICROSATELLITES IN THE EQUINE GENOME

Vega-Pla, J.L.¹, D.F. De Andrés Cara², J.J.Garrido Pavón² y G. Dorado³

¹Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Servicio de Cría Caballar. Apartado Oficial Sucursal 2. 14071-Córdoba. España.

²Unidad Mixta CSIC-UCO *Marcadores Genéticos Moleculares*. Facultad de Veterinaria. Avda. Medina Azahara 9. 14005 Córdoba. España.

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Avda. Medina Azahara 9. 14005 Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Marcadores genéticos. Extracción de DNA. Genoteca.

ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic markers. DNA extraction. Genetic library.

RESUMEN

Se presenta una metodología relativamente sencilla para la detección de secuencias microsatélites a partir de genotecas parciales en plásmidos, que consiste fundamentalmente en un nuevo protocolo de extracción de DNA y el empleo de una sonda (TG)₇T para localizar diferentes tipos de microsatélites.

SUMMARY

We present a relatively simple methodology for the detection of microsatellite sequences in partial genetic libraries in plasmids, consisting mainly in a new DNA extraction protocol and the use of a probe (TG)₇T to locate different types of microsatellites.

INTRODUCCIÓN

Los métodos de mejora animal se

basan en la selección de individuos que transmitan unos caracteres productivos muy concretos, lo que a medio o largo plazo, implica un aumento de la consanguinidad y, por lo tanto, una mayor homogeneidad genética de la raza. Este fenómeno dificulta cada vez más la identificación de los individuos y el control de su genealogía, por lo que se hace necesario definir nuevos marcadores que detecten las cada vez menores variaciones entre los ejemplares de una misma familia, ganadería o grupo racial.

Para la obtención de nuevos marcadores genéticos resulta muy útil abordar el estudio de la información que poseen las células de un individuo directamente, sobre los ácidos nucleicos, y no sólo su expresión en forma de proteínas.

Los estudios sobre el DNA han puesto de manifiesto en el genoma humano unas secuencias muy peculiares denominadas microsátélites (Tautz 1989). Se trata de repeticiones en tándem de motivos simples, así (TG) n donde $10 < n < 30$. La función que tienen, así como su mecanismo de acción, son poco conocidos.

Los microsátélites presentan una serie de características:

Son muy frecuentes y están repartidos por todo el genoma eucariótico y, a menudo, presentando un alto grado de polimorfismo en cuanto al número de repeticiones de la secuencia (Stallings *et al.*, 1991).

El modelo de herencia es mendeliano y los alelos detectados presentan codominancia. No se ha encontrado en la bibliografía ejemplo alguno de herencia no mendeliana de ningún microsátélite.

Las técnicas empleadas para la detección de la variabilidad son muy simples en comparación con otras técnicas de investigación del polimorfismo del DNA.

Se necesitan cantidades muy pequeñas de material biológico para la determinación de las variantes alélicas, incluso aunque el DNA esté bastante degradado, lo que permite el estudio de muestras muy antiguas y de origen diverso.

Estas características han llevado a considerar a los microsátélites como los marcadores de elección para conseguir, no sólo un modo fiable de identificación individual y de control de las genealogías, sino también una mejor apreciación y caracterización de la diversidad genética de las razas (Moazami-Goudarzi *et al.*, 1994).

La estrategia más empleada para la detección de microsátélites equinos consiste en construir en plásmidos una genoteca parcial de fragmentos de DNA inferiores a 1000 pb y explorarla con sondas de motivos dinucleotídicos repetidos (Ellegren *et al.*, 1992, Marklund *et al.*, 1994, Guérin *et al.*, 1994).

El objetivo de este estudio es la presentación de una metodología sencilla que permite la detección de secuencias de DNA conteniendo segmentos repetitivos en tándem (microsátélites) de motivos dinucleotídicos T-G para su empleo en las pruebas de identificación y control de paternidad equinos y en la confección de mapas genéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrae y purifica el DNA de 30 muestras de sangre de caballos. Se opta por combinar las técnicas descritas por Grobet *et al.* (1991) y Miller *et al.* (1988) (**tabla I**). Una vez completamente solubilizado el DNA, se calcula la concentración obtenida y su grado de pureza.

Siguiendo la técnica de Estoup *et al.* (1993) se selecciona la enzima Sau3A1 y se realiza una digestión completa de 25 mg de DNA genómico.

Se separan los fragmentos del DNA digerido por electroforesis en un gel de agarosa al 1 p.100 (p/v), utilizando como referencia de tamaños el plásmido pBR322 digerido con *Hae*III. Una vez que la separación es suficiente para discriminar 200 pb, se detiene la electroforesis y se recorta la porción de agarosa que contiene el DNA de

DETECCIÓN DE MICROSATÉLITES EN DNA EQUINO

Tabla I. Protocolo de extracción de DNA genómico a partir de sangre entera. (Extraction of genomic DNA from whole blood).

MATERIAL

- TE 10:1: Tris HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM, pH8
- Solución de homogeneización: urea 8 M; NaCl 0,3 M; SDS 2 p.100 (p/v); Tris HCl 10 mM, pH 8,5; EDTA 10 mM, pH 8
- NaCl 6 M
- Etanol absoluto

MÉTODO

1. Centrifugar 7 ml de sangre con anticoagulante a 900 g durante 10 min a 4°C.
2. Recoger todo el manto leucocitario en un volumen final de 1 ml y almacenar a -20°C hasta su uso.
3. Descongelar la muestra y añadir 50 ml de TE.
4. Agitar 10 min a 150 rpm, centrifugar a 900 g durante 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante. Repetir el lavado dos veces más.
5. Tras el último lavado, resuspender el botón celular en 15 ml de solución de homogeneización y agitar a 150 rpm durante 1 h 30 min.
6. Añadir 3 ml de NaCl 6 M, agitar invirtiendo durante 15 seg y centrifugar 15 min a 900 g y 4°C.
7. Recuperar el sobrenadante, añadir dos volúmenes (35 ml) de etanol absoluto. El DNA se precipita en forma de maraña de filamentos o *medusa*. Recuperar dicha *medusa* con una pipeta Pasteur con la punta sellada.
8. Lavar el material recuperado adherido a la pipeta en etanol al 70 p.100.
9. Secar ligeramente al aire e introducir en un microtubo con 1 ml de TE hasta que se desprenda el coágulo de la pipeta.
10. Agitar suavemente (rueda) de varias horas a varios días hasta disolución completa.

talla comprendida entre aproximadamente 200 y 400 pb, se extrae el DNA, se cuantifica y se inserta en un plásmido pUC18 digerido con *Bam*H1 y desfosforilado.

Se preparan células competentes *E. coli* JM105 siguiendo el protocolo del Dr. Mike Scott del Departamento de Neurología de la Universidad de California en San Francisco (Vega Pla, 1996) basado en resiembras sucesivas en cultivos en medios líquidos y la utilización del CaCl₂ como agente permeabilizador de la membrana. Se transforman con 10 ng de vector recombinante. Una vez que se dispone

de las colonias de bacterias suficientemente crecidas (1-2 mm) sobre las cajas de LB-agar selectivo, se transfieren las colonias y se fija el DNA de las mismas a una membrana de nailon.

La sonda que se utiliza para la detección de clones portadores de microsátélites es un oligonucleótido (TG)₇T marcado en el extremo 3' con Digoxigenina^o. Se rastrea la membrana de nailon con la sonda y se identifican las colonias positivas mediante un anticuerpo anti-Digoxigenina que lleva unida una fosfatasa alcalina, quien al actuar sobre el sustrato adecuado (Lumigen PPD), produce una

Tabla II. Secuencias de los fragmentos de DNA con microsatélites (5'-3'). (DNA sequences with microsatellites).

Microsatélite: HLM1	Número de acceso GenBank: U36493	Tamaño: 250 pb
GATCTAGAGGACGGGAGCAGCGGGGGCGGAAGAGTAGGCTCCGTGGCCCGGGGGTTGAGA ACTGTTTTGCAGCAGCTCTGCACGCCCCCTCCCCGCCCGCGACAGACACGTGTTGTGGTT CCGTCCCGGCTAAGCGATT GTGTGTGTGTGTGTGTGT AGGGTAGGATCGCGCTTTTTTTTCTT TGCTGTGGGTAAGGCTTCTGGGTCCAGAGCCCCAGGGGGAGCACTCCTTCGGCCGGCACCCG GATC		
Microsatélite: HLM2	Número de acceso GenBank: U36494	Tamaño: 150 pb
GATCTCTCTCCACCTCCCACTCTCCAACCCCATCCCCGCCCTCGCTCCTCCTCCACA CACACACACACACACACACACACACACACACACACA AGCCTGACACAATGGCCGGGT GGGGCTGAGGAAGTGGCTTCTCTGCGGCGATC		
Microsatélite: HLM3	Número de acceso GenBank: U36495	Tamaño: 468 pb
GATCTAGAGGACCATTCTCTGGGCT GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCACACGCACGTGTG TGTG GGGAGGGTTT GAGGTGGGTGCAGAAAA CCAAGGGGTTCTAGCCCTCCTTTTCTACCT TCCCAGGGCAATATCTCCTGCAGAACTGAATCTCCTCCATGGCTCCAGCTCCACCAGACAG GCCCCACTCTGGTTCCAGCTTCTCCAGAATCTCCTGCCCTGAATTCCAGGACACTACCTCCTC CCGTGTCTCTGAGGTCTAGGAGTGGTAGTGGCTTCTTCTGTTGCTGTTCTCTGTGGTGCCT CACCATCCTCTGTTGGCTGAGCTCAGGAATTCGAATTATGCTCCAAGAGAAGTGCAGACGT TTCCCCACTTACGTTGTTTCTACTTATGATTAGCGACCTTACGATGGTGTGAAGGTAATATG CATTCACTAGCAACTTTACTTCAAATTTGGATC		
Microsatélite: HLM4	Número de acceso GenBank: U36496	Tamaño: 362 pb
GATCCCATGAATGGGCTCCAGAGAACCCTGGAAAGCCACGCACCTGCGGAAGCCACCCTC GTCAAAGAAAGGCAGCCTCAGTTCCAAAACAGAAGGAGCCGAGTGAAAGACTGCGTAG GAGTGCCGTGGGGAGACACTCAAGCTCATGAGTCTCCAGCCTTTTCGAGAAGAAAAGCCCC TTTCCATTTCTCGGGGATGGGTGCAAGGTGCCCTGAAGAGCTCGCGAGT GTGTGTGTGTG TGCTGTGGGGTCGTCTTTG ACTGTGACGGTTGTGAGTCTCGGGCAGCACCGTGGCTGCCTC CCCTCCCTGGGGAGTCCCAAGGCTCCAAAGAGGCTGCGATGTTAGGCTTAGAGATC		
Microsatélite: HLM5	Número de acceso GenBank: U36497	Tamaño: 425 pb
GATCCAGAATGACTCCAGTGGGAGGTGTTCTTCTGTTGACCTGGCTCCCTTGGTGGTCTG AGGTTGTCAACCCTCAGGGCTGAATTTGTGAGCAGT GTGTGTGTGTGTGTGTGTGCACGAGTC TGTGTGTGTGTGTG CACACATGCTCAACTGGAGACCCACAGGATTT CAGCTCTTCTGAGGC ACCTAGAAGCTGACACGCTGGGTAGTGAGACGAGCAGCCGGGTGAGAATGTAACAAACGTT GTATGAAAGAAATCGACTTTGTTACCGACTGGCTTGAGGGAGGGACGACTGTGTTGTCTGGA AGTGTTAGGTTCAATTTATATTTGTGTCGGGAGAAATGTT CAGCTCTGGTGCAGACACTGGTG GCAGCCAGACCAGCTTGACTCCCTGGGTTGAAATTGAGAGAAAACCTTATAGGATC		
Microsatélite: HLM6	Número de acceso GenBank: U36498	Tamaño: 418 pb
GATCCTGAGCACGGCACCTGGCACATTCATGGACATTC GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT GTGTGTGTGTGTGTGT ATGCGTGCGCGCGCTGATATAGAGAGAAAGGGGAGGGAGGGGA GCGGAAACAGAGACAAAGTGGAGAGATATCGAAAATGGGTCAAATACTAATGGGTACAC CTGGATAAAGGGTATATGGTTGTTTACCATCCAGGCAACTTTTCCACAAGTTTATCTTTAAAT AAATGCATTTTAAAAATGGACCGTTGGCTGTTGTCCCAAATTTTGCCTAACCTTTGAGATTTT TGGCTTTGATCCCGCAGCTGCCATCGCTAGCGTACCCAGACCCCAAGTGTGCAATGGTG ACTTTAAAACAGTTGTGCGAGGTTCTGTCCAGGCAAGAAAACCTGGATC		
Microsatélite: HLM7	Número de acceso GenBank: no inscrita	Tamaño: 104 pb
GAT CGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT TGTGTGTGTGTGTG AGTGATATGTGAAACCCTGGTCCTTGGGGATC		

DETECCIÓN DE MICROSATÉLITES EN DNA EQUINO

emisión lumínica capaz de impresionar una placa radiográfica en unos minutos.

Las colonias positivas se siembran en medio de cultivo LB con 60 mg/ml de ampicilina, se incuban 12 horas a 37°C y se extraen y purifican los plásmidos por lisis alcalina.

Se utiliza un procedimiento de secuenciación automática basado en el método de los didesoxinucleótidos de Sanger *et al.* (1977) con los cuatro didesoxinucleótidos terminadores marcados con fluorocromos distintos.

Los productos de cada reacción se resuspenden en 4 ml de solución de carga (5:1, formamida desionizada y EDTA 50 mM, pH 8), se desnaturalizan a 90°C durante 2 min, se enfrían sobre hielo picado y se cargan en un gel de poliacrilamida que se ha colocado previamente en un secuenciador automático ABI 373 Streh (APPLIED BIOSYSTEMS, PERKIN ELMER). La electroforesis se realiza a potencia constante (32 vatios) y 40 °C de temperatura. Se siguen las recomendaciones del fabricante para obtener la secuencia del fragmento de DNA en estudio.

Se identifica la secuencia correspondiente al inserto del DNA y al plásmido y se resuelven las posibles ambigüedades comparando las secuencias complementarias obtenidas en las dos reacciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla I** se presenta el protocolo diseñado para la extracción de DNA genómico a partir de sangre entera.

La **tabla II** recoge las secuencias

de los fragmentos de DNA conteniendo los microsátelites detectados HLMI al 7.

Clásicamente, para la obtención de DNA se ha utilizado la proteinasa K. Se propone un protocolo poco peligroso, en lo referente a la utilización de productos muy tóxicos, y económico. En el método descrito por Grobet *et al.* (1991) de extracción y purificación de DNA a partir de sangre, se consigue separar el DNA de los complejos proteicos que le acompañan, mediante la acción de un agente caotrópico como la urea y un detergente como el SDS sin necesidad de emplear proteinasa K, lo que resulta más sencillo y barato. La última etapa de desproteinización mediante fenol, cloroformo y alcohol isoamílico utilizada por estos autores se sustituye por la técnica de deshidratación de Miller *et al.* (1988). Consiste en una precipitación salina de las proteínas incrementando la concentración final de NaCl en el medio hasta 1,5 M, lo que resulta incomparablemente más seguro y económico.

El DNA obtenido con esta técnica tiene una proporción entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm que fluctúa entre 1,7 y 2, lo cual indica una buena desproteinización. Por otra parte, ha sido digerido con las enzimas de restricción *HindIII*, *BamH1*, *EcoR1* y *Sau3A1*, clonado en plásmidos, secuenciado y empleado como sustrato para la técnica de amplificación por PCR, obteniéndose en todos los casos los resultados esperados.

Para generar gran cantidad de fragmentos pequeños, se digiere el DNA con la enzima de restricción *Sau3A1*, cuya secuencia de reconocimiento es de sólo cuatro bases (GATC), por lo

tanto, desde un punto de vista probabilístico, debe ser muy abundante en el genoma. Las tallas seleccionadas varían entre 200 y 400 pb aproximadamente. Se escoge el límite de 400 pb para garantizar la obtención de la secuencia del fragmento con una sola reacción de secuenciación.

Se elige una sonda (TG)₇T, que permite detectar tanto microsatélites que contienen secuencias con muchas repeticiones CA, así HLM2 con 21

repeticiones, HLM6 con 18 y HLM7 con 19, como las secuencias con microsatélites imperfectos, así HLM3, con una secuencia de 8 pb entre dos grupos de 11 y 4 repeticiones, y HLM5, con 8 pb entre dos grupos de 9 y 7 repeticiones.

El problema que surge al utilizar una sonda tan corta es que también puede detectar microsatélites de pocas repeticiones, como HLM1, HLM4 y HLM5.

BIBLIOGRAFÍA

- Ellegren H., M. Johansson, K. Sandberg and L. Andersson. 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse. *Animal Genetics*, 23: 133-142.
- Grobet L., A. Schwers, J. Roupain et R. Janset. 1991. Les empreintes génétiques et autres marqueurs dans les controles de fillation chez les animaux domestiques. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 135: 245-253.
- Guérin, G. and M. Bertaud. 1996. Characterization of two new horse microsatellites: HMS15 and HMS20. *Animal Genetics*, 27: 123.
- Marklund S., H. Ellegren, S. Eriksson, K. Sandberg and L. Andersson. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*, 25: 19-23.
- Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1216.
- Moazami-Goudarzi, K., D. Vaiman, D. Mercier, C. Grobs, J.P. Furet, H. Levéziel et P. Martin. 1994. Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers résultats. *Génétique Sélection Evolution*, 26: 155-165.
- Stallings, R.L., A.F. Ford, D. Nelson, D.C. Tomey, C.E. Hildebrand and R.K. Moyzis. 1991. Evolution and distribution of GT_n repetitive sequences in human genomes. *Genomics*, 10: 807-815.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Vega Pla, J.L. 1996. Polimorfismo de ADN equino. Obtención de marcadores moleculares y su aplicación al control de paternidad. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.