Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Jaime Figueroa V.
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Manuel Ortiz L.
CENTRO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MONTAJE DE UN SISTEMA DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARA GENOTIPIFICACIÓN DE DEFICIENCIA DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA BOVINA (BLAD) Y DE DEFICIENCIA DE ARGININOSUCCINATO SINTETASA BOVINA (CITRULINEMIA BOVINA).

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico

HÉCTOR PATRICIO SEPÚLVEDA MUÑOZ

VALDIVIA - CHILE

2006

A mis padres, mis hermanos, mi abuelo y a mi familia entera.....

Agradecimientos

Quiero agradecer sinceramente en forma especial a mi profesor patrocinante, Dr. Jaime Figueroa por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio así como por su confianza entregada, su apoyo, dedicación, tiempo y por enseñarme a aprender de los errores y saber superarlos, lo que me permitió terminar con éxito el presente trabajo.

Al Dr. Manuel Ortiz por su confianza entregada, por darme la oportunidad de trabajar en un área no muy explotada por el químico farmacéutico y por dejarme trabajar en el Laboratorio de Grupos Sanguíneos del Centro de Inseminación Artificial de esta universidad durante la implementación de estas técnicas.

Al prontamente Dr. Alex Romero por su amistad e invaluable ayuda para resolver todas mis inquietudes y su buena disposición en todo.

A mis compañeros de laboratorio Chani, Denise, Ariel, Tamara por su ayuda y apoyo en el trabajo de laboratorio. A Marcos Paredes por su amistad, ayuda en el desarrollo de mi trabajo experimental y por las buenas conversaciones en el laboratorio así como fuera de este.

A la Dra. Gudrum Kausel por sus consejos, apoyo y disponibilidad durante el desarrollo experimental de este trabajo.

A amigos(as) Karina, Norma, Pancho, Maca, Joaquín, Paulo, Marisol, Juan Antonio y Cristián por sus palabras de apoyo y amistad eterna.

A todos mis amigos (as) gracias por su amistad y apoyo.

A todos(as) infinitas gracias..

INDICE DE CONTENIDOS

Página

Agradecimientos

INDICE DE CONTENIDOS **I**

INDICE DE FIGURAS **V**

LISTA DE ABREVIATURAS **IX**

1. RESUMEN **1**

SUMMARY **2**

2. INTRODUCCION **3**

3. MATERIALES Y MÉTODOS **12**

3.1 Materiales 12

3.1.1 Reactivos 12

3.1.2 Instrumentos utilizados 13

3.1.3 Obtención de muestras y animales de experimentación 14

3.1.4 Diseño de partidores 15

3.1.4.1 Citrulinemia 15

3.1.4.2 BLAD 15

3.2 Métodos 15

3.2.1 Obtención de DNA genómico 15

3.2.1.1 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre 16

3.2.1.1.1 Método A 16

3.2.1.1.2 Método B 17

3.2.1.1.3 Método C 18

3.2.1.1.4 Método D 19

3.2.1.2 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de pelo 20

3.2.1.3 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de semen 21

3.2.2 Cuantificación del DNA 22

3.2.3 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) 22

3.2.3.1 PCR – Determinación Citrulinemia 22

3.2.3.1.1 Determinación de temperatura de reasociación 22

3.2.3.1.2 Condiciones de denaturación, reasociación y extensión de PCR 23

3.2.3.1.3 Determinación de rango de cantidad de DNA genómico y concentración de $MgCl_2$ para reacción de PCR 23

3.2.3.1.4 Mezcla de reacción para PCR 25

3.2.3.2 PCR – Determinación BLAD. Método 1 26

3.2.3.2.1 Determinación de temperatura de reasociación 26

3.2.3.2.2 Condiciones de denaturación, reasociación y extensión de PCR 26

3.2.3.2.3 Determinación de rango de cantidad de DNA genómico y concentración de $MgCl_2$ para reacción de PCR 27

3.2.3.2.4 Mezcla de reacción para PCR 28

3.2.3.3 PCR – Determinación BLAD. Método 2 28

3.2.3.3.1 Determinación de temperatura de reasociación 28

3.2.3.3.2 Condiciones de denaturación, reasociación y extensión de PCR 29
3.2.3.3.3 Determinación de rango de cantidad de DNA genómico y concentración de $MgCl_2$ para reacción de PCR 29
3.2.3.3.4 Mezcla de reacción para PCR 30
3.2.4 Digestión del DNA amplificado por PCR con enzimas de restricción (RFLP) 31
3.2.4.1 Determinación de tiempos de digestión, determinación Citrulinemia 31
3.2.4.2 Determinación de tiempos de digestión, determinación BLAD. Método 1 y método 2 31
3.2.4.3 Digestión – determinación Citrulinemia 32
3.2.4.4 Digestión – determinación BLAD. Método 1 y método 2 32
3.2.5 Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa 32
3.2.6 Fraccionamiento de DNA en gel de poliacrilamida nativo para determinación de BLAD 34
3.2.6.1 Fraccionamiento de DNA en gel de poliacrilamida nativo en gradiente 34
3.2.6.2 Fraccionamiento de DNA en gel de poliacrilamida nativo al 8% 35
4. RESULTADOS 36
4.1 Extracción de DNA genómico 36
4.2 Resultados determinación de Citrulinemia 39
4.3 Resultados determinación de BLAD. Método 1 y método 2 52

4.3.1 Resultados determinación de BLAD. Método 1 53

4.3.2 Resultados determinación de BLAD. Método 2 65

5. DISCUSIÓN 76

5.1 Extracción de DNA 76

5.2 Determinación de Citrulinemia y BLAD 79

6. BIBLIOGRAFÍA 90

7. ANEXOS 96

7.1 Anexo 1. Soluciones usadas y preparación de estas 96

7.2 Anexo 2. Equipos principales utilizados 99

7.3 Anexo 3. Reproductores usados (Frizón Negro y Frizón Rojo) 101

7.4 Anexo 4. Análisis de secuencia de partidores en BLAST. Determinación de Citrulinemia 102

7.5 Anexo 5. Análisis de secuencia de partidores en BLAST. Determinación de BLAD. Método 1 103

7.6 Anexo 6. Análisis de secuencia de partidores en BLAST. Determinación de BLAD. Método 2 104

7.7 Anexo 7. Análisis de secuencia de partidores en BLAST. Determinación de BLAD. 105

7.8 Anexo 8. Alineamiento secuencia gen CD18 bovino / secuencia del cDNA del gen CD18 bovino. Determinación de BLAD 106

7.9 Anexo 9. Segmento de la secuencia del cDNA del gen CD18 bovino y ubicación de los partidores para determinar BLAD a través de método 1 y método 2 107

INDICE DE FIGURAS

Página

Extracción de DNA

FIGURA 1: Calidad de DNA genómico en gel de agarosa 38

Determinación Citrulinemia

FIGURA 2: Ubicación de los partidores en el cDNA del gen de la argininosuccinato sintetasa bovina 41

FIGURA 3: Gradiente de temperatura para determinación de temperatura de reasociación 42

FIGURA 4: Determinación de concentración de $MgCl_2$ en optimización de PCR con DNA de sangre, pelo y semen 43

FIGURA 5: Determinación para PCR de cantidad de DNA genómico extraído de muestras de sangre, pelo y semen para PCR 44

FIGURA 6: Amplificación por PCR de DNA genómico de sangre, pelo y semen 47

FIGURA 7: Sitio de restricción para enzima *Ava*II en segmento amplificado 48

FIGURA 8: Esquema de fraccionamiento de los productos de digestión 49

FIGURA 9: Determinación de tiempo de digestión de productos de amplificación 50

FIGURA 10: Digestión de productos de amplificación obtenidos a partir de muestras de DNA genómico de sangre, pelo y semen 51

Determinación BLAD. Método 1 y método 2.

FIGURA 11: Ubicación de los partidores y sitios de restricción para enzima *Taq*I en Gen CD18 bovino para determinación de BLAD a través de método 1 y método 2 57

FIGURA 12: Esquema de fraccionamiento de los productos de digestión (método 1) 58

FIGURA 13: Esquema de fraccionamiento de los productos de digestión (método 2) 59

Determinación BLAD. Método 1.

FIGURA 14: Gradiente de temperatura para determinación de temperatura de reasociación 60

FIGURA 15: Primera digestión de productos de amplificación 61

FIGURA 16: Determinación de concentración de $MgCl_2$ y cantidad de DNA en optimización de PCR a partir de DNA genómico de sangre 62

FIGURA 17: Amplificación por PCR del DNA genómico extraído a partir de muestras de sangre y determinación de tiempo de digestión de productos de amplificación 63

FIGURA 18: Digestión de productos de amplificación 64

Determinación BLAD. Método 2.

FIGURA 19: Gradiente de temperatura para determinación de temperatura de reasociación 69

FIGURA 20: Determinación de concentración de $MgCl_2$ en optimización de PCR a partir de DNA genómico extraído de sangre 70

FIGURA 21: Determinación de cantidad de DNA genómico de muestras de sangre, pelo y semen para PCR 71

FIGURA 22: Amplificación por PCR de DNA genómico de sangre, pelo y semen 72

FIGURA 23: Determinación de tiempo de digestión de productos de amplificación 73

FIGURA 24: Digestión de productos de amplificación obtenidos a partir de muestras de DNA genómico de sangre, pelo y semen 74

FIGURA 25: Digestión de productos de amplificación obtenidos a partir de DNA genómico de sangre 75

LISTA DE ABREVIATURAS

ASS	Argininosuccinato sintetasa
ABF	Azul de bromofenol
BLAD	Deficiencia de adhesión leucocitaria bovina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acido etiléndiamino tetracético
FR	Frizón rojo
FN	Frizón negro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de polimerización de DNA en cadena
rpm	Revoluciones por minuto
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
SB	Tampón NaOH/acido borico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TE	Tampón Tris-HCl; EDTA
TEMED	N`N`N`N`-tetrametiletilendiamina
TBE	Tampón Tris, borato, EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
U	Unidad o unidades
V	Volt
XC	Xilene cianol

1. RESUMEN

La deficiencia de adhesión leucocitaria bovina (BLAD) y la deficiencia de argininosuccinato sintetasa bovina (Citrulinemia Bovina) son enfermedades autosómicas recesivas y son letales en ganado Holstein Friesian afectados. BLAD se caracteriza por una mutación en el gen CD18 causando que los leucocitos no migren fuera de los vasos sanguíneos hacia los sitios de la infección. Por otra parte, Citrulinemia bovina es caracterizada por una hiperamonemia debido a una deficiencia de la enzima del ciclo de la urea, la argininosuccinato sintetasa. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un análisis confiable para diagnosticar estas enfermedades genéticas. La metodología descrita está basada específicamente en PCR seguido por RFLP. Este método fue diseñado para ser usado por el centro de inseminación artificial de la UACh para la genotipificación de su ganado y para ser ofrecido como producto de servicio para el resto del país. Para la determinación de BLAD dos pares de partidores fueron usados probando así dos métodos diferentes a otros usados en anteriores publicaciones. La extracción de DNA genómico desde muestras de sangre, pelo y semen fue realizada utilizando Chelex-100 al 5%. Los resultados fueron validados por comparación con aquellos obtenidos usando la técnica tradicional de extracción de DNA de fenol/cloroformo. Para la identificación de Citrulinemia y BLAD se usó una reacción de PCR seguido por análisis con las enzimas de restricción *Ava*II y *Taq*I, respectivamente. Los fragmentos de restricción resultantes fueron visualizados en geles de agarosa y poliacrilamida, nativos y en gradiente. Los resultados aquí obtenidos identificaron en forma rápida e inequívoca a los individuos homocigotos sanos para ambas enfermedades.

SUMMARY

The bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and the bovine argininosuccinate synthetase deficiency (Bovine Citrullinemia) are both autosomal recessive lethal diseases that affect Holstein Friesian cattle. BLAD is characterized by mutations in the CD18 gene that cause leukocytes to be unable to travel outside blood vessels towards sites of infection. On the other hand, Bovine Citrullinemia is characterized by hyperammonemia due to deficiency of the urea cycle enzyme, argininosuccinate synthetase. The objective of this work was to develop a reliable assay to diagnose these genetic diseases. The methodology described here is based on a specific polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. This method was intended to be used by the "Centro de Inseminacion Artificial" of the Universidad Austral de Chile (UACh) for the genotyping of their cattle and to be offered as a service product to the rest of the country. For the determination of BLAD two pairs of primers were used. Thus, we designed two different methods from the ones used by other publications. The extraction of bovine genomic DNA from blood samples, hair and semen was made with Chelex-100 used at 5%. These results were compared with more traditional techniques like phenol/chloroform DNA extraction to validate the data. PCR based DNA amplification followed by analysis with the restriction enzymes *Ava*I and *Taq*I were used for the identification of Citrullinemia and BLAD respectively. The resulting restriction fragments were visualized in regular agarose and non-denaturing polyacrilamide gels in gradient. Genotypification of BLAD and Bovine Citrullinemia by the method described here rapidly and unequivocally identifies normal individuals from those with the disease.

2. INTRODUCCION

El ganado Holstein Friesian presenta distintas enfermedades genéticas hereditarias tales como deficiencia de adhesión leucocitaria bovina (BLAD), deficiencia de argininosuccinato sintetasa bovina (Citrulinemia Bovina), deficiencia de uridin–5-monofosfato sintetasa (DUMPS) y complejo de malformación vertebral (CVM) (Citek et al., 2004) entre otras, en el presente trabajo solo se tratará el montaje de las técnicas de determinación para Citrulinemia y BLAD las cuales son las más comunes.

La determinación a través de la reacción de polimerización de DNA en cadena (PCR) y fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) de Citrulinemia y BLAD es de gran importancia debido a que por las prácticas de inseminación artificial, el incremento de parentesco entre individuos de la misma raza es muy alto ya que se ocupan muy pocos toros altamente seleccionados. Esto explica como un alelo poco frecuente puede aumentar progresivamente dentro de una raza en muy pocas generaciones (Zaragoza et al., 1994), debido a esto la importancia de contar con estas técnicas como metodologías de genotipificación.

CITRULINEMIA BOVINA

La deficiencia de argininosuccinato sintetasa bovina (Citrulinemia Bovina) es una enfermedad autosómica recesiva (Dennis et al., 1989; Robinson et al., 1993; Citek et al., 2004) cuya característica es una hiperamonemia debido a la interrupción del ciclo de la urea resultando en coma y muerte al no haber un tratamiento vigoroso (Dennis et al.,

1989). Como características de la enfermedad, se ha descrito que los terneros afectados son clínicamente normales inmediatamente después del nacimiento. Dentro de sus primeras 24 horas de vida se vuelven decaídos, luego de 3 a 4 días vagan sin rumbo fijo o parados con su cabeza apoyada en la pared o cerca, por 4 o 5 días desarrollan convulsiones, seguido por colapso y muerte. El edema en la corteza cerebral es una consistente lesión histológica así como la concentración de citrulina es altamente elevada en sangre, fluido cerebroespinal, en los fluidos de los ojos y tejido cerebral (Healy et al., 1990).

Citrulinemia es una falla en el metabolismo del ciclo de la urea debido a la deficiencia de la enzima argininosuccinato sintetasa (ASS) la cual cataliza la condensación de aspartato y citrulina en ácido argininosuccinato. En el cDNA bovino mutado, existen dos mutaciones, la mutación (C $\rightarrow$ T) en la primera posición del codón 86 en el exon 5 (contando metionina como codón numero uno) en el gen que codifica para ASS, esto convierte el codón arginina CGA al codón de terminación TGA. Una segunda mutación (C $\rightarrow$ T) es un polimorfismo que se produce en la tercera posición del codón 175 que convierte el codón CCC a CCT, esta mutación representa una mutación silenciosa en la que no se altera la secuencia aminoácidica (Dennis et al., 1989). Cabe señalar que la proteína normal contiene 412 aminoácidos (Citek et al., 2004). La mutación y el polimorfismo fué confirmado por amplificación de DNA genómico por Dennis et al. (1989).

Cabe señalar que Citrulinemia se relaciona con líneas genéticas del reproductor estadounidense Gray-View Crisscross.

BLAD

La deficiencia de adhesión leucocitaria bovina (BLAD) es una enfermedad autosómica recesiva (Shuster et al, 1992; Gilbert et al., 1993; Zaragoza et al, 1994; Nagahata et al, 1997; Felmer et al., 2001; Nagahata H., 2004) caracterizada por terneros sanos al momento de su nacimiento, pero al cabo de 7 días comienzan con infecciones bacterianas recurrentes de tejidos blandos como estomatitis granulomatosa y ulcerativa, enteritis (Gilbert et al., 1993; Felmer et al., 2001), neumonitis, gingivitis ulcerativa (Gilbert et al., 1993; Nagahata et al., 1993; Zaragoza et al, 1994; Ribeiro et al., 2000; Felmer et al., 2001), periodontitis (Gilbert et al., 1993; Nagahata et al., 1993; Felmer et al., 2001), diarrea crónica (Zaragoza et al, 1994), perdida de dientes, crecimiento frenado (Nagahata et al., 1993; Zaragoza et al, 1994; Ribeiro et al., 2000) cicatrización defectuosa (Gilbert et al., 1993; Felmer et al., 2001), neutrofilia persistente y progresiva (Gilbert et al., 1993; Nagahata et al., 1993; Ribeiro et al., 2000; Felmer et al., 2001). Neutrófilos funcionalmente anormales en cuanto a motilidad, fagocitosis y capacidad oxidativa. A la necropsia se observan numerosos neutrófilos en capilares sinusoides y vasos sanguíneos, contrastando con el bajo número de neutrófilos extravasculares en los tejidos inflamados y en los que se observan sobrecrecimiento de microorganismos. Las lesiones histopatológicas más frecuentes registradas son enteritis necrótica, hiperplasia linfoide e histiocitosis de los ganglios linfáticos. En muchos casos el examen histológico confirmó lesiones macroscópicas de neumonía o abscesos pulmonares. También se han diagnosticado laringitis y traqueitis así como hiperplasia

mieloide de la médula ósea (Gilbert et al., 1993; Felmer et al., 2001). La muerte del animal se produce entre las 7 semanas y los 8 meses de vida (Zaragoza et al., 1994).

La causa de la inmunodeficiencia es una extremadamente reducida expresión de las β2-integrinas heterodimericas LFA-1, Mac 1 y p150,95 en los leucocitos (Shuster et al., 1992; Tammen et al., 1996; Nagahata et al., 1997; Nagahata et al., 2002), denominadas también como CD11/CD18 por la Organización Mundial de la Salud. Estas glicoproteínas integrales de la membrana de los leucocitos están constituidas por una subunidad α distinta (CD11a, CD11b y CD11c) (Shuster et al., 1992; Zaragoza et al, 1994; Ribeiro et al., 2000; Felmer et al., 2001) y una subunidad β en común (CD18) (Shuster et al., 1992; Zaragoza et al, 1994; Nagahata et al., 1996; Tammen et al., 1996; Ribeiro et al., 2000) y que se agrupan en: - CD11aCD18 (LFA-1), receptor para ICAM-1 en el endotelio vascular; -CD11bCD18 (Mac-1), receptor para C3i (fagocitosis opsónica); - CD11cCD18 (p150,95), receptor para C3i y fibrinógeno (Felmer et al., 2001). Estas glicoproteínas son vitales en las reacciones de adhesión célula-célula y célula-sustrato en el cuerpo (Gilbert et al., 1993; Nagahata H., 2004). La unión especifica de Mac-1 y LFA-1 en superficies de neutrófilos con la molécula de adhesión intercelular 1 expresada en el endotelio vascular es requerida para la migración de neutrófilos en sitios extravasculares de inflamación (Gilbert et al., 1993). El defecto en la expresión de CD18 por una secuencia anormal del gen origina la falta de la subunidad α en la integrina β2 (proteína que atraviesa la membrana plasmática) de las membranas de los neutrófilos aislados de animales enfermos, esto origina la alteración en el trasporte de los leucocitos desde la sangre a los lugares de infección (Zaragoza et al, 1994).

El gen normal para la proteína bovina CD18, que codifica para la subunidad β de las integrinas, así como la identificación del alelo bovino CD18 defectuoso fueron secuenciados por Shuster et al. (1992), identificándose en el gen defectuoso una mutación (A → G) producto de una sustitución de una adenina por una guanina en la posición 383 en el cDNA del gen CD18 (Genbank M81233) (Anexo 9) que causa un cambio de ácido aspártico (D) por glicina (G) en el aminoácido 128 en la glicoproteína (Shuster et al., 1992; Ribeiro et al., 2000; Nagahata H., 2004). La mutación se localiza en la región extracelular, altamente conservada, tanto en humano y bovino a través de las subunidades β (Shuster et al., 1992; Felmer et al., 2001; Nagahata H., 2004). Una mutación silente de una citosina por timina, fue detectada en la posición 775 en el cDNA del gen CD18 la cual no causa una alteración en la secuencia de aminoácidos (Shuster et al., 1992; Ribeiro et al., 2000; Nagahata H., 2004).

Este gen tiene 2 alelos; el D128 (normal) y el D128G (mutado). El alelo normal (D128) es dominante sobre el alelo que produce la enfermedad (D128G) el cual es recesivo. Para que se exprese el alelo recesivo, el individuo ha de tener la condición homocigótica recesiva, pues cuando le acompaña el alelo normal (heterocigoto), el individuo es normal, a pesar de ser portador del alelo mutado. Los individuos pueden presentar tres genotipos diferentes. Individuos normales (sanos) homocigotos dominantes D128/D128. Individuos normales (sanos pero portadores) heterocigotos D128/D128G. Individuos enfermos (BLAD) homocigotos recesivos D128G/D128G (Zaragoza et al. 1994).

Los partidores diseñados por Shuster et al. (1992) han sido usados por otros autores como Nagahata et al. (1993) y Zaragoza et al. (1994) entre otros. Distintas

metodologías de amplificación de DNA con diseños de otros partidores han sido utilizadas por otros autores tales como Tammen et al. (1996), Kriegesmann et al. (1997) y Ribeiro (2000) entre otros para determinar esta enfermedad genética. En nuestro país en el año 2001, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) en su Centro Regional de Investigación Carillanca de Temuco montó una metodología para determinar BLAD sobre la base de PCR y RFLP basándose en los partidores usados por Tammen et al. (1996). Felmer et al. (2001), estableció que de los 56 toros genotipificados pertenecientes a la zona entre la novena y décima región, uno resulto ser portador (Frizón negro) de esta deficiencia genética y de las 3 vacas analizadas se determinó que dos de ellas eran portadoras también del alelo mutado. Del análisis de los 56 toros determinó una frecuencia genotípica de 1,79% y una frecuencia génica o alélica del alelo mutado de 0,89%. La frecuencia genotípica de los portadores es inferior al 14,1% señalado por Shuster et al. (1992) para EEUU, la diferencia puede haber sido porque se usó sólo una parte de los reproductores machos del sur de Chile, provenientes de criadores e inscritos en registros genealógicos y no a la masa total de reproductores usados en estas dos regiones. No se puede descartar que se haya podido producir una mutación en el gen CD18 en algunos de los reproductores usados en algún momento (Felmer et al., 2001).

La presencia de la raza Holstein Friesian en Chile se remonta a principios de siglo con las primeras importaciones de ganado procedente de EEUU. Posteriormente se desarrolló en base a cruzamiento con ganado de origen Frisón y constantes incorporaciones de nuevas corrientes de sangre procedentes de EEUU y Canadá. La principal característica de la raza es convertir con mayor eficiencia que otras razas

lecheras sus alimentos en leche, basándose su alimentación en recursos forrajeros de mayor nivel nutricional como granos y cultivos suplementarios de invierno y verano. Su distribución en el país abarca desde la V^{a} hasta la X^{a} región. La introducción de la raza Holstein en el sur de Chile es muy posterior a la de la aparición de la mutación en EEUU por lo que el gen no tuvo la misma oportunidad para difundirse antes de que se conociera la enfermedad. Esta raza en la zona central presenta registros genealógicos desde 1946 por lo que es posible suponer que la frecuencia génica y de portadores puede ser mucho más en la zona central de Chile que en estas dos regiones (Felmer et al., 2001).

El hecho de que se haya vendido semen en Chile antes del descubrimiento de la enfermedad determina que el alelo mutado esté presente en Chile. Existe la prohibición de entrar al país semen de toros portadores de BLAD pero se hace necesario la genotipificación de los reproductores de origen nacional así como de vacas en que sus ancestros fueron inseminados. Importante es señalar que BLAD se relaciona con líneas genéticas del reproductor estadounidense Osborndale Ivanhoe, nacido en 1952 (Felmer et al., 2001). Otros reproductores portadores del defecto también de ese país son: Carlin-M Ivanhoe Bell, Penstate Ivanhoe Star (Nagahata et al., 2004), Thonyma Secret Rippvalley NA Bell Troy. En Canadá BLAD se manifiesta entre los descendientes de Puget Sound Sheik.

Sobre la base de los antecedentes obtenidos por Felmer et al. (2001), en relación a BLAD, así como el desconocimiento de la presencia o ausencia de Citrulinemia en el país se diseño la siguiente hipótesis:

“Enfermedades genéticas causadas por mutaciones puntuales como BLAD y Citrulinemia Bovina, pueden ser caracterizadas molecularmente por PCR y RFLP en muestras de pelo, semen y sangre”.

El **objetivo general** de este trabajo es el montaje y estandarización de una metodología para el diagnóstico de estas enfermedades genéticas basándose en PCR y RFLP, con variación a anteriores técnicas publicadas, para su posterior puesta en servicio por parte del Centro de Inseminación Artificial de la UACh para la genotipificación de su ganado y como servicio para el resto del país.

Dentro de los **objetivos específicos**:

- Probar nuevos métodos de extracción de DNA para estas dos enfermedades.
- Probar nuevos partidores para BLAD y montar nuevos métodos de determinación a los descritos por otros autores.
- Montar metodología de determinación de Citrulinemia.
- Montaje y estandarización de las metodologías en el laboratorio de grupos sanguíneos del Centro de Inseminación Artificial de la UACh para muestras de sangre, pelo y semen.

Para la determinación de BLAD a través del método 1 y método 2 que se describirán más adelante, se usó la secuencia de DNA del gen CD18 (Genbank Y12672) con el que se diseño un par de partidores para el método 1. Para el método 2

se usó el partidor FOR descrito por Shuster el al. (1992) y el REW diseñado para el método 1. Para Citrulinemia se ocupó los partidores descritos por Dennis et al. (1989).

Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1988) se amplificó DNA genómico, luego se realizó digestiones con enzimas de restricción (RFLP) con las cuales se determinó el genotipo del ganado bovino usado. Estas técnicas permiten identificar homocigotos sanos, homocigotos enfermos así como heterocigotos portadores para estas enfermedades genéticas. Mediante el uso de enzima de restricción *Taq*I para BLAD y *Ava*II para Citrulinemia bovina se realizaron las digestiones para luego observar los patrones de bandas en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Dennis et al., 1989; Shuster et al., 1992; Kriegesmann et al., 1997).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.

3.1.1 Reactivos.

En Sigma Chemical Co., se adquirió ácido bórico, bromuro de etidio, xylene cyanol, azul de bromofenol, Tritón X-100.

Del distribuidor Winkler Ltda. se adquirió cloroformo, isopropanol, sodio lauril sulfato (SDS), agarosa, cloruro de potasio, hidróxido de sodio, sacarosa, tris base, acrilamida – bisacrilamida 29:1, persulfato de amonio.

En Merck (Darmstadt, Alemania), se adquirió cloruro de magnesio, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, alcohol isoamílico, glicerol.

Del proveedor US Biological se adquirió acetato de sodio, tris base.

En Scharlau Chemie S.A. se adquirió el cloruro de sodio.

El ácido etiléndiamino tetracético (EDTA), fenol, etanol absoluto, se adquirieron en Reedel-de Haen.

De Invitrogen se adquirió DTT, proteinasa K, dNTPs, TEMED.

En Biolabs se adquirió marcadores de tamaño molecular de 50 pb y 100 pb.

En Bio-Rad Laboratories se adquirió Chelex-100 grado biología molecular.

De Caledon se adquirió ácido clorhídrico.

De Fermentas se adquirió la enzima de restricción *Ava*II (10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 100 mM KCl; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 0,2 mg/ml BSA y 50% glicerol) con su correspondiente tampón, tampón R (10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 10 mM $MgCl_2$; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml BSA).

En Promega se adquirió la enzima *Taq* DNA polimerasa almacenada en tampón B (20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% glicerol; 0,5% Tween® 20 y 0,5% Nonidet® – P40) junto a sus soluciones: Cloruro de magnesio 25 mM, 10x tampón DNA polimerasa libre de magnesio (1X: 10 mM Tris-HCl (pH 9,0); 50 mM KCl y 0,1% Triton® X-100). Se adquirió además la enzima de restricción *Taq*I (10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 300 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% glicerol y 0,5 mg/ml BSA) con su correspondiente tampón, tampón E (1X: 6 mM Tris-HCl; 6 mM $MgCl_2$; 100 mM NaCl; 1 mM DTT).

3.1.2 Instrumentos utilizados.

- Espectrofotometro, Shimadzu UV 1203
- Baño termorregulado, KiotoYCW-03S
- Microcentrifuga, Boeco M-240R, tipo 2405-13
- Termociclador, Thermo Electron corporation (Px2 Thermal cycler)
- Fuente de poder, BRL Life Technologies,INC, Model 4000
- Balanza, KERN (440-33)
- CCD Camera, Spectroline model CA 1000/F
- Video Archival unit, Spectroline model AU-1000/F
- Impresora, Sony UP-860
- Micro ondas, Samsung
- Vortex, Velp científica
- Agitador magnético Matheson Scientific (Magnestir)
- pH metro WTW (pH 530)

- Micropipetas Gilson y Eppendorf.
- Sistema desionizador de agua Cole Palmer
- Autoclave Orthman
- Agitador orbital Electronica (IKA-VIBRAX-VXR)
- Transiluminador Vilbert Loumart (TFX-20 M)

3.1.3 Obtención de muestras y animales de experimentación.

Se utilizaron muestras de sangre, pelo y semen de toros de raza Frizón Negro (FN) y Frizón Rojo (FR) con porcentaje de raza Holstein Friesian pertenecientes al Centro de Inseminación Artificial (CIA) de la Universidad Austral de Chile-Valdivia.

Las muestras de pelo, sangre y semen se obtuvieron de toros vivos. Las muestras de semen de toros vivos así como de toros no existentes físicamente son almacenados en nitrógeno liquido con el fin de su uso en inseminación artificial. Las muestras de sangre entera poseían antiacoagulante EDTA y las muestras de semen se encontraban diluidas en un volumen aproximado de 500 μl con una solución Tris - ácido cítrico como tampón, fructosa, yema de huevo, glicerina, penicilina y estreptomicina conteniendo por dosis una cantidad aproximada de 30 millones de espermatozoides.

Se usaron 4 animales de experimentación (Anexo 3) a los cuales se les extrajeron los 3 distintos tipos de muestras por animal para estandarización de los métodos, estos animales son: **Mustafa FR** (62,5%)**, Mosco FR** (50%)**, Lego FN** (25%) **y Marlín FR** (12%)**,** los cuales desde ahora en adelante serán identificados como **individuo 1, individuo 2, individuo 3, individuo 4** respectivamente y cuyos porcentajes de Holstein Friesian se encuentran entre paréntesis.

3.1.4 Diseño de partidores.

3.1.4.1 Citrulinemia.

Se usaron los partidores utilizados por Dennis et al. (1989) siendo verificada su especificidad en forma teórica en la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST (Anexo 4).

3.1.4.2 BLAD.

Se usó el partidor FOR usado por Shuster et al. (1992) y se diseñó un par de partidores basándose en la secuencia del gen CD18 (GenBank Y12672), la especificidad de estos partidores fue verificada en forma teórica en la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST (Anexo 5 al 7).

Los oligonucleótidos fueron resuspendidos en tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

3.2 Métodos.

3.2.1 Obtención de DNA genómico.

El DNA genómico para la determinación de Citrulinemia y BLAD se obtuvo de muestras de sangre, pelo y semen de toros de raza Frizón Negro (FN) y Frizón Rojo (FR) con porcentaje de raza Holstein Friesian pertenecientes al Centro de Inseminación

Artificial (CIA) de la Universidad Austral de Chile-Valdivia. El método de extracción de DNA genómico se basó principalmente en el uso de Chelex-100 al 5%.

Para la determinación de Citrulinemia y BLAD (método 1), se utilizó además el método tradicional de fenol/cloroformo para corroborar los resultados obtenidos a través del uso de Chelex-100 como metodología de extracción de DNA.

3.2.1.1 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre:

3.2.1.1.1 Método A.

Se extrajo 200 μl de sangre total fresca colocándose en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregó 1000 μl de agua desionizada dejándose reposar por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 19000 x g por 3 minutos a 4ºC. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1000 μl de agua desionizada. Se centrifugó nuevamente a 19000 x g por 1 minuto a 4ºC eliminándose después el sobrenadante. Posteriormente se agregó al sedimento 1000 μl de solución de lisis de eritrocitos (5,4 g sacarosa; 500 μl Tris-HCl 1 M (pH 7,5); 125 μl $MgCl_2$ 2 M; 500 μl Tritón X-100 y agua desionizada para un volumen de 50 ml), se mezcló con micropipeta y luego manualmente por inversión. Se centrifugó a 1200 x g por 15 minutos a 4ºC y se eliminó posteriormente el sobrenadante. Se repitió este ultimo paso en que se agregó la solución de lisis de eritrocitos nuevamente al sedimento obtenido, se centrifugó a 1200 x g por 15 minutos a 4ºC y se eliminó el sobrenadante en su totalidad dejándose exclusivamente el sedimento obtenido. Posteriormente se agregó 1000 μl PBS 1X, se

mezcló con micropipeta y luego manualmente por inversión. Se centrifugó a 600 x g por 10 minutos a 4ºC y se eliminó el sobrenadante totalmente. Al sedimento obtenido se le agregó 200 µl de Chelex-100 al 5% el cual se agitó previamente para resuspender la resina extrayéndose con micropipeta con puntilla cortada para hacer más fácil y asegurar así su extracción del envase que lo contenía. Posteriormente se agregó 0,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml), se agitó manualmente por inversión por 10 segundos y se incubó por 60 minutos a 55 ºC en baño termorregulado (Anexo 2, figura c). Luego se calentó la muestra a 100ºC en un baño con agua desionizada en ebullición por 10 minutos. Posteriormente se mezcló manualmente por inversión por 10 segundos y se centrifugó a 19000 x g por 3 minutos a 4ºC. Finalmente se retiró el sobrenadante el cual contiene el DNA genómico extraído el que fue guardado a 4 ºC para su posterior cuantificación y uso para PCR.

3.2.1.1.2 Método B.

Se extrajó 200 µl de sangre total fresca colocándose en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se agregó 1000 µl de NaCl 0,9% y se agitó manualmente. Posteriormente se centrifugó a 600 x g por 5 minutos a 4ºC, luego se eliminó el sobrenadante y se agregó nuevamente 1000 µl de NaCl 0,9%, se mezcló manualmente por inversión y se centrifugó nuevamente a 600 x g por 5 minuto a 4ºC eliminándose después el sobrenadante. Posteriormente se agregó al sedimento 1000 µl de solución de lisis de eritrocitos (5,4 g sacarosa; 500 µl Tris-HCl 1 M (pH 7,5); 125 µl $MgCl_2$ 2 M; 500 µl Tritón X-100 y agua desionizada para un volumen de 50 ml), se mezcló con micropipeta

y luego manualmente por inversión, enseguida se centrifugó a 1200 x g por 15 minutos a 4ºC y se eliminó posteriormente el sobrenadante. Se repitió 2 veces este ultimo paso en que se agregó nuevamente al sedimento la solución de lisis de eritrocitos, se centrifugó a 1200 x g por 15 minutos a 4ºC y se eliminó el sobrenadante en su totalidad dejándose exclusivamente el sedimento. Luego se agregó 1000 μl PBS 1X, se mezcló con micropipeta y luego manualmente por inversión. Se centrifugó a 600 x g por 10 minutos a 4ºC y se eliminó el sobrenadante totalmente. Al sedimento obtenido se le agregó 200 μl de Chelex -100 al 5% el cual se agitó previamente para resuspender la resina extrayéndose con micropipeta con puntilla cortada. Posteriormente se agregó 0,5 μl de proteinasa K (20 mg/ml), se agitó manualmente por inversión por 10 segundos y se incubó por 60 minutos a 55 ºC en baño termorregulado. Luego se calentó la muestra a 100ºC en un baño con agua desionizada en ebullición por 10 minutos. Posteriormente se mezcló manualmente por inversión por 10 segundos y se centrifugó a 19000 x g por 3 minutos a 4ºC. Finalmente se retiró el sobrenadante el cual contiene el DNA genómico extraído el que fue guardado a 4 ºC para su posterior cuantificación y uso para PCR.

3.2.1.1.3 Método C.

Se extrajo 200 μl de sangre total fresca colocándose en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se agregó 1000 μl de agua desionizada dejándose reposar por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 19000 x g por 3 minutos a 4ºC. Se eliminó el sobrenadante lavándose el sedimento con 1000 μl de agua desionizada. Luego se

centrifugó nuevamente a 19000 x g por 2 minuto a 4ºC eliminándose después el sobrenadante. Al sedimento se le agregó 300 µl de tampón de lisis (NaCl 100 mM; Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 0,5%) y 0,5 µl de proteinsa K (20 mg/ml), se mezcló por inversión y se incubó en baño termorregulado a 37ºC por 20 minutos. Posteriormente se agregó 300 µl de fenol (equilibrado en Tris-HCl pH 7,5) / cloroformo / alcohol isoamílico en una relación 25:24:1 y se mezcló por inversión, enseguida se centrifugó a 19000 x g por 20 minutos recuperándose después la fase acuosa. Luego se agregó 100 µl de acetato de amonio 5M y 600 µl de etanol puro frío, se mezcló por inversión y se dejó a –20 ºC por toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 19000 x g por 20 minutos a 4ºC, se desechó el sobrenadante y se agregó etanol 80%, este paso se repitió dos veces más. Se eliminó el sobrenadante en su totalidad y se dejó evaporar el resto de etanol 80%. Finalmente se resuspendió el DNA genómico en 30 µl de agua desionizada estéril.

3.2.1.1.4 Método D.

Se extrajo 100 µl de sangre total fresca colocándose en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregó 1000 µl de agua desionizada dejándose reposar por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 19000 x g por 3 minutos a 4ºC. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1000 µl de agua desionizada, se centrifugó nuevamente a 19000 x g por 1 minuto a 4ºC eliminándose después el sobrenadante. Al sedimento se le agregó 200 µl de Chelex-100 al 5% el cual se agitó previamente para resuspender la resina extrayéndose con micropipeta con puntilla cortada

Posteriormente se agregó 1 μl de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló manualmente por inversión por 10 segundos y se incubó por 60 minutos a 55 ºC en baño termorregulado. Posteriormente se calentó la muestra a 100ºC en un baño con agua desionizada en ebullición por 8 minutos. Luego se mezcló manualmente por inversión por 10 segundos y se centrifugó a 19000 x g por 3 minutos a 4ºC. Finalmente se retiró el sobrenadante el cual contiene el DNA genómico extraído el que fue guardado a 4 ºC para su posterior cuantificación y uso para PCR.

3.2.1.2 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de pelo:

Asegurándose primero que contengan el folículo piloso, se extrajo 5 pelos con pinzas limpias desde el envase que contenía las muestras las cuales fueron lavadas en un vaso precipitado que contenía agua desionizada. Luego se sumergieron en otro vaso también con agua desionizada, esto con el fin de eliminar posibles contaminantes. Una vez lavados y limpios los pelos con su folículo piloso, se colocaron en una superficie limpia y se utilizó un bisturí para cortar una porción de 1 – 2 cm desde la raíz del pelo colocándose posteriormente estas muestras en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml previamente rotulado. Luego se les agregó 200 μl de Chelex-100 al 5% el cual se agitó previamente para resuspender la resina extrayéndose con micropipeta con puntilla cortada, se agregó además 0,5 μl de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló en forma manual y se incubó a 56ºC toda la noche en baño termorregulado. Posteriormente se agitó manualmente por inversión por 10 segundos y se centrifugó por 20 segundos a 9800 x g a temperatura ambiente. Luego se calentó la muestra a 100ºC en un baño con

agua desionizada por 10 minutos. Posteriormente se mezcló manualmente por inversión por 10 segundos y se centrifugó a 9800 x g por 5 minutos a 4ºC. Finalmente se retiró el sobrenadante el cual contiene el DNA genómico extraído y fue guardado a 4 ºC para su posterior cuantificación y uso para PCR.

3.2.1.3 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de semen:

Se extrajó 100 μl de semen diluido colocándose en tubos Eppendorf estéril de 1,5 ml, se centrifugó a 14000 x g por 3 minutos a 4ºC, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo en el sedimento las células espermáticas. Luego el sedimento se resuspendió en 500 μl de tampón de digestión (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% SDS), agregándose además 1μl proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 50ºC por 30 minutos en baño termorregulado. Posteriormente se agregó 7 μl de DTT 1M mezclándose manualmente por inversión y se incubó a 56ºC por 15 minutos en baño termorregulado. Inmediatamente después se les agregó 200 μl de Chelex-100 al 5% el cual se agitó previamente para resuspender la resina extrayéndose con micropipeta con puntilla cortada, se mezcló en forma manual y se incubó a 55ºC por 30 minutos en baño termorregulado. Posteriormente se colocaron los tubos Eppendorf con las muestras en un baño con agua desionizada en ebullición por 10 minutos. Luego se mezcló manualmente por inversión por 10 segundos y se centrifugó a 19000 x g por 5 minutos a 4ºC. Finalmente se retiró el sobrenadante el cual contiene el DNA genómico extraído y fue guardado a 4 ºC para su posterior cuantificación y uso para PCR.

3.2.2 Cuantificación del DNA.

La determinación de la concentración de DNA se realizó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203 (Anexo 2, figura a), teniendo como patrón que 1 unidad de Absorbancia corresponde a 50 µg/ml para DNA de doble hebra (Sambrook et al. 1989).

3.2.3 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

El DNA genómico fué amplificado por PCR (Saiki et al., 1988), las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador Thermo Electron Corporation (Px2 Thermal cycler) (Anexo 2, figura b). Las condiciones de denaturación, reasociación y extensión fueron estandarizadas para cada par de partidores. Para cada reacción de PCR se incluyó un control negativo, que no contiene el templado de DNA el cual fué reemplazado por agua desionizada estéril y tratada con luz UV con el fin de validar los resultados.

3.2.3.1 PCR - Determinación Citrulinemia.

3.2.3.1.1 Determinación de temperatura de reasociación.

Se utilizó el DNA genómico extraído de muestras de sangre. En una mezcla de reacción de 20 µl se adicionó 200 ng de DNA genómico; 0,8 µl de cada partidor (50 µM); 0,4 µl mix dNTPs (10 mM); 1,6 µl $MgCl_2$ (25 mM); 2 µl tampón PCR (10 X); 0,2 µl

Taq polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada estéril.

Las condiciones de amplificación por PCR de la gradiente de temperaturas para la determinación de la temperatura de reasociación fueron: Un paso inicial de denaturación de 94ºC por 5 min, 35 ciclos de denaturación de 94ºC por 45 s, una gradiente de temperaturas entre 47ºC y 62ºC por 45 s, y extensión de 72ºC por 15 s. El programa se terminó con una extensión final de 72ºC por 5 min, finalizando la reacción a 4ºC.

3.2.3.1.2 Condiciones de denaturación, reasociación y extensión de PCR.

Las condiciones de amplificación para PCR estandarizadas fueron: Un paso inicial de denaturación de 94ºC por 5 min, 35 ciclos de denaturación de 94ºC por 45 s, reasociación de 59,6ºC por 45 s, y extensión de 72ºC por 15 s. El programa se terminó con una extensión final de 72ºC por 5 min, finalizando la reacción a 4ºC.

3.2.3.1.3 Determinación de rango de cantidad DNA genómico y concentración de $MgCl_2$ para reacción de PCR.

Determinación de rango de cantidad DNA genómico para reacción de PCR.

Uso de DNA genómico extraído a partir de muestras de sangre y pelo. Se utilizaron dos baterías de tubos de PCR de 200 μl, una para cada tipo de muestra. Se adicionó 60ng; 100 ng; 300 ng; 600 ng; 1 μg y 1,2 μg de DNA genómico, en cada tubo

una cantidad de DNA, además para completar el volumen de 20 μl de cada tubo se agregó 0,8 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada.

Uso de DNA genómico extraído a partir de muestras de semen. Se utilizó una batería de tubos de PCR de 200 μl y en una mezcla de reacción de 20 μl se adicionó 2 ng; 7 ng; 10 ng; 20 ng; 50 ng; 150 ng; 300 ng y 600 ng de DNA genómico, en cada tubo una cantidad de DNA, para completar el volumen de reacción de cada tubo se adicionó además 0,4 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada.

Determinación de concentración de $MgCl_2$ (mM).

Usó de DNA genómico extraído a partir de muestras de sangre y pelo. Se utilizaron dos baterías de tubos de PCR de 200 μl, una para cada tipo de muestra. Se adicionó volúmenes de 0,4 μl; 0,8 μl; 1,6 μl; 2,4 μl y 2,8 μl de $MgCl_2$ (25 mM) correspondiente a concentraciones de 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 3 mM 3,5 mM respectivamente, en cada tubo una concentración de $MgCl_2$, se agregó además para completar el volumen de reacción de 20 μl de cada tubo, 200 ng de DNA genómico; 0,8 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada para cada tubo. Para uso de DNA genómico extraído a partir de muestras de semen se

utilizó también una batería de tubos de PCR de 200 μl y las diferencias con lo anteriormente descrito fueron la disminución a 0,4 μl de cada partidor (50 μM) y el uso de 10 ng de DNA genómico.

3.2.3.1.4 Mezcla de reacción para PCR.

Se trabajó con volúmenes de 20 μl y 35 μl. En una mezcla de reacción de 35 μl, y para uso de muestras de sangre y pelo, se adicionó 350 ng de DNA genómico; 1,4 μl de cada partidor (50 μM); 0,7 μl mix dNTPs (10 mM); 2,8 μl $MgCl_2$ (25 mM); 3,5 μl tampón PCR (10 X); 0,35 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada. Para uso de muestras de semen y como únicas diferencias a lo anteriormente descrito fué el uso de 17,5 ng de DNA genómico y 0,7 μl de cada partidor (50 μM) manteniéndose similares el resto de las condiciones.

En una mezcla de reacción de 20 μl, y para uso de muestras de sangre y pelo, se adicionó 200 ng de DNA genómico; 0,8 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada. Para uso de muestras de semen y como únicas diferencias a lo anteriormente descrito fué el uso de 10 ng de DNA genómico y 0,4 μl de cada partidor (50 μM) manteniéndose similares el resto de las condiciones.

3.2.3.2 PCR - Determinación BLAD. Método 1.

3.2.3.2.1 Determinación de temperatura de reasociación.

Se utilizó DNA genómico extraído de muestras de sangre. En una mezcla de reacción de 20 μl se adicionó 200 ng de DNA genómico; 0,2 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada.

Las condiciones de amplificación por PCR de la gradiente de temperaturas para la determinación de la temperatura de reasociación fueron: Un paso inicial de denaturación de 94ºC por 5 min, 35 ciclos de denaturación de 94ºC por 35 s, una gradiente de temperaturas entre 53ºC y 68ºC por 30 s, y extensión de 72ºC por 45 s. El programa se terminó con una extensión final de 72ºC por 5 min, finalizando la reacción a 4ºC.

3.2.3.2.2 Condiciones de denaturación, reasociación y extensión de PCR.

Las condiciones de amplificación para PCR estandarizadas fueron: Un paso inicial de denaturación de 94ºC por 5 min, 35 ciclos de denaturación de 94ºC por 35 s, reasociación de 63,3ºC por 30 s, y extensión de 72ºC por 45 s. El programa se terminó con una extensión final de 72ºC por 5 min, finalizando la reacción a 4ºC.

3.2.3.2.3 Determinación de rango de cantidad DNA genómico y concentración de $MgCl_2$ para reacción de PCR.

Determinación de rango de cantidad DNA genómico para reacción de PCR.

Uso de DNA genómico extraído a partir de muestras de sangre. Se utilizó una batería de tubos de PCR de 200 µl y en una mezcla de reacción de 20 µl se adicionó 60 ng; 100 ng; 350 ng; 600 ng y 1 µg de DNA genómico, en cada tubo una cantidad de DNA, para completar el volumen de reacción de cada tubo se adicionó además 0,1 µl de cada partidor (50 µM); 0,4 µl mix dNTPs (10 mM); 1,6 µl $MgCl_2$ (25 mM); 2 µl tampón PCR (10 X); 0,2 µl *Taq* polimerasa (5 U/µl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada.

Determinación de concentración de $MgCl_2$ (mM).

Uso de DNA genómico extraído a partir de muestras de sangre. Se utilizó una batería de tubos de PCR de 200 µl. Se adicionó volúmenes de 0,56 µl; 0,8 µl; 1,6 µl; 2,4 µl y 2,8 µl de $MgCl_2$ (25 mM) correspondiente a concentraciones de 0,7 mM; 1 mM; 2 mM; 3 mM 3,5 mM respectivamente, en cada tubo una concentración de $MgCl_2$, se agregó además para completar el volumen de reacción de 20 µl de cada tubo, 350 ng de DNA genómico; 0,1 µl de cada partidor (50 µM); 0,4 µl mix dNTPs (10 mM); 2 µl tampón PCR (10 X); 0,2 µl *Taq* polimerasa (5 U/µl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada para cada tubo.

3.2.3.2.4 Mezcla de reacción para PCR.

Se trabajó con volúmenes de 20 μl y 40 μl. En una mezcla de reacción de 40 μl, y para uso de muestra de sangre, se adicionó 700 ng de DNA genómico; 0,2 μl de cada partidor (50 μM); 0,8 μl mix dNTPs (10 mM); 3,2 μl $MgCl_2$ (25 mM); 4 μl tampón PCR (10 X); 0,4 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada.

En una mezcla de reacción de 20 μl, y para uso de muestras de sangre, se adicionó 350 ng de DNA genómico; 0,1 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada.

3.2.3.3 PCR - Determinación BLAD. Método 2.

3.2.3.3.1 Determinación de temperatura de reasociación.

Se utilizó DNA genómico extraído de muestras de sangre. En una mezcla de reacción de 20 μl se adicionó 150 ng de DNA genómico; 0,3 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada.

Las condiciones de amplificación por PCR de la gradiente de temperaturas para la determinación de la temperatura de reasociación fueron: Un paso inicial de denaturación de 94ºC por 5 min, 35 ciclos de denaturación de 94ºC por 30 s, una gradiente de temperaturas entre 54ºC y 69ºC por 30 s, y extensión de 72ºC por 15 s. El

programa se terminó con una extensión final de 72ºC por 5 min, finalizando la reacción a 4ºC.

3.2.3.3.2 Condiciones de denaturación, reasociación y extensión de PCR.

Las condiciones de amplificación para PCR estandarizadas fueron: Un paso inicial de denaturación de 94ºC por 5 min, 35 ciclos de denaturación de 94ºC por 30 s, reasociación de 69,2ºC por 30 s, y extensión de 72ºC por 15 s. El programa se terminó con una extensión final de 72ºC por 5 min, finalizando la reacción a 4ºC.

3.2.3.3.3 Determinación de rango de cantidad DNA genómico y concentración de $MgCl_2$ para reacción de PCR.

Determinación de rango de cantidad DNA genómico para reacción de PCR.

Uso de DNA genómico extraído a partir de muestras de sangre y pelo. Se utilizaron dos baterías de tubos de PCR de 200 μl, una para cada tipo de muestra. Se adicionó 60ng; 100 ng; 300 ng; 600 ng; 1 μg y 1,2 μg de DNA genómico, en cada tubo una cantidad de DNA, además para completar el volumen de 20 μl de cada tubo se agregó 0,3 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada para cada tubo.

Uso de DNA genómico extraído a partir de muestras de semen. Se utilizó una batería de tubos de PCR de 200 μl y en una mezcla de reacción de 20 μl se adicionó 2

ng; 7 ng; 10 ng; 20 ng y 50 ng de DNA genómico, en cada tubo una cantidad de DNA, para completar el volumen de reacción de cada tubo se adicionó además 0,2 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada para cada tubo.

Determinación de concentración de $MgCl_2$ (mM).

Usó de DNA genómico extraído a partir de muestras de sangre. Se utilizó una batería de tubos de PCR de 200 μl. Se adicionó volúmenes de 0,56 μl; 0,8 μl; 1,6 μl; 2,4 μl y 2,8 μl de $MgCl_2$ (25 mM) correspondiente a concentraciones de 0,7 mM; 1 mM; 2 mM; 3 mM 3,5 mM respectivamente, en cada tubo una concentración de $MgCl_2$, se agregó además para completar el volumen de reacción de 20 μl de cada tubo, 150 ng de DNA genómico; 0,3 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada para cada tubo.

3.2.3.3.4 Mezcla de reacción para PCR.

Se trabajó con volúmenes de 20 μl y 40 μl. En una mezcla de reacción de 40 μl, y para uso de muestra de sangre, se adicionó 300 ng de DNA genómico; 0,6 μl de cada partidor (50 μM); 0,8 μl mix dNTPs (10 mM); 3,2 μl $MgCl_2$ (25 mM); 4 μl tampón PCR (10 X); 0,4 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada.

En una mezcla de reacción de 20 μl, y para uso de muestras de sangre y pelo, se adicionó 150 ng de DNA genómico (sangre) / 200 ng de DNA genómico (pelo); 0,3 μl de cada partidor (50 μM); 0,4 μl mix dNTPs (10 mM); 1,6 μl $MgCl_2$ (25 mM); 2 μl tampón PCR (10 X); 0,2 μl *Taq* polimerasa (5 U/μl) completándose el volumen de reacción con agua desionizada. Para uso de muestras de semen y como únicas diferencias a lo anteriormente descrito fué el uso de 10 ng de DNA genómico y 0,2 μl de cada partidor (50 μM) manteniéndose similares el resto de las condiciones.

3.2.4 Digestión del DNA amplificado por PCR con enzimas de restricción (RFLP).

3.2.4.1 Determinación de tiempos de digestión, determinación Citrulinemia.

Se utilizó una batería de tubos con un volumen de reacción de 15 μl cada tubo, en cada tubo se adicionó 10 μl de producto de PCR (PCR a partir de muestra de sangre); 0,5 μl de enzima de restricción *Ava*II (Fermentas) (10 U/μl); 1,5 μl de tampón R (10X) correspondiente a la enzima y 3 μl de agua desionizada. Se incubó las muestras a 37 ºC por 1 h, 3 h, 5 h y 7 h en baño termorregulado.

3.2.4.2 Determinación de tiempos de digestión, determinación BLAD. Método 1 y método 2.

Se utilizó 2 baterías de tubos, una para cada método, con un volumen de reacción de 20 μl en cada tubo se adicionó 15 μl de producto de PCR (PCR a partir de

muestra de sangre); 0,5 μl de enzima de restricción *Taq*I (Promega) (10 U/μl); 2 μl de tampón E (10X) correspondiente a la enzima; 2,5 μl de agua desionizada. Se incubaron las muestras a 65ºC por 2 h, 4 h y 6 h en baño termorregulado para el método 1 y por 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 14 h en baño termorregulado para el método 2.

3.2.4.3 Digestión - determinación Citrulinemia.

La digestión se realizó en un volumen de reacción de 15 μl, se adicionó 10 μl de producto de PCR; 0,5 μl de enzima de restricción *Ava*II (Fermentas) (10 U/μl); 1,5 μl de tampón R (10X) correspondiente a la enzima y 3 μl de agua desionizada. Se incubó las muestras a 37 ºC por 3 h en baño termorregulado.

3.2.4.4 Digestión - determinación BLAD. Método 1 y método 2.

Para el método 1 y él método 2, la digestión se realizó en un volumen de reacción de 20 μl, se adicionó 15 μl de producto de PCR; 0,5 μl de enzima de restricción *Taq*I (Promega) (10 U/μl); 2 μl de tampón E (10X) correspondiente a la enzima y 2,5 μl de agua desionizada. Se incubó las muestras a 65 ºC por 5 h para el método 1 y por 2 h para el método 2 en baño termorregulado.

3.2.5 Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa.

Para determinar la calidad del DNA se usaron geles de agarosa al 0,8% y 1%, para los productos de amplificación obtenidos por PCR. Para determinación de Citrulinemia y BLAD se usaron geles de agarosa al 1,5% y para los productos de

digestión de los productos de amplificación se usaron geles al 2% de acuerdo a lo descrito por Sambrook et al. (1989).

La cantidad de agarosa en polvo (de acuerdo al porcentaje del gel) junto con el volumen de tampón SB1X requerido para el porcentaje y volumen del gel a preparar fue fundida en microondas, se dejó entibiar, se agregó bromuro de etidio (10 mg/ml) y se vació en un molde plástico con su respectiva peineta para la formación de los pocillos dando así forma al gel. Las muestras fueron cargadas con tampón de muestra 6X (0,25% XC FF; 0,25% ABF; 30% glicerol) y como tampón de corrida se usó SB 1X. La corrida electroforética se llevó a cabo a 50 mA ó 70 mA en forma constante dependiendo de la cámara electroforética usada. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta debido al uso de bromuro de etidio el cual se intercala al DNA permitiendo así la observación de las bandas y las imágenes fueron capturadas por una cámara fotográfica (Anexo 2, figura d). El tamaño de los fragmentos se estimó mediante marcadores de tamaño molecular, los cuales se cargaron al gel junto con las muestras y control negativo.

Para los productos de amplificación y de digestión para determinación de BLAD se usó tampón TBE 1X.

El volumen de tampón SB 1X ó TBE 1X, cantidad de agarosa y de bromuro de etidio, varió dependiendo de las cámaras de electroforesis usadas y de la concentración de los geles.

3.2.6 Fraccionamiento de DNA en gel de poliacrilamida nativo para determinación de BLAD.

Las cantidades de acrilamida – bisacrilamida 30%, persulfato de amonio 10%, TBE 5X y agua para los distintos % de geles se calcularon segun lo descrito por Sambrook et al. (1989).

3.2.6.1 Fraccionamiento de DNA en gel de poliacrilamida nativo en gradiente.

Para separar los fragmentos de los productos de digestión se realizó un gel de poliacrilamida nativo en gradiente de 3,5% a 8%, porcentajes requeridos y sugeridos para los fragmentos obtenidos y que son descritos junto a su preparación por Sambrook et al. (1989). Como gel espaciador se ocupó un gel al 3,5 % y como gel separador fue la gradiente la cual se hizó con un gel al 3,5% y otro al 8%. El volumen total para él gel de poliacrilamida fue de 6 ml, este volumen se repartió en volúmenes iguales de dos ml. Se hizó dos mezclas para gel al 3,5% y una mezcla para gel al 8%. La realización de la gradiente fue hecha con pipeta graduada usando una propipeta de goma. Se succionó primeramente la solución con el gel al 3,5% y posteriormente la del 8%, posteriormente se hizó pasar 3 a 4 burbujas de aire en forma separada con lo cual se formó la gradiente en la pipeta graduada Seguidamente se colocó lentamente entre los vidrios de la cámara electroforética y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el gel espaciador al 3,5%. Las muestras fueron cargadas con tampón de muestra 6X (0,25% XC FF; 0,25% ABF; 30% glicerol). Como tampón de corrida se usó TBE 0,5X y la corrida electroforética fué a 100 V en forma constante. Finalizada la electroforesis se procedió a teñir el gel con bromuro de etidio (10 mg/ml)

en tampón TBE 0,5X por 10 minutos. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta debido al uso de bromuro de etidio el cual se intercala al DNA permitiendo así la observación de las bandas y las imágenes fueron capturadas por una cámara fotográfica. El tamaño de los fragmentos se estimo mediante marcadores de tamaño molecular, los cuales se cargaron al gel junto con las muestras digeridas y no digeridas.

3.2.6.2 Fraccionamiento de DNA en gel de poliacrilamida nativo al 8%.

Para separar los fragmentos de los productos de digestión se realizó un gel de poliacrilamida nativo al 8%, porcentajes sugerido y descrito junto a su preparación por Sambrook et al. (1989). Como gel espaciador se ocupó un gel al 3,5 % y como gel separador el gel al 8%. El volumen total para gel de poliacrilamida fue de 8 ml. Se coloco primeramente el gel al 8% entre los vidrios de la cámara electroforética. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el gel espaciador al 3,5%. Las muestras fueron cargadas con tampón de muestra 6X (0,25% XC FF; 0,25% ABF; 30% glicerol). Como tampón de corrida se usó TBE 0,5X y la corrida electroforética fué a 200 V en forma constante. Finalizada la electroforesis se procedió a teñir el gel con bromuro de etidio (10 mg/ml) en tampón TBE 0,5X por 10 minutos. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta debido al uso de bromuro de etidio y él tamaño de los fragmentos se estimó mediante marcadores de tamaño molecular como se describió en el punto anterior.

4. RESULTADOS

4.1 Extracción de DNA genómico.

Como inicio del trabajo experimental fue necesario la obtención de DNA genómico el cual se obtuvo de muestras de sangre, pelo y semen de los 4 individuos con los que se estandarizaron las técnicas, demostrando así los resultados obtenidos por cada individuo por las 3 muestras antes mencionadas. Es importante señalar que se diseñó una metodología de extracción de DNA genómico a través del uso de Chelex-100 al 5% con el que se obtiene en forma rápida un DNA de alta integridad y tamaño molecular. Estos métodos se encuentran descritos en los puntos 3.2.1.1.1 y 3.2.1.1.2.

Los protocolos de extracción de DNA genómico usando muestras de sangre (método D), pelo (3.2.1.2) y semen (3.2.1.3), permitieron obtener un DNA de baja calidad pero con una integridad suficiente para amplificar los productos de PCR de 176 pb para determinación de Citrulinemia y de 90 pb para el método 2 de determinación de BLAD (3.2.3.3). A través de los métodos A (3.2.1.1.1), B (3.2.1.1.2) y C (3.2.1.1.3) de extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre se logró obtener un DNA de excelente integridad para la amplificación de los 1234 pb para determinación de BLAD a través del método 1 (3.2.3.2) así como para su uso en la determinación de Citrulinemia.

En la figura 1, se muestra la calidad del DNA genómico obtenido a través de los métodos A y B para los 4 individuos. En los paneles A, B y C se muestran geles de agarosa al 1% y en el panel D se muestra un gel de agarosa al 0,8%. En los paneles A y B fueron usadas muestras de sangre fresca las cuales fueron extraídas de los animales el mismo día de la extracción de DNA. En el panel D se usaron las mismas

muestras de sangre pero con 3 meses de antigüedad que fueron guardadas a 4ºC. La cantidad de DNA cargado fué de 1 μg para los geles de los paneles A, C y D. En panel B se colocó en el gel un volumen constante de 25 μl de muestra ya que las cantidades en volumen calculadas para 1 μg no entraban en los pocillos del gel preparado, esto debido a que en el 50% de las muestras hubo una concentración de DNA más baja. En el panel A se ocupó él método A de extracción, descrito en el punto 3.2.1.1.1. Se observa la excelente integridad del DNA obtenido con las muestras de los individuos 1, 2 y 4 visualizado en los carriles 1, 2 y 3 respectivamente. Posteriormente 5 días después ocupando el mismo método de extracción, se extrajó DNA genómico del individuo 3, y se colocó junto a las anteriores muestras en el gel de agarosa y se hizó correr más el gel mostrándose los resultados en la figura del panel C en la cual se observa una integridad del DNA de la extracción de la muestra del individuo 3 similar a las anteriores muestras extraídas 5 días antes las cuales fueron guardadas a 4ºC. Esto muestra que no hubo cambio en la integridad del DNA transcurridos estos 5 días. En el panel B se ocupó él método B de extracción, descrito en el punto 3.2.1.1.2. Se muestra también la excelente integridad del DNA obtenido de los individuos 1, 2, 3 y 4 visualizados en los carriles 1,2,3 y 4 respectivamente. En el panel D como se mencionó anteriormente se usaron muestras de sangre con 3 meses de antigüedad. En los carriles 1 al 4 se muestra el DNA genómico obtenido para los 4 individuos a través del método A de extracción y del carril 5 al 8 el DNA obtenido a través del método B. Se observa que con el método A se obtuvo un DNA integro para el 50% de las muestras en cambio para el método B se obtuvo para un 75% de las muestras. El tamaño molecular del DNA obtenido por los métodos A y B es de aproximadamente de 10 kb.

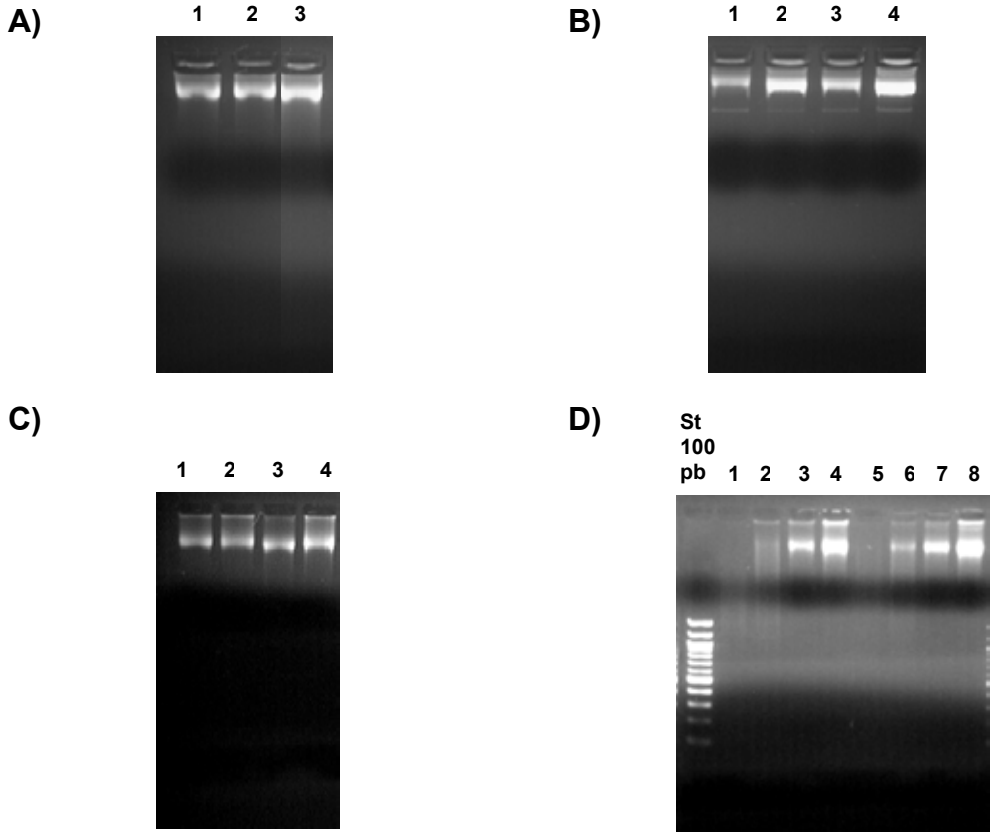


FIGURA 1: Calidad de DNA genómico en gel de agarosa. A) (método A) Gel de agarosa al 1%. Extracción a partir de muestra de sangre fresca. Carril 1: DNA Individuo 1. Carril 2: DNA Individuo 2. Carril 3: DNA Individuo 4. **B)** (método B) y **C)** (método A) Gel de agarosa al 1%. Extracción a partir de muestra de sangre fresca. Carril 1: DNA Individuo 1. Carril 2: DNA Individuo 2. Carril 3: DNA Individuo 3. Carril 4: DNA Individuo 4. **D)** Gel de agarosa al 0,8%. Extracción a partir de muestra de sangre de 3 meses de antigüedad. Método A, Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: DNA Individuo 1. Carril 2: DNA Individuo 2. Carril 3: DNA Individuo 3. Carril 4: DNA Individuo 4. Método B, Carril 5: DNA Individuo 1. Carril 6: DNA Individuo 2. Carril 7: DNA Individuo 3. Carril 8: DNA Individuo 4.

4.2 Resultados determinación de Citrulinemia

Para el montaje de determinación de Citrulinemia se usaron los partidores descritos por Dennis et al. (1989), los cuales fueron analizados con la herramienta BLAST de NCBI, para verificar su especificidad en la secuencia del cDNA del gen de la argininosuccinato sintetasa bovina (GenBank M26198). En la figura 2 se muestra la secuencia de este gen y la ubicación dentro de este de los partidores y entre estos el segmento de DNA teórico de 176 pb que se espera amplificar por PCR.

Una vez analizado teóricamente el gen, se procedió a la optimización de las condiciones de PCR para el montaje de determinación de esta enfermedad genética. Como punto de partida se realizó una gradiente de temperatura para determinación de la temperatura de hibridación de los partidores. Esta gradiente de temperatura se muestra en la figura 3 en que se observa la amplificación por PCR según lo descrito en el punto 3.2.3.1.1 de DNA genómico de sangre extraído a través del método D, cuyo tamaño de 176 pb de los productos amplificados coincide con lo esperado teóricamente. La temperatura seleccionada como temperatura de hibridación, corroborada por otras gradientes, fue la temperatura de 59,6ºC cuya banda se encuentra en el carril 6.

Una vez determinada la temperatura de hibridación de 59,6ºC se estandarizaron las condiciones de PCR ya que se mantuvo el tiempo de la temperatura de hibridación así como las temperatura y tiempos de denaturación y extensión usadas en la gradiente de temperatura. De acuerdo a estas condiciones y que se encuentran señaladas en el punto 3.2.3.1.2 se procedió a estandarizar la concentración de $MgCl_2$ y se determinó el rango de la cantidad de DNA que se pueden agregar para la reacción de PCR

mostrándose los resultados obtenidos en la figura 4 y figura 5 respectivamente y cuyas metodologías están descritas en el punto 3.2.3.1.3.

En la figura 4 se muestra en los paneles A (DNA de muestra de sangre, método A), B (DNA de muestra de pelo) y C (DNA de muestra de semen) en los carriles 3 al 5 de cada panel la amplificación del fragmento de 176 pb obtenidos usando concentraciones entre 2 mM y 3,5 mM de $MgCl_2$. En los carriles 1 y 2 de cada panel no se observa amplificación a concentraciones de 0,5 mM y 1 mM de $MgCl_2$. En el panel B y C se observan inespecificidad de la reacción de PCR a medida que se aumentó la concentración de $MgCl_2$. Esto se muestra para el panel B en el carril 5 y para el panel C en los carriles 4 y 5 en que se observa la aparición de bandas extras inespecíficas sobre los fragmentos amplificados de 176 pb.

En la figura 5 en los paneles A (DNA de muestra de sangre, método A), B (DNA de muestra de pelo) y C (DNA de muestra de semen) se muestran los fragmentos amplificados de 176 pb. En el panel A se observa la amplificación del fragmento de 176 pb entre los carriles 1 al 5 dando un rango de uso de DNA genómico para reacción de PCR de entre 60 ng a 1 μg, en el carril 6 no se observa amplificación del fragmento. Para el panel B hubo amplificación en todo el rango estudiado que fué entre los 60 ng a 1,2 μg (carriles 1 al 6) disminuyendo la intensidad de la banda en los carriles 5 y 6. Para el panel C hubo amplificación entre los carriles 1 al 4, entre los 2 ng y los 20 ng, observándose una disminución de la intensidad de la banda en el carril 4 y la nula existencia de fragmentos amplificados entre los carriles 5 y 8 que corresponde a cantidades de entre los 50 ng y 600 ng. Estos experimentos fueron realizados en un volumen de reacción de PCR de 20μl.

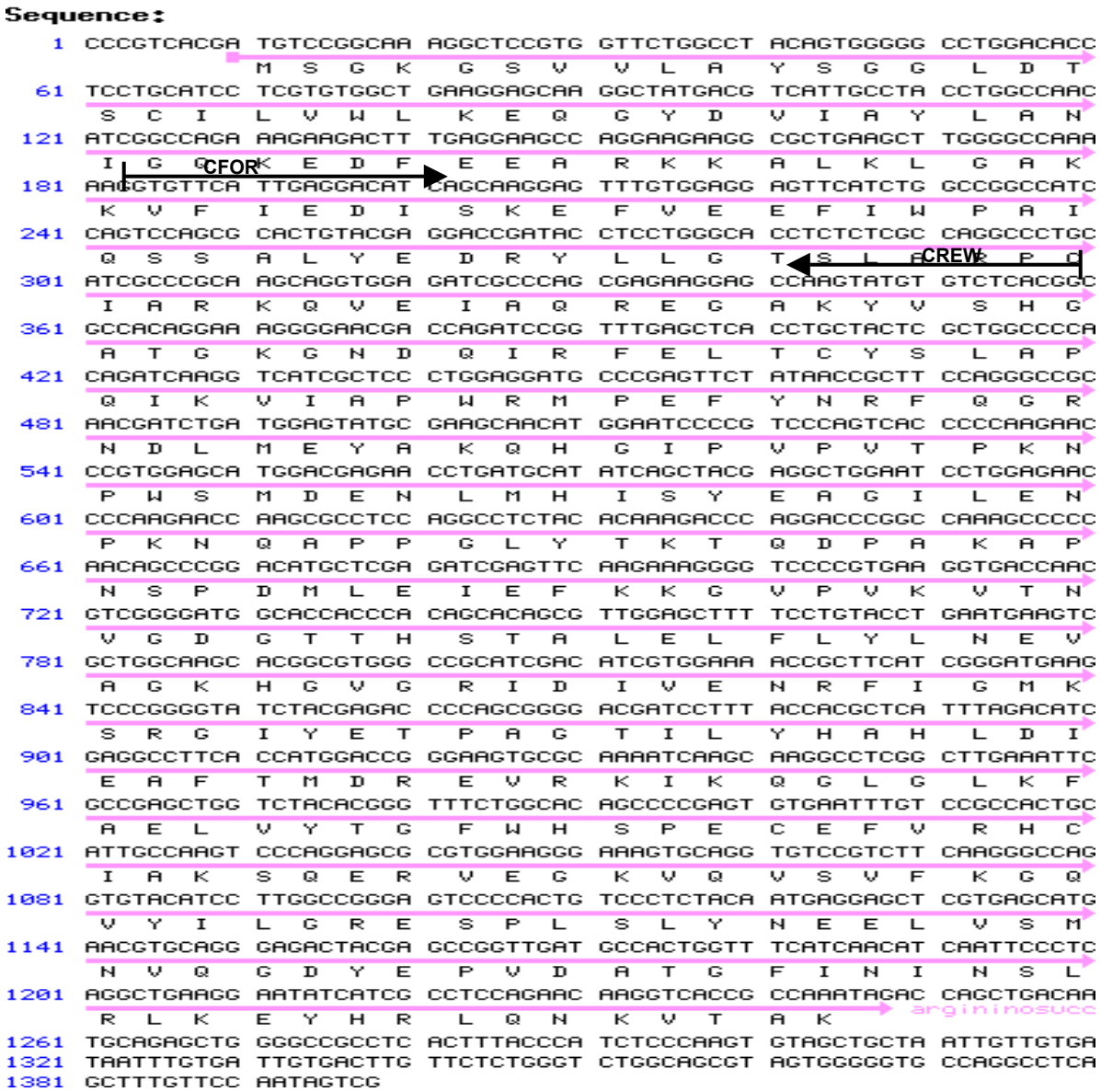


FIGURA 2: Ubicación de los partidores en el cDNA del gen de la argininosuccinato sintetasa. Las flechas indican la ubicación y orientación de los partidores CFOR:5`GTGTTCATTGAGGACATC3`,CREW:5`CCGTGAGACACATACTTG 3`. : secuencia del cDNA del gen de la argininosuccinato sintetasa.

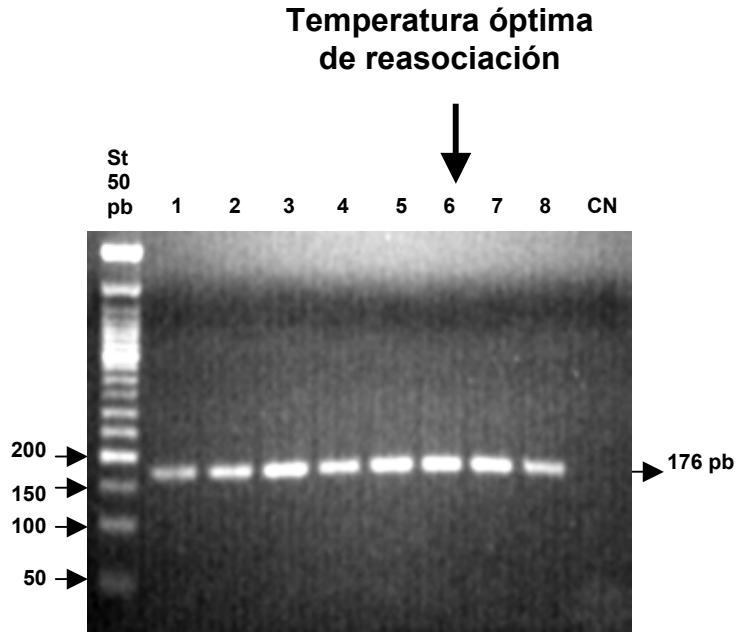


FIGURA 3: Gradiente de temperatura para determinación de temperatura de reasociación. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: 48,3ºC. Carril 2: 51,4ºC. Carril 3: 53,4ºC. Carril 4: 55,3ºC. Carril 5: 57,3ºC. Carril 6: 59,6ºC. Carril 7: 61,0ºC. Carril 8: 62,2ºC. Carril CN: Control negativo.

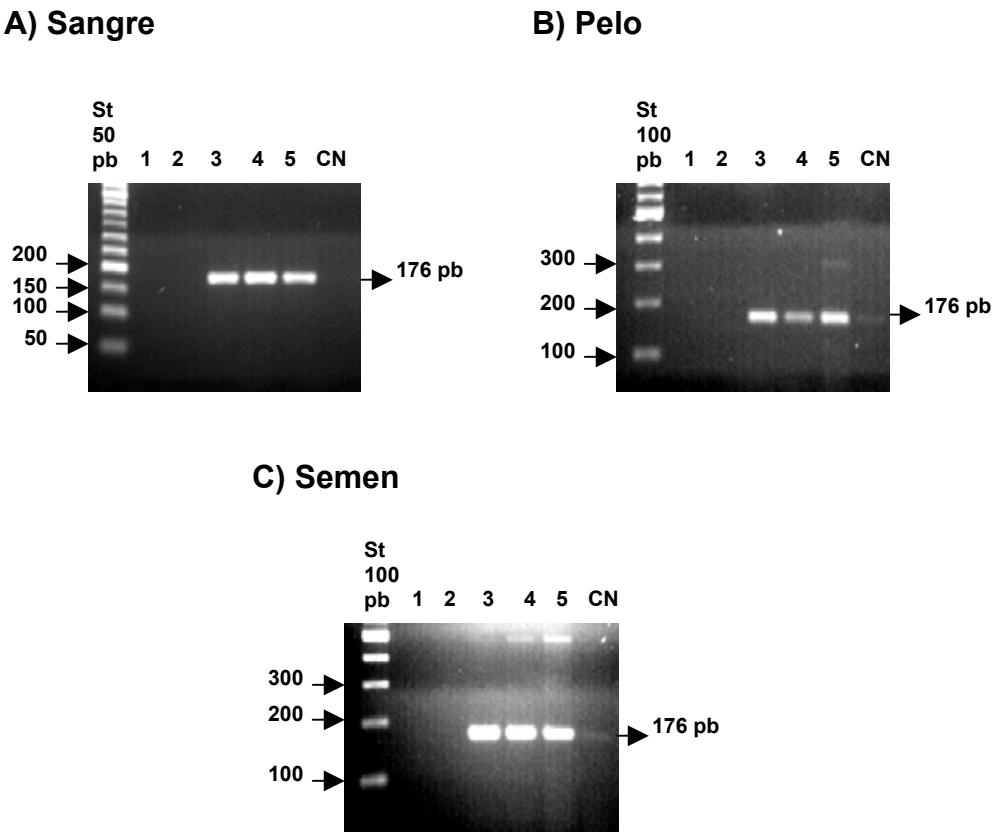


FIGURA 4: Determinación de concentración de $MgCl_2$ en optimización de PCR con DNA de sangre, pelo y semen. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. **A)** Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: 0,5 mM $MgCl_2$. Carril 2: 1 mM $MgCl_2$. Carril 3: 2 mM $MgCl_2$. Carril 4: 3 mM $MgCl_2$. Carril 5: 3,5 mM $MgCl_2$. Carril CN: Control negativo. **B) y C)** Carril St 100pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: 0,5 mM $MgCl_2$. Carril 2: 1 mM $MgCl_2$. Carril 3: 2 mM $MgCl_2$. Carril 4: 3 mM $MgCl_2$. Carril 5: 3,5 mM $MgCl_2$. Carril CN: Control negativo.

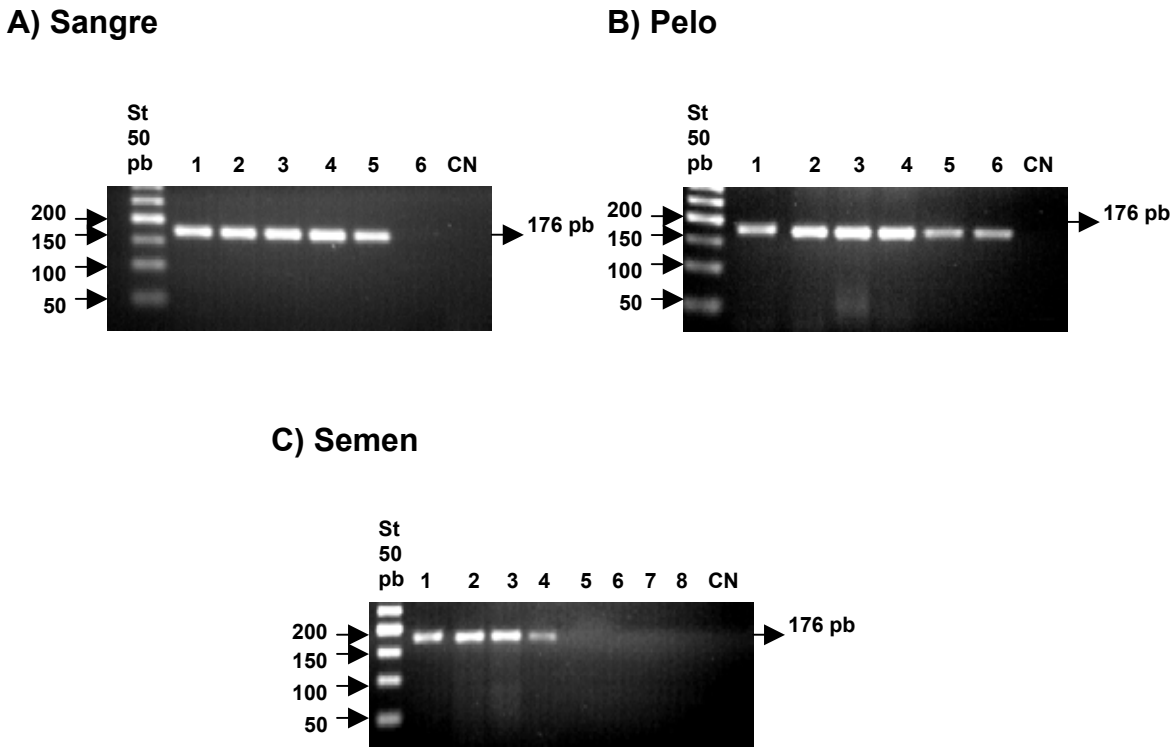


FIGURA 5: Determinación para PCR de cantidad de DNA genómico extraído de muestras de sangre, pelo y semen. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. **A) y B)** Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: 60 ng. Carril 2: 100 ng. Carril 3: 300 ng. Carril 4: 600 ng. Carril 5: 1 μg. Carril 6: 1,2 μg. Carril CN: Control negativo. **C)** Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: 2 ng. Carril 2: 7 ng. Carril 3: 10 ng. Carril 4: 20 ng. Carril 5: 50 ng. Carril 6: 150 ng. Carril 7: 300 ng. Carril 8: 600 ng. Carril CN: Control negativo.

Una vez optimizadas las condiciones de PCR se procedió a la amplificación del fragmento de 176 pb. En la figura 6 en los paneles A (DNA de muestra de sangre, método A), B (DNA de muestra de pelo) y C (DNA de muestra de semen) se muestran los fragmentos amplificados según las condiciones establecidas de PCR las cuales son señaladas en el punto 3.2.3.1.4 para 35 μl. En los paneles A y B se observan en los carriles de los controles negativos dímeros de partidores. La cantidad de DNA de sangre y pelo usada para PCR fue de 350 ng. Para muestras de semen se eligió usar una cantidad de 17,5 ng. Cabe señalar que estas cantidades fueron optimizadas para un volumen de reacción de 35 μl. La concentración de $MgCl_2$ usada para la amplificación por PCR fue de 2 mM.

Antes de comenzar con la digestión de los productos amplificados se analizó en forma teórica la secuencia del cDNA del gen de la argininosuccinato sintetasa bovina, para observar el sitio de restricción en el fragmento amplificado para la enzima *Ava*I (GGA/TCC) (figura 7). Este sitio de corte indica la presencia de un individuo homocigoto sano. La eliminación de este sitio de corte genotipifica a un individuo como homocigoto enfermo.

Una vez determinado en forma teórica el sitio de restricción en el fragmento amplificado, se diseñó como se muestra en la figura 8, en el panel A, un esquema de un gel de agarosa al 2% en el que se indican en forma teórica los productos de digestión que se podrían obtener para genotipificar a un individuo como homocigoto sano (-/-) (98 pb y 78 pb), heterocigoto portador (-/+) (176 pb, 98 pb y 78 pb) ó homocigoto enfermo (+/+) (176 pb). En el panel B se muestra en forma esquemática lineal los fragmentos

teóricos que se podrían obtener para genotipificar un individuo. Estos fragmentos teóricos coinciden con lo obtenido por Dennis et al. (1989).

Una vez que se determinó los 3 genotipos posibles en forma teórica y según lo descrito en el punto 3.2.4.1, se realizó como se muestra en la figura 9 una cinética de digestión para determinar el tiempo de digestión de los fragmentos amplificados de 176 pb. En este experimento se usó en el producto de PCR digerido, el DNA extraído de muestra de sangre a través del método D de un solo individuo. Se muestra en los carriles impares los fragmentos amplificados sin digerir y en los carriles pares los fragmentos digeridos observándose una digestión completa en todo el rango de tiempo estudiado. Se eligió el carril 4 que corresponde a 3 horas como tiempo de digestión a usar en la determinación de esta enfermedad.

Una vez estimado el tiempo de digestión se procedió a la digestión según lo descrito en el punto 3.2.4.3 de los fragmentos amplificados que se indicó en la figura 6. Los resultados se muestran en la figura 10 para los 4 individuos usando las 3 distintas muestras, se observa que en los paneles A, B y C correspondiente a las muestras de sangre, pelo y semen respectivamente, en los carriles impares, los fragmentos amplificados de 176 pb y en los carriles pares los fragmentos amplificados digeridos con *Ava*II en cuyos carriles se observan los fragmentos de 98 pb y 78 pb identificando a estos 4 individuos a través de las 3 muestras usadas como homocigotos sanos. Resultados similares que no son mostrados en el presente trabajo fueron obtenidos a través del uso de la metodología de extracción de DNA de fenol/cloroformo (método C), lo que confirmó los resultados obtenidos a través del uso de Chelex-100.

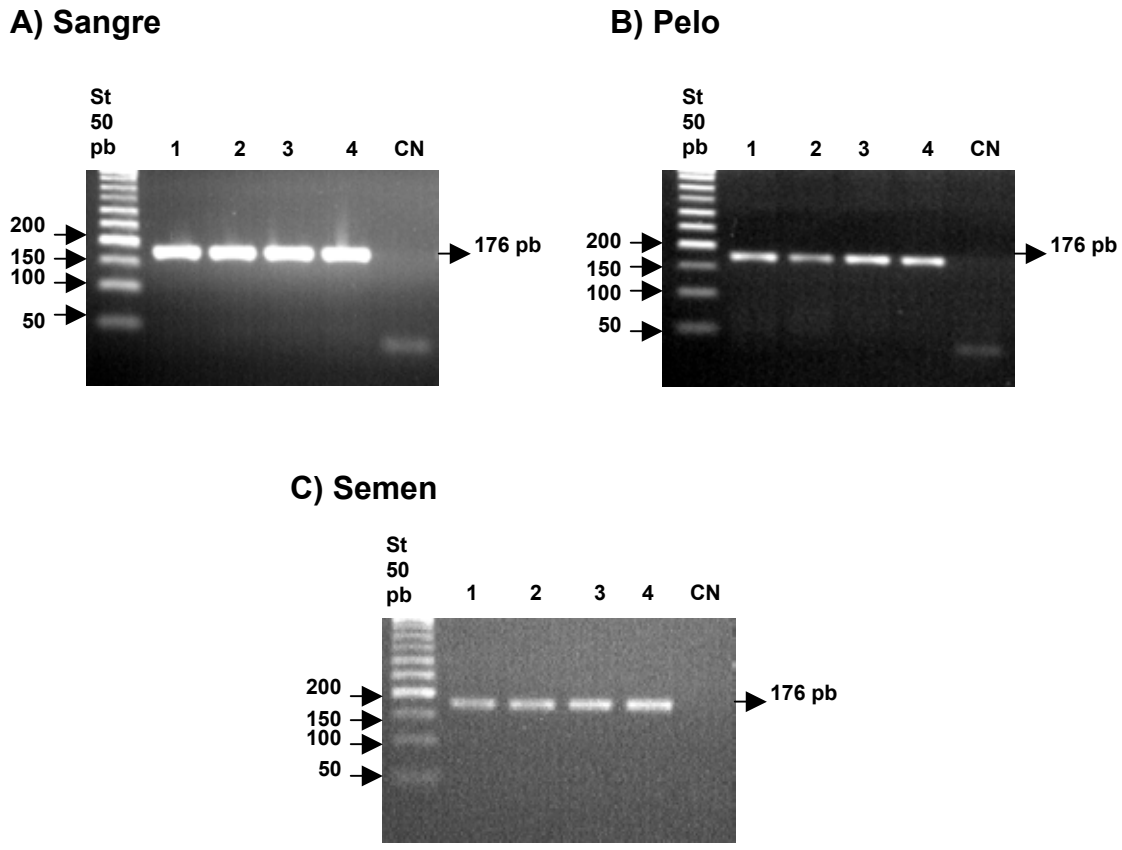
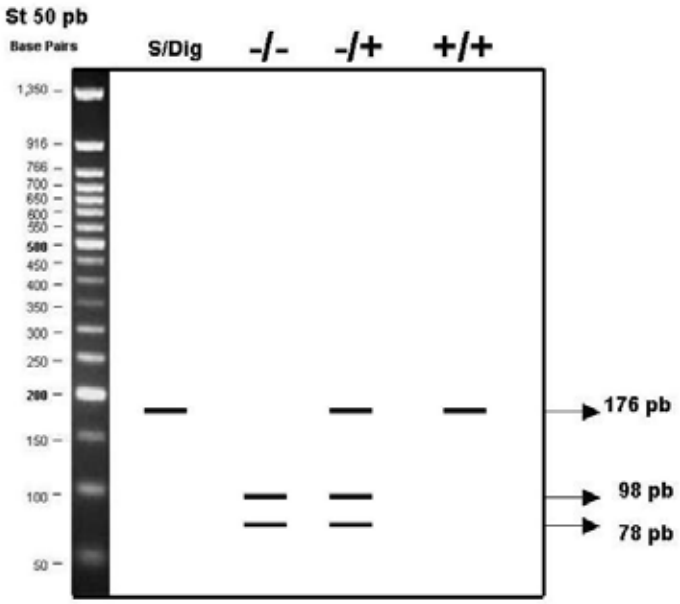


FIGURA 6: Amplificación por PCR de DNA genómico de sangre, pelo y semen. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. **A) B) y C)** Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: Individuo 1. Carril 2: Individuo 2. Carril 3: Individuo 3. Carril 4: Individuo 4. Carril CN: Control negativo.

FIGURA 7: Sitio de restricción para enzima *Ava*II en segmento amplificado del gen de la argininosuccinato sintetasa. : segmento de secuencia del cDNA del gen de la argininosuccinato sintetasa.

A)



B)

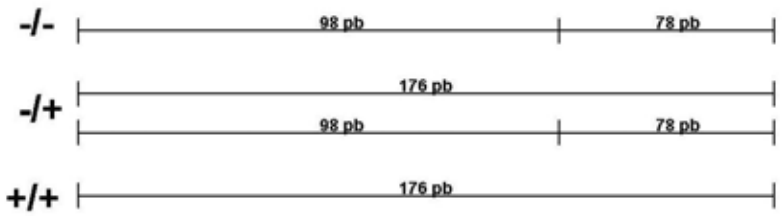


FIGURA 8: Esquema de fraccionamiento de los productos de digestión. **A)** Esquema de gel de agarosa al 2% del fraccionamiento de los productos de digestión. **B)** Esquema lineal del tamaño de los fragmentos de los productos de digestión. S/Dig: producto PCR no digerido. **-/-:** homocigoto negativo ó sano; **-/+:** heterocigoto ó portador; **+/+:** homocigoto positivo ó enfermo.

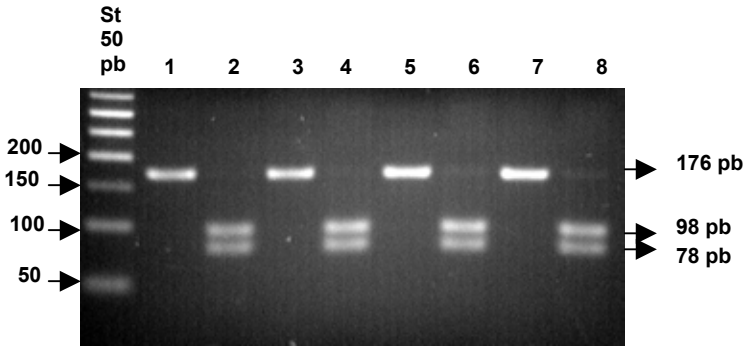
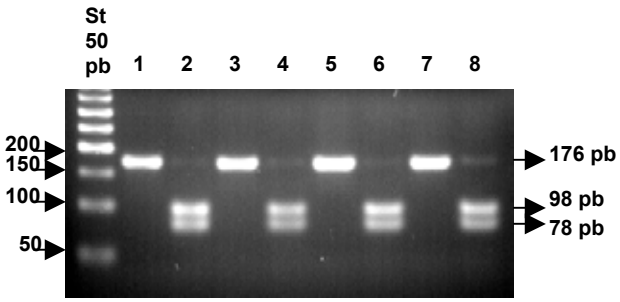
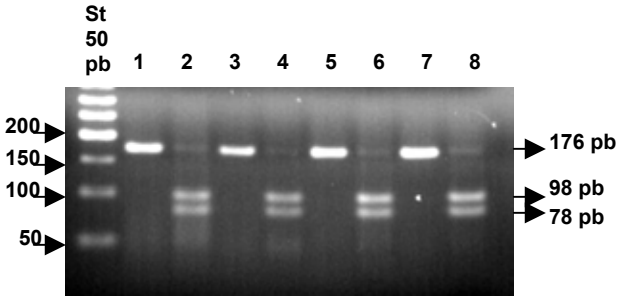


FIGURA 9: Determinación de tiempo de digestión de productos de amplificación. Fraccionamiento en gel de agarosa al 2% de los productos de digestión. Carril St 50 pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: Individuo 4, S/Dig. Carril 2: Dig 1 hora, Individuo 4. Carril 3: Individuo 4, S/Dig. Carril 4: Dig 3 horas, Individuo 4. Carril 5: Individuo 4, S/Dig. Carril 6: Dig 5 horas, Individuo 4. Carril 7: Individuo 4, S/Dig. Carril 8: Dig 7 horas, Individuo 4. S/Dig: Producto de PCR sin digerir. Dig: Producto de PCR digerido.

A) Sangre



B) Pelo



C) Semen

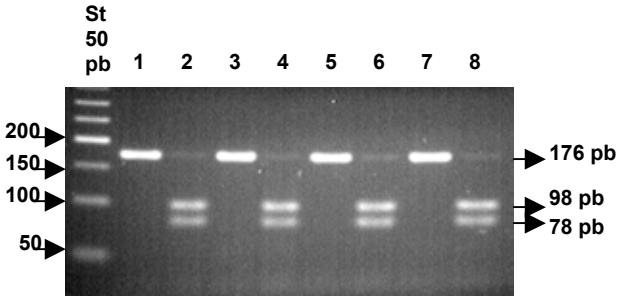


FIGURA 10: Digestión de productos de amplificación obtenidos a partir de muestras de DNA genómico de sangre, pelo y semen. Fraccionamiento en gel de agarosa al 2% de los productos de digestión. **A) B) y C)** Carril St 50 pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: Individuo 1, S/Dig. Carril 2: Individuo 1, Dig. Carril 3: Individuo 2, S/Dig. Carril 4: Individuo 2, Dig. Carril 5: Individuo 3, S/Dig. Carril 6: Individuo 3, Dig. Carril 7: Individuo 4, S/Dig. Carril 8: Individuo 4, Dig. S/Dig: Producto de PCR sin digerir. Dig: Producto de PCR digerido.

4.3 Resultados determinación de BLAD. Método 1 y método 2.

Como primera etapa para el montaje de los dos métodos de determinación de esta enfermedad, se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia del gen CD18 bovino con la secuencia del cDNA del gen CD18 bovino. A partir de este alineamiento, se observó la región de consenso (Anexo 8) con lo que se comprobó el fragmento amplificado por Shuster et al. (1992), fragmento en que se encuentra la mutación. Con esta región de consenso se dedujo además el partidor REW para el método 1 y método 2 de determinación de BLAD. Los partidores usados para estos dos métodos fueron analizados en la base de datos de NCBI utilizando la herramienta BLAST para verificar su especificidad (Anexo 5; Anexo 6; Anexo 7).

Una vez realizado el alineamiento y verificado la especificidad de los partidores, estos fueron ubicados en forma teórica dentro de la secuencia del Gen CD 18 bovino (GenBank Y12672) de un homocigoto sano como se muestra en la figura 11. En esta figura se observa la ubicación de los partidores FOR 1, FOR 2 y REW con los cuales se montó los 2 métodos de determinación de BLAD. En los rectángulos negros se ubican los sitios de restricción para la enzima *Taq*I (T/CGA).

Para el método 1 se usaron los partidores FOR 1 y REW que amplifican un fragmento de 1234 pb. Al ser digerido este fragmento amplificado con *Taq*I como se muestra en la figura 11, se producen dos cortes en sus respectivos sitios de restricción lo que genotipifica a un individuo como homocigoto sano. Al ser eliminado el segundo sitio de restricción indicaría un homocigoto enfermo. Una vez determinado en forma teórica los sitios de restricción en el fragmento amplificado se diseñó como se muestra en la figura 12 en el panel A un esquema de un gel de agarosa al 2%. En este esquema

se indican en forma teórica los productos de digestión que se podrían obtener para genotipificar a un individuo como homocigoto sano (-/-) (625 pb, 544 pb y 65 pb), heterocigoto portador (-/+) (1234 pb, 625 pb, 544 pb y 65 pb) ó homocigoto enfermo (+/+) (625 pb y 609 pb). En el panel B se muestra lo mismo pero en forma esquemática lineal los fragmentos digeridos teóricos que se podrían obtener para genotipificar un individuo. Para el método 2 se usaron los partidores FOR 2 y REW que amplifican un fragmento de 90 pb. Al ser digerido este fragmento amplificado con *Taq*I como se muestra en figura 11, se produce un corte de esta enzima en su respectivo sitio de restricción lo que genotipifica a un individuo como un homocigoto sano. Al ser eliminado este sitio de restricción indicaría un homocigoto enfermo. Una vez determinado en forma teórica el sitio de restricción en el fragmento amplificado se diseñó como se muestra en la figura 13 en el panel A un esquema de un gel de agarosa al 2%. En este esquema se indica en forma teórica los productos de digestión que se podrían obtener para genotipificar a un individuo como homocigoto sano (-/-) (65 pb y 25 pb), heterocigoto portador (-/+) (90 pb, 65 pb y 25 pb) ó homocigoto enfermo (+/+) (90 pb). En el panel B se muestra en forma esquemática lineal los fragmentos digeridos teóricos que se podrían obtener para genotipificar un individuo.

4.3.1 Resultados determinación de BLAD. Método 1.

Una vez analizado teóricamente el gen se procedió a la optimización de las condiciones de PCR para el montaje de este método de determinación de esta enfermedad genética. Como punto de partida se realizó una gradiente de temperatura para determinación de la temperatura de hibridación de los partidores FOR 1 y REW.

Esta gradiente de temperatura se muestra en la figura 14 en que se observa la amplificación por PCR según lo descrito en el punto 3.2.3.2.1 de DNA genómico de sangre extraído a través del método D, cuyo tamaño de 1234 pb de los productos amplificados coincide con lo esperado teóricamente.

La temperatura seleccionada como temperatura de hibridación fue la temperatura de 63,3ºC debido a que presentó una mayor intensidad de banda como se muestra en el carril 3. Una vez que se determinó esta temperatura y manteniéndose el tiempo de la temperatura de hibridación así como la temperatura y tiempos de denaturación y extensión usadas en la gradiente de temperatura, y basándose además en la constitución de la misma mezcla de reacción, se hizó un PCR para los 4 individuos en que se usó DNA genómico extraído a través del método de fenol/cloroformo según lo descrito en el punto 3.2.1.1.3. Estos fragmentos amplificados de 1234 pb fueron digeridos según lo descrito en el punto 3.2.4.4 mostrándose los resultados en la figura 15 en un gel de agarosa al 2%. En los carriles impares de esta figura de observa los productos de amplificación sin digerir para los 4 individuos y en los carriles pares los productos de amplificación digeridos. Se observa en los carriles pares fragmentos de 625 pb, 544 pb y 65 pb que de acuerdo a su ubicación dentro del gel y observándose los estándares de 100 pb y 50 pb, se genotipifica a estos 4 individuos como homocigotos sanos. El fragmento de los 65 pb se dedujo por una mayor intensidad de la banda en comparación con las de los carriles pares. Estas bandas intensas en todos estos carriles se debió a los dímeros de partidores formados por apareamiento de los mismos. Al tener estos resultados se procedió a disminuir a la mitad la concentración de partidores de la reacción de PCR de 10 pmol/20 μl a 5 pmol/20 μl para disminuir la

formación de los dímeros de partidores. La temperatura de hibridación se mantuvo a 63,3ºC así como el tiempo de hibridación, la temperatura y tiempos de denaturación y extensión estableciéndose así las condiciones de PCR que se encuentran descritas en 3.2.3.2.2. Determinada la concentración de partidores y usándose DNA extraído a través de la metodología descrita en el punto 3.2.1.1.2 (método B) se procedió a estandarizar la concentración de $MgCl_2$ y se determinó el rango de la cantidad de DNA que se pueden agregar para la reacción de PCR. Según lo descrito en el punto 3.2.3.2.3 y mostrándose los resultados obtenidos en las figura 16, se observa en el panel A que la concentración de $MgCl_2$ optima para la reacción de PCR se obtiene usando 2 mM de $MgCl_2$ (carril 3) disminuyendo la intensidad del fragmento amplificado a los 3 mM de $MgCl_2$ (carril 4). En el panel B se observa la amplificación del fragmento de 1234 pb entre los carriles 1 al 4 dando un rango de uso de DNA genómico para reacción de PCR de entre 60 ng a 600 ng para un volumen de reacción de 20μl. En el carril 5 no se observa amplificación del fragmento.

Una vez optimizadas las condiciones de PCR se procedió como se muestra en la figura 17 a la amplificación del fragmento de 1234 pb. En el panel A, se muestra los fragmentos amplificados de 1234 pb según las condiciones establecidas de PCR las cuales son señaladas en el punto 3.2.3.2.4 para 40 μl. Se observa la amplificación de los fragmentos esperados para los 4 individuos. El DNA usado para la amplificación fue extraído de muestras de sangre a través del método B. La cantidad de DNA de sangre usada para PCR fue de 700 ng. Cabe señalar que esta cantidad fué optimizada para un volumen de reacción de 40 μl. La concentración de $MgCl_2$ usada para la amplificación por PCR fue de 2 mM.

En base a los 3 genotipos posibles determinados en forma teórica como se describen en el punto 4.3 y según lo descrito en el punto 3.2.4.2 para el método 1 de determinación de BLAD, se realizó como se muestra en la figura 17 una cinética de digestión para determinar el tiempo de digestión de los fragmentos amplificados de 1234 pb con enzima *Taq*I (T/CGA). Se muestra en el carril 1 el fragmento amplificado sin digerir y en los carriles 2 al 4 los fragmentos digeridos observándose una digestión completa en todo el rango de tiempo estudiado. Se eligió un tiempo de 5 horas como tiempo de digestión a usar en la determinación de esta enfermedad. Este tiempo elegido se basó también en otras pruebas de tiempos de digestión y digestiones realizadas durante los experimentos.

Una vez estimado el tiempo de digestión se procedió según lo descrito en el punto 3.2.4.4 a la digestión de los fragmentos amplificados que se indicó en la figura 17 (panel A) mostrándose los resultados obtenidos para los 4 individuos en la figura 18. En el panel A de esta figura, a través de un gel de poliacrilamida nativo en gradiente se observa en los carriles impares los productos de amplificación sin digerir para los 4 individuos y en los carriles pares los productos de amplificación digeridos. Se observa en estos carriles pares fragmentos de 625 pb, 544 pb y 65 pb confirmándose la genotipificación como homocigotos sanos para estos 4 individuos. En el panel B se observa lo mismo pero en un gel de agarosa al 2%. Resultados similares que no son mostrados en el presente trabajo fueron obtenidos a través del uso de la metodología de extracción de DNA de fenol/cloroformo (método C), lo que confirmó los resultados obtenidos a través del uso de Chelex-100.

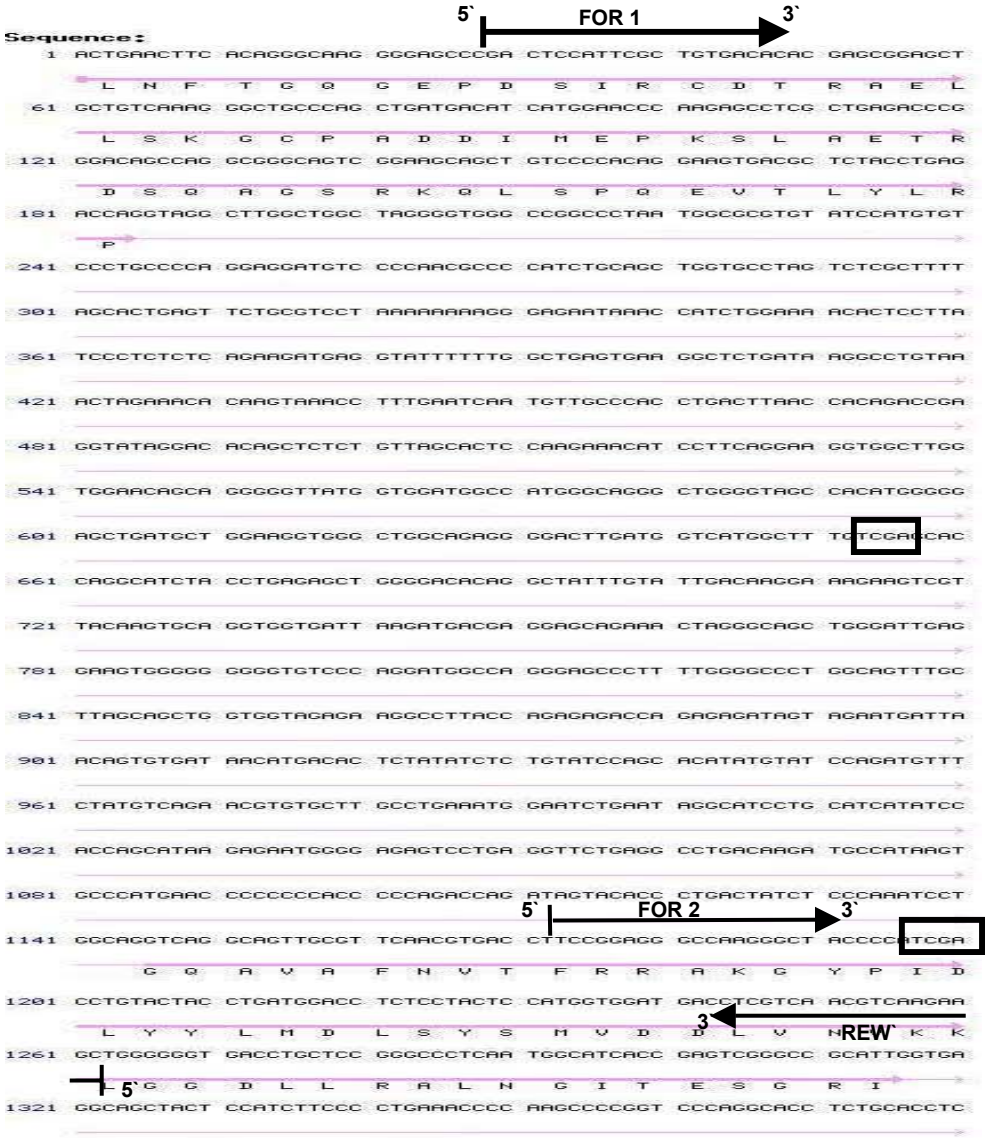
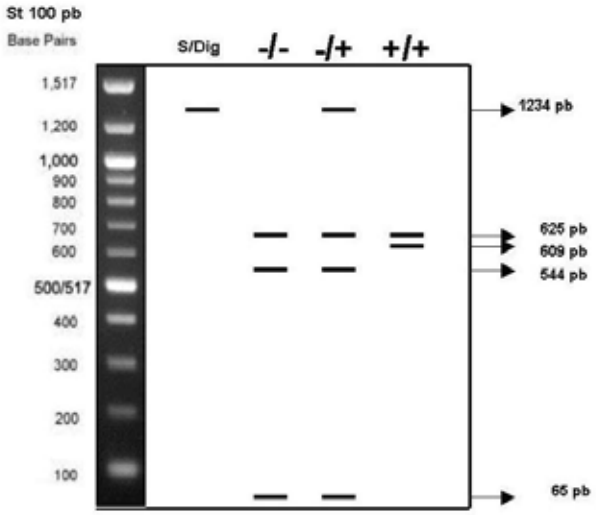


FIGURA 11: Ubicación de los partidores y sitios de restricción para enzima *Taq*I en Gen CD18 bovino para determinación de BLAD a través de método 1 y método 2. Las flechas indican la ubicación y orientación de los partidores FOR 1: 5`GACTCCATTCGCTGTGACAC 3`, FOR 2: 5`TCCGGAGGGCCAAGGGCTA 3`, REW: 5`GCTTCTTGACGTTGACGAGG 3`y en cuadrados se muestran los sitios de restricción para enzima *Taq*I en el Gen CD18 bovino.

A)



B)

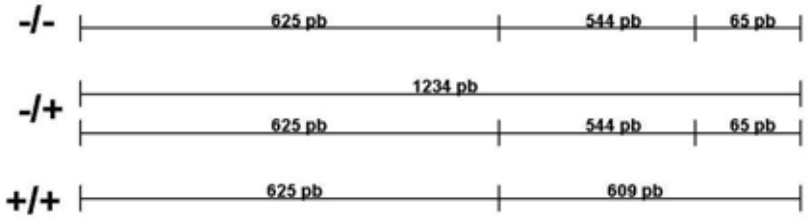
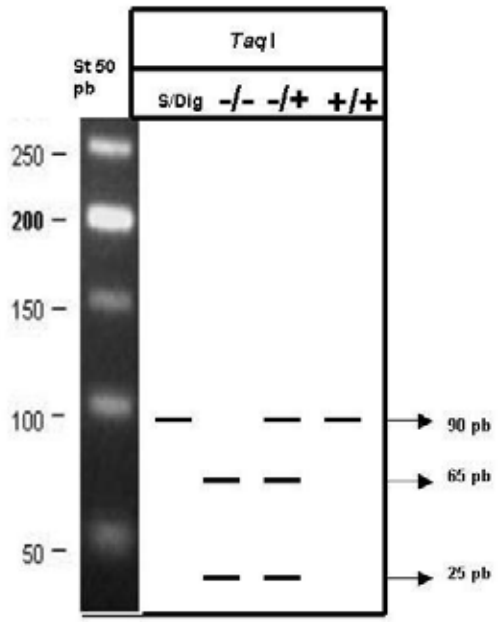


FIGURA 12: Esquema de fraccionamiento de los productos de digestión (método 1). A) Esquema de gel de agarosa al 2% para fraccionamiento de los productos de digestión. **B)** Esquema lineal del tamaño de los fragmentos de los productos de digestión. S/Dig: Producto PCR no digerido. **-/-:** homocigoto negativo ó sano; **-/+:** heterocigoto ó portador; **+/+:** homocigoto positivo ó enfermo.

A)



B)

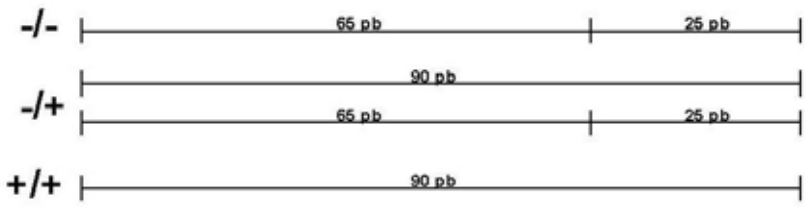


FIGURA 13: Esquema de fraccionamiento de los productos de digestión (método 2). A) Esquema de gel de agarosa al 2% para fraccionamiento de los productos de digestión. **B)** Esquema lineal del tamaño de los fragmentos de los productos de digestión. S/Dig: producto pcr no digerido. **-/-:** homocigoto negativo ó sano; **-/+:** heterocigoto ó portador; **+/+:** homocigoto positivo ó enfermo.

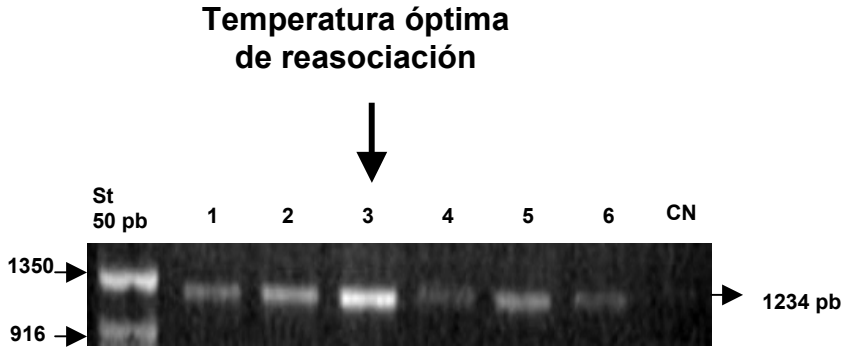


FIGURA 14: Gradiente de temperatura para determinación de temperatura de reasociación. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: 59,4ºC. Carril 2: 61,3ºC. Carril 3: 63,3ºC. Carril 4: 65,6ºC. Carril 5: 67ºC. Carril CN: Control negativo.

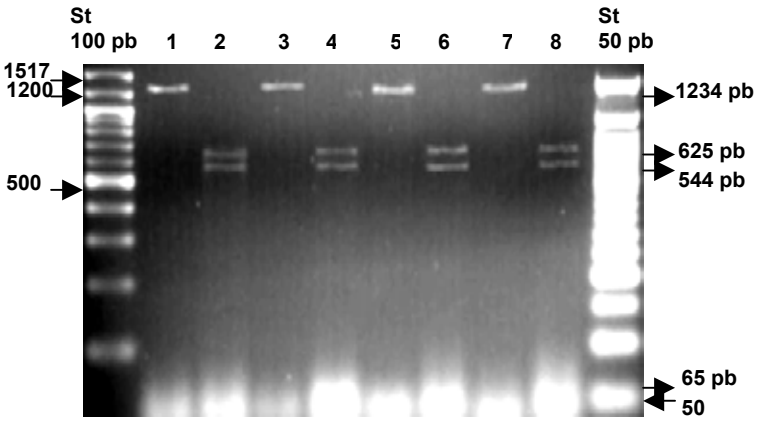


FIGURA 15: Primera digestión de productos de amplificación. Fraccionamiento en gel de agarosa al 2% de los productos de digestión. Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: Individuo 1, S/Dig. Carril 2: Individuo 1, Dig. Carril 3: Individuo 2, S/Dig. Carril 4: Individuo 2, Dig. Carril 5: Individuo 3, S/Dig. Carril 6: Individuo 3, Dig. Carril 7: Individuo 4, S/Dig. Carril 8: Individuo 4, Dig. Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. S/Dig: Producto de PCR sin digerir. Dig: Producto de PCR digerido.

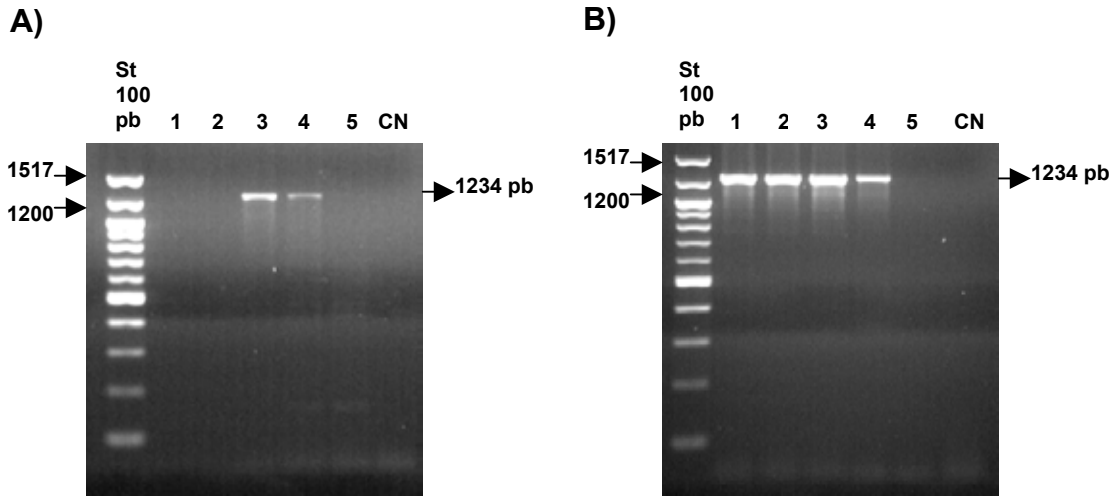


FIGURA 16: Determinación de concentración de $MgCl_2$ y cantidad de DNA en optimización de PCR a partir de DNA genómico de sangre. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. **A)** Carril St 100pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: 0,7 mM $MgCl_2$. Carril 2: 1 mM $MgCl_2$. Carril 3: 2 mM $MgCl_2$. Carril 4: 3 mM $MgCl_2$. Carril 5: 3,5 mM $MgCl_2$. Carril CN: Control negativo. **B)** Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: 60 ng. Carril 2: 100 ng. Carril 3: 350 ng. Carril 4: 600 ng. Carril 5: 1 μg. Carril CN: Control negativo.

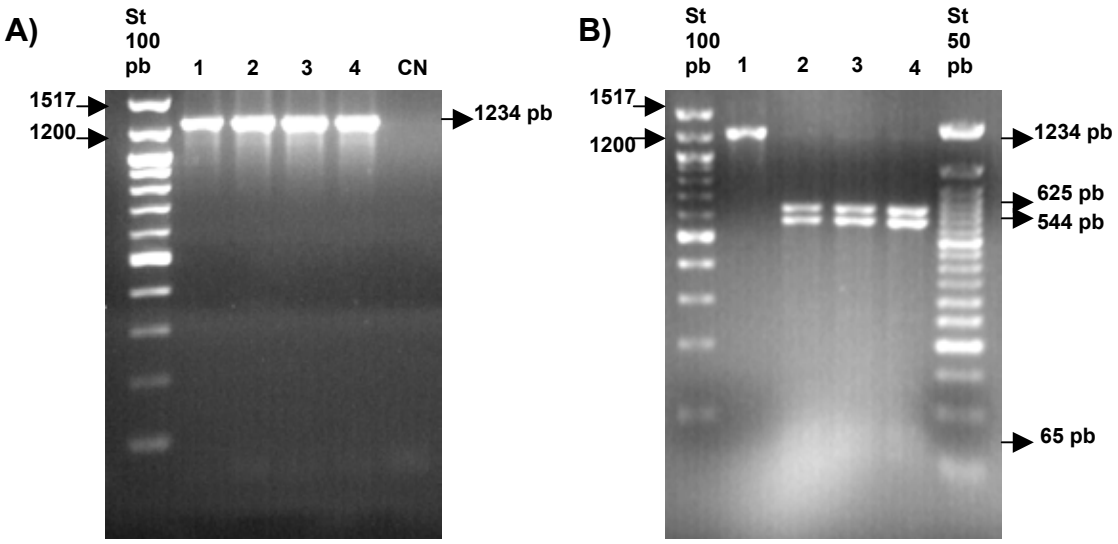


FIGURA 17: Amplificación por PCR del DNA genómico extraído a partir de muestras de sangre y determinación de tiempo de digestión de productos de amplificación. A) Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. Carril St 100pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: Individuo 1. Carril 2: Individuo 2. Carril 3: Individuo 3. Carril 4: Individuo 4. Carril CN: Control negativo. **B)** Fraccionamiento en gel de agarosa al 2% de los productos de digestión. Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: S/Dig. Carril 2: Dig 2 horas. Carril 3: Dig 4 horas. Carril 4: Dig 6 horas. Carril St 50 pb: Estándar de 50 pb. S/Dig: Producto de PCR sin digerir. Dig: Producto de PCR digerido.

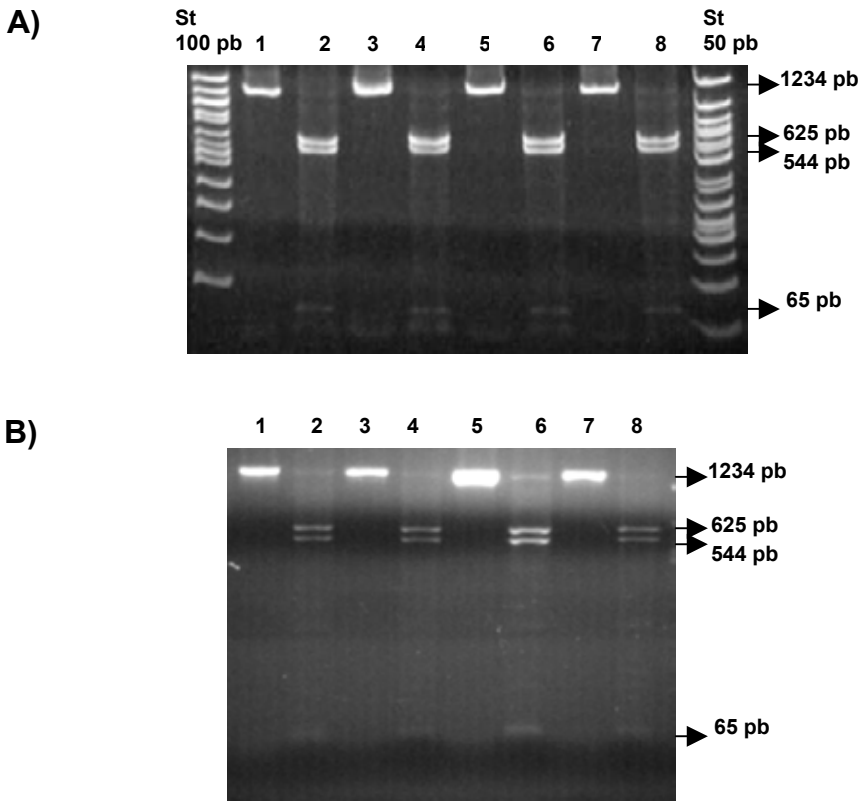


FIGURA 18: Digestión de productos de amplificación. A) Fraccionamiento en gel de poliacrilamida nativo en gradiente de los productos de digestión. Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: Individuo 1, S/Dig. Carril 2: Individuo 1, Dig. Carril 3: Individuo 2, S/Dig. Carril 4: Individuo 2, Dig. Carril 5: Individuo 3, S/Dig. Carril 6: Individuo 3, Dig. Carril 7: Individuo 4, S/Dig. Carril 8: Individuo 4, Dig. Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. **B)** Fraccionamiento en gel de agarosa al 2% de los productos de digestión. Carril 1: Individuo 1, S/Dig. Carril 2: Individuo 1, Dig. Carril 3: Individuo 2, S/Dig. Carril 4: Individuo 2, Dig. Carril 5: Individuo 3, S/Dig. Carril 6: Individuo 3, Dig. Carril 7: Individuo 4, S/Dig. Carril 8: Individuo 4, Dig. S/Dig: Producto de PCR sin digerir. Dig: Producto de PCR digerido.

4.3.2 Resultados determinación de BLAD. Método 2.

Una vez analizado teóricamente el gen se procedió a la optimización de las condiciones de PCR para el montaje de este método de determinación de esta enfermedad genética. Como punto de partida se realizó una gradiente de temperatura para determinación de la temperatura de hibridación de los partidores FOR 2 y REW. Esta gradiente de temperatura se muestra en la figura 19 en que se observa la amplificación por PCR según lo descrito en el punto 3.2.3.3.1 de DNA genómico de sangre extraído a través del método A, cuyo tamaño de 90 pb de los productos amplificados coincide con lo esperado teóricamente. Estos fragmentos son los que se observan con mayor intensidad en sus bandas entre los carriles 1 al 8. Se observan productos inespecíficos a temperatura de hibridación más bajas principalmente entre los carriles 1 al 6 disminuyendo estas bandas inespecíficas en el carril 7. La temperatura seleccionada como temperatura de hibridación fue de 69,2ºC (carril 8) y fue seleccionada esta temperatura ya que no se observó aparición de productos inespecíficos sobre el fragmento de 90 pb. En el carril control negativo (carril CN) se observa sólo un dímero de partidores.

Una vez determinada la temperatura de hibridación de 69,2ºC se estandarizó las condiciones de PCR ya que se mantuvo el tiempo de la temperatura de hibridación así como la temperatura y tiempos de denaturación y extensión usadas en la gradiente de temperatura. De acuerdo a estas condiciones y que se encuentran señaladas en el punto 3.2.3.3.2 se procedió a estandarizar la concentración de $MgCl_2$ y se determinó el rango de la cantidad de DNA que se pueden agregar para la reacción de PCR

mostrándose los resultados obtenidos en la figura 20 y figura 21 respectivamente y cuyas metodologías están descritas en el punto 3.2.3.3.3.

Usando DNA extraído de muestras de sangre a través del método A según lo descrito en el punto 3.2.1.1.1, se muestra en la figura 20 en los carriles 1 al 5 de cada panel la amplificación del fragmento de 90 pb obtenidos usando concentraciones entre 0,7 mM y 3,5 mM de $MgCl_2$. En el carril 1 se observa una banda de menor intensidad en comparación con las restantes bandas de los demás carriles.

En la figura 21 en los paneles A (DNA de muestra de sangre, método A), B (DNA de muestra de pelo) y C (DNA de muestra de semen) se muestran los fragmentos amplificados de 90 pb. En el panel A se observa la amplificación del fragmento de 90 pb entre los carriles 1 al 4 dando un rango de uso de DNA genómico para reacción de PCR de entre 60 ng a 600 ng, en los carriles 5 y 6 no se observa amplificación del fragmento. Para el panel B hubo amplificación entre los 60 ng a 1 μg (carriles 1 al 5) disminuyendo la intensidad de la banda en carril 5. Para el panel C hubo amplificación entre los carriles 1 al 3, entre los 2 ng y los 20 ng, observándose una disminución de la intensidad de las bandas en los carriles 1 (2 ng) y 3 (20 ng) y la nula existencia de fragmento amplificado en el carril 4 (50 ng). Se observa en el gel de agarosa que la mejor intensidad de banda se produce al usar 7 ng de DNA. El uso de 10 ng es óptimo para la reacción de PCR como se demostró en otros experimentos los cuales no son mostrados en el presente trabajo. Estos experimentos fueron realizados en un volumen de reacción de PCR de 20μl.

Una vez optimizadas las condiciones de PCR se procedió como se muestra en la figura 22 a la amplificación del fragmento de 90 pb. En los paneles A (DNA de muestra

de sangre, método A), B (DNA de muestra de pelo) y C (DNA de muestra de semen) se muestran los fragmentos amplificados según las condiciones establecidas de PCR las cuales son señaladas en el punto 3.2.3.3.4 para 20 μl. En los paneles A y B se observan en los carriles de los controles negativos dímeros de partidores. La cantidad de DNA de sangre usada para PCR fue de 150 ng y de pelo 200 ng. Para muestras de semen se eligió usar una cantidad de 10 ng. Cabe señalar que estas cantidades fueron optimizadas para un volumen de reacción de PCR de 20 μl. La concentración de $MgCl_2$ usada para la amplificación por PCR fue de 2 mM.

En base a los 3 genotipos posibles determinados en forma teórica como se describen en el punto 4.3 y según lo descrito en el punto 3.2.4.2 para el método 2 de determinación de BLAD, se realizó como se muestra en la figura 23 a través de un gel de poliacrilamida nativo al 20% una cinética de digestión para determinar el tiempo de digestión. Se observa que en todos los tiempos estudiados (2 a 6 horas) hubo una digestión completa con *Taq*I de los fragmentos amplificados. Se observa los fragmentos de 65 pb con una mayor intensidad que los fragmentos de 25 pb que presentan una menor intensidad, además no existen bandas extras bajo los 90 pb de bases de la muestra no digerida (carril S/Dig). Se eligió un tiempo de 2 horas como tiempo de digestión a usar en la determinación de esta enfermedad.

Una vez estimado el tiempo de digestión se procedió a la digestión según lo descrito en el punto 3.2.4.4 de los fragmentos amplificados que se indicó en la figura 22. Los resultados se muestran en la figura 24 para los 4 individuos usando las 3 distintas muestras. Se observa en los paneles A, B y C correspondiente a las muestras de sangre, pelo y semen respectivamente los fragmentos amplificados de 90 pb (carriles

impares) y los fragmentos amplificados digeridos con *Taq*I (carriles pares) obteniéndose los fragmentos de 65 y 25 pb. Estos resultados genotipifican a estos 4 individuos a través de las 3 muestras usadas como homocigotos sanos. En el panel C se observan además dímeros de los partidores FOR2 y REW bajo los fragmentos amplificados no digeridos.

En la figura 25 se observa (en un gel de poliacrilamida al 20%) en los carriles impares de esta figura los productos de amplificación sin digerir para los 4 individuos y en los carriles pares los productos de amplificación digeridos, observándose en estos carriles fragmentos de 65 pb y 25 pb confirmándose la calidad de homocigotos sanos para estos 4 individuos.

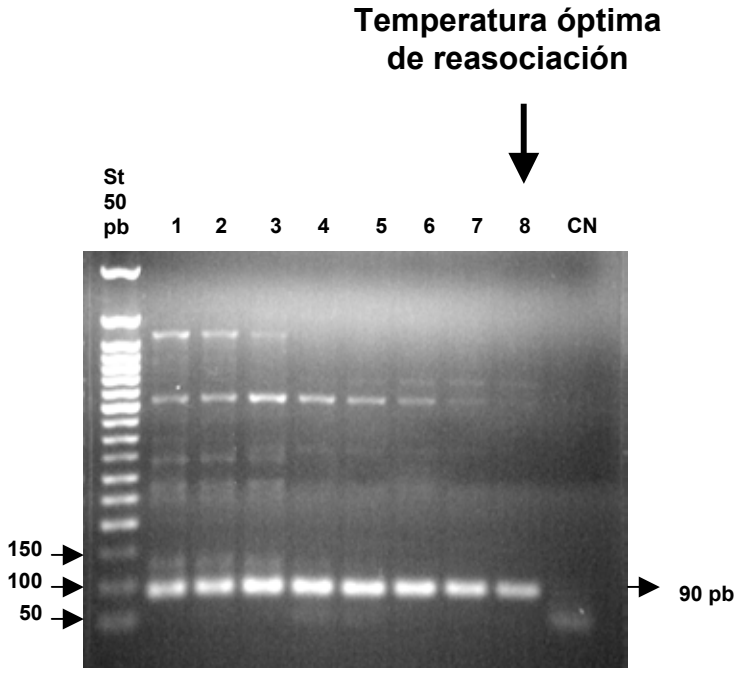


FIGURA 19: Gradiente de temperatura para determinación de temperatura de reasociación. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: 54,1ºC. Carril 2: 55,3ºC. Carril 3: 58,4ºC. Carril 4: 62,3ºC. Carril 5: 64,3ºC. Carril 6: 66,6ºC. Carril 7: 68ºC. Carril 8: 69,2ºC. Carril CN: Control negativo.

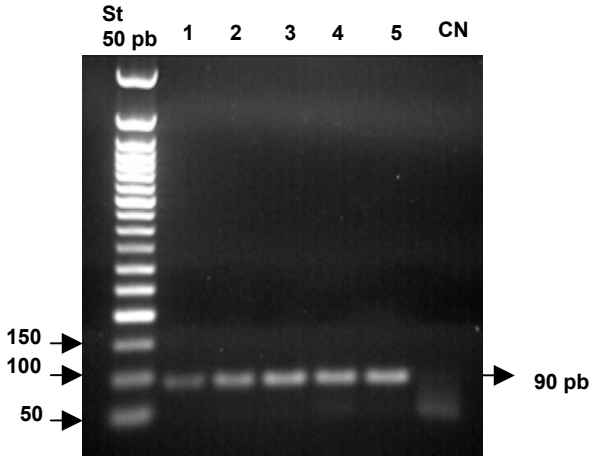


FIGURA 20: Determinación de concentración de $MgCl_2$ en optimización de PCR a partir de DNA genómico extraído de sangre. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. Carril St 50pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: 0,7 mM $MgCl_2$. Carril 2: 1 mM $MgCl_2$. Carril 3: 2 mM $MgCl_2$. Carril 4: 3 mM $MgCl_2$. Carril 5: 3,5 mM $MgCl_2$. Carril CN: Control negativo.

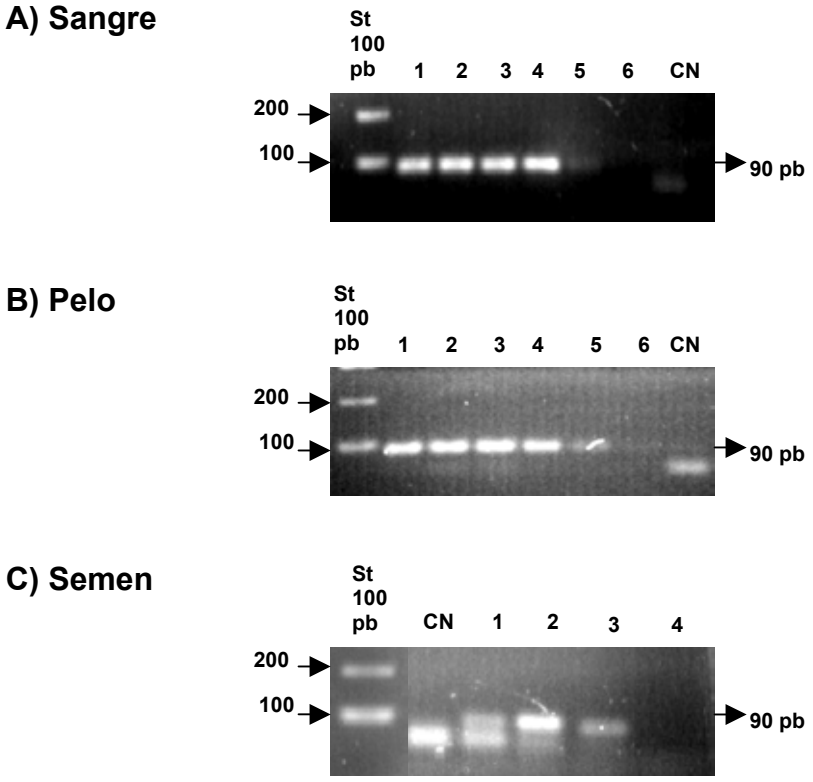


FIGURA 21: Determinación para PCR de cantidad de DNA genómico de muestras de sangre, pelo y semen. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. **A) y B)** Carril St 100pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: 60 ng. Carril 2: 100 ng. Carril 3: 300 ng. Carril 4: 600 ng. Carril 5: 1 μg. Carril 6: 1,2 μg. Carril CN: Control negativo. **C)** Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril CN: Control negativo. Carril 1: 2 ng. Carril 2: 7 ng. Carril 3: 20 ng. Carril 4: 50 ng.

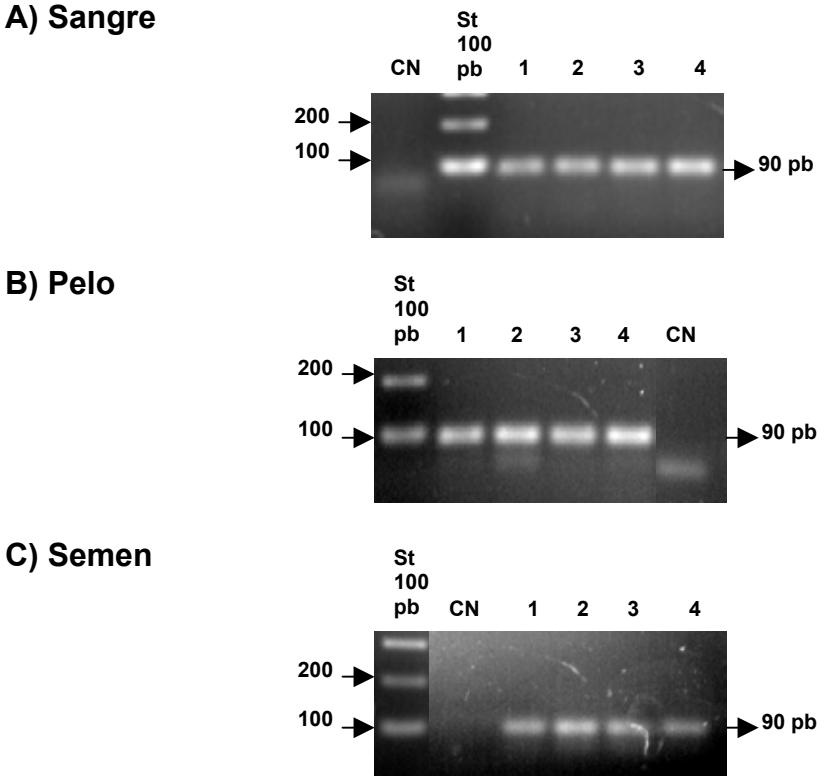


FIGURA 22: Amplificación por PCR de DNA genómico de sangre, pelo y semen. Fraccionamiento en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación. **A)** Carril CN: Control negativo. Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: Individuo 1. Carril 2: Individuo 2. Carril 3: Individuo 3. Carril 4: Individuo 4. **B)** Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril 1: Individuo 1. Carril 2: Individuo 2. Carril 3: Individuo 3. Carril 4: Individuo 4. Carril CN: Control negativo. **C)** Carril St 100 pb: Estándar de 100 pb. Carril CN: Control negativo. Carril 1: Individuo 1. Carril 2: Individuo 2. Carril 3: Individuo 3. Carril 4: Individuo 4.

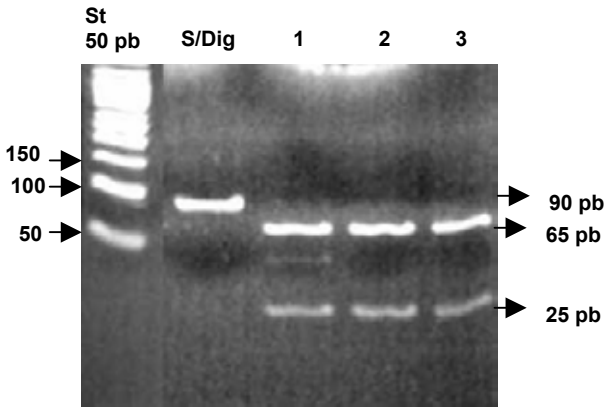


FIGURA 23: Determinación de tiempo de digestión de productos de amplificación. Fraccionamiento en gel de poliacrilamida nativo al 20 % de los productos digeridos. Carril St 50 pb: Estándar de 50 pb. Carril S/Dig: Producto de PCR sin digerir. Carril 1: Dig. 2 horas. Carril 2: Dig. 4 horas. Carril 3: Dig. 6 horas.

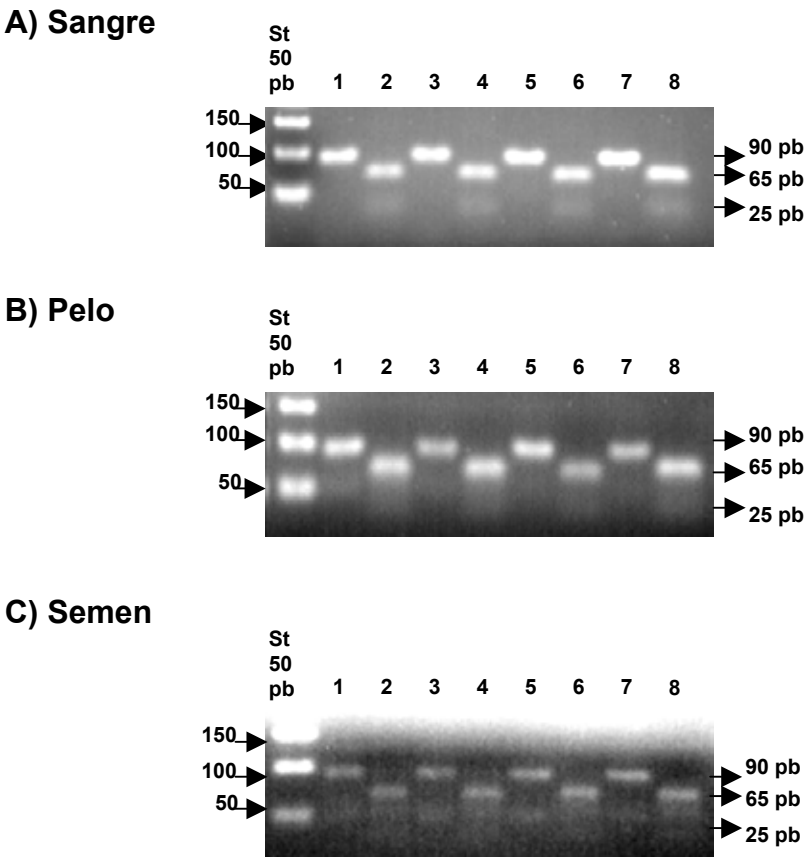


FIGURA 24: Digestión de productos de amplificación obtenidos a partir de muestras de DNA genómico de sangre, pelo y semen. A) B) y C) Fraccionamiento en gel de agarosa al 2% de los productos de digestión. Carril St 50 pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: Individuo 1, S/Dig. Carril 2: Individuo 1, Dig. Carril 3: Individuo 2, S/Dig. Carril 4: Individuo 2, Dig. Carril 5: Individuo 3, S/Dig. Carril 6: Individuo 3, Dig. Carril 7: Individuo 4, S/Dig. Carril 8: Individuo 4, Dig. S/Dig: Producto de PCR sin digerir. Dig: Producto de PCR digerido.

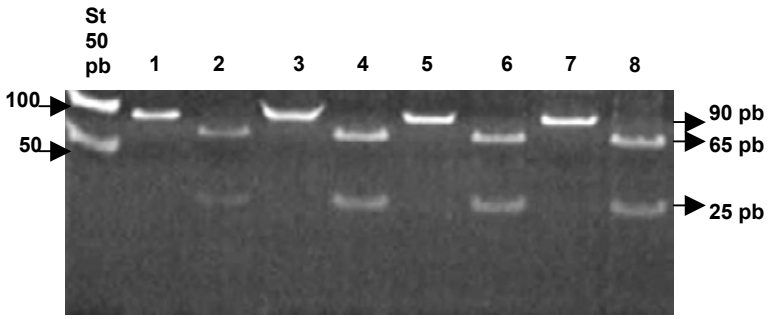


FIGURA 25: Digestión de productos de amplificación obtenidos a partir de DNA genómico de sangre. Fraccionamiento en gel de poliacrilamida al 20% de los productos de digestión. Carril St 50 pb: Estándar de 50 pb. Carril 1: Individuo 1, S/Dig. Carril 2: Individuo 1, Dig. Carril 3: Individuo 2, S/Dig. Carril 4: Individuo 2, Dig. Carril 5: Individuo 3, S/Dig. Carril 6: Individuo 3, Dig. Carril 7: Individuo 4, S/Dig. Carril 8: Individuo 4, Dig. S/Dig: Producto de PCR sin digerir. Dig: Producto de PCR digerido.

5. DISCUSIÓN

5.1 Extracción de DNA.

Se desarrollaron técnicas de extracción de DNA a partir del uso de Chelex-100, el cual es un método simple, rápido que involucra solventes no orgánicos y no requiere múltiples tubos de transferencias como otros métodos (Walsh et al., 1991). Chelex-100 de grado biología molecular es una resina quelante de alta pureza, pipeteable, libre de nucleasas, es especialmente diseñado y certificado para extracción de DNA. Chelex-100 asegura la remoción de inhibidores de PCR como iones de metales contaminantes que catalizan la digestión de DNA. Presenta una alta afinidad por iones metálicos multivalente (Polski et al., 1998). La extracción por este método es eficiente o más eficiente que usando fenol/cloroformo y proteinasa K (Walsh et al., 1991). Esto se demostró en las extracciones realizadas a partir de muestras de sangre (método A y método B) ya que para un mínimo volumen de muestra de 200 μl se obtuvo un DNA de mayor integridad y concentración por la metodología de Chelex-100 que por la de fenol/cloroformo en que se obtiene un DNA de excelente pureza, calidad e integridad pero no así en concentración para el mismo volumen de muestra usada. Esto se observó en los geles de calidad de DNA para los métodos A y B (figura 1). Estos métodos A y B diseñados y descritos en los puntos 3.2.1.1.1 y 3.2.1.1.2 permiten la obtención de un DNA de gran integridad y concentración para muestras de sangre fresca ó de unas semanas de conservación a 4ºC. Para muestras mantenidas a esta temperatura con 3 meses de antigüedad la integridad del DNA obtenido por estos métodos disminuye como se demuestra en la figura 1. En el panel D de esta figura con

el método A se obtuvo un DNA de integridad excelente en el 50% de las muestras y para el método B se obtuvo para un 75% de las muestras. Se demostró la integridad además del DNA extraído y mantenido a 4ºC por 5 días, en que se observó la mantención de su integridad para este tiempo trascurrido. Se debe señalar que para muestras de más de 1 año de antigüedad se pierde la capacidad de estos métodos de obtener un DNA integro ya que por extracciones realizadas se observó un DNA degradado y de baja calidad.

El DNA obtenido a través de estos dos métodos (método A y método B) presentan un alto tamaño molecular, lo que a pesar de no ser un factor critico, influye en la reacción de PCR (Sambrook et al., 1989). De acuerdo al marcador de tamaño molecular de 100 pb usado en la figura 1 en el panel D, el tamaño del DNA obtenido por los métodos A y B esta por sobre 10 kilobases.

Es de importancia señalar que para los métodos A y B el proceso de extracción debe ser continuado y no dejar los leucocitos en PBS 1X por muchas horas (ej. Una noche) ya que esto causa que los métodos generen un DNA muy degradado, pero con capacidad eso si para ser usado para PCR al menos para determinar estas dos enfermedades.

Existen además otras metodologías de extracción basándose en uso de Chelex-100 como la descrita por Polski et al. (1998) en que usó sangre impregnada en papel filtro y Chelex-100 con lo que obtuvo un DNA suficiente y estable para múltiples ensayos de PCR-RFLP.

En relación con las muestras de pelo, el DNA genómico extraído obtenido a través del método de Chelex-100 fue muy degradado, poco integro, pero suficiente para

poder cumplir con la amplificación por PCR de los fragmentos requeridos para determinación de Citrulinemia y BLAD (método 2). En el centro de inseminación artificial de la UACh el uso de DNA de pelo obtenido usando Chelex-100 es ampliamente usado en test de paternidad obteniéndose mejores resultados que con el uso de DNA extraído de muestras de sangre a través de esta misma resina. Como dato anexo se ha señalado que en humanos el DNA extraído de folículos pilosos de cuero cabelludo a través de Chelex-100, es recomendado para PCR incluso hasta para los cabellos femeninos teñidos (Suenaga et al., 2005).

Con las muestras de semen, el DNA extraído al igual que con las muestras de pelo fue degradado y poco integro pero suficiente también para determinación de Citrulinemia y BLAD (método 2).

Se midió también la relación A_{260}/A_{280} para DNA extraído a través de muestras de pelo de 7 individuos cuyos valores están fuera del rango de 1,8 a 2 en que se encuentran las preparaciones puras de DNA. Al existir contaminación con proteínas estos valores disminuyen como se muestran en los resultados obtenidos, esta contaminación impide una cuantificación adecuada de la muestras de DNA (Sambrook., et al 1989; Prieto 2002).

La extracción de DNA a través de muestras de leche usando Chelex-100 también es otro método efectivo para genotipificar vacas lecheras de raza Holstein Friesian, es un procedimiento validado por Amills et al. (1997) cuya principal característica en el proceso de amplificación de DNA es el aumento en el número de ciclos de PCR para poder obtener un DNA amplificable para ser usado como herramienta para análisis genético.

5.2 Determinación de Citrulinemia y BLAD.

En el montaje y estandarización para determinar Citrulinemia y BLAD los partidores usados fueron probados en bases de datos como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) con lo que se buscaron los genes requeridos para luego ubicar en forma teórica los partidores dentro de su gen correspondiente observándose además los sitios de corte para las enzimas de restricción *Ava*II y *Taq*I que se usaron para determinación de Citrulinemia y BLAD respectivamente.

Para el montaje de las técnicas de determinación de Citrulinemia se usó los mismos partidores utilizados por Dennis et al. (1989) y Robinson et al. (1993). Para la determinación de BLAD se diseñaron dos nuevos métodos de genotipificación. Se diseño un par de partidores y se usó el partidor FOR descrito por Shuster et al., (1992) el cual se ocupó para el método 2, denominándose como FOR2. Los nuevos partidores diseñados (FOR1 Y REW) presentan un 45% de A/T y un 55% de G/C, una longitud de 20 nucleótidos y una Tm teórica de 62ºC como características principales. El partidor FOR de Shuster et al., (1992) presenta un 31,6% de A/T y un 68,4% de G/C, una longitud de 19 nucleótidos y una Tm teórica de 64ºC.

Con el alineamiento de las secuencias del gen CD18 bovino y la secuencia del cDNA del gen CD18 bovino (Anexo 8) se comprobó la selección de los partidores para el método 2 de determinación de BLAD, ya que se observa por el alineamiento que parte del segmento amplificado por este nuevo método 2 coincide con lo amplificado por Shuster et al. (1992). Este mismo alineamiento también sirve para comprobar la

selección de los partidores para el método 1. En el Anexo 9 se observa en el cuadrado el sitio en que ocurre la mutación en un homocigoto enfermo o un heterocigoto portador.

Para ambas enfermedades se determinó la temperatura de hibridación de los partidores estandarizándose así las condiciones de PCR. Posteriormente con el fin de optimizar las reacciones de PCR, se determinó las concentraciones $MgCl_2$ y el rango de cantidad de DNA genómico para las reacciones de PCR. La determinación de la concentración de $MgCl_2$ es un paso critico para la especificidad de la reacción (Harford et al., 1999) esto se ve demostrado en la figura 4 (montaje de determinación de Citrulinemia) en que al aumentar la concentración de $MgCl_2$ se produce inespecificidad de la reacción ya que se observan bandas inespecíficas en las concentraciones más alta de $MgCl_2$ específicamente con el uso de muestras de pelo (3,5 mM) y semen (3 mM y 3,5 mM). Se observa también en esta figura que la amplificación del fragmento de 176 pb se produce sobre los 2 mM de $MgCl_2$. En el método 1 de determinación de BLAD se observa también una amplificación del producto amplificado de 1234 pb solo a concentraciones de 2 mM y 3 mM de $MgCl_2$ no observándose bandas inespecíficas. Por otra parte, para el método 2 de determinación de BLAD se observan fragmentos amplificados de 90 pb en todo el rango estudiado. Estos datos demuestran la importancia de la estandarización de la concentración de $MgCl_2$ ya que algunos autores mencionan una concentración de 1,5 mM de $MgCl_2$ como concentración estándar para las reacciones de PCR (Sambrook et al., 1989) la cual de haberse usado puede no haber amplificado los productos de PCR para Citrulinemia y BLAD (método 1) o haber producido una banda de menor intensidad a esta concentración. De acuerdo a estos

resultados obtenidos se determinó 2 mM como concentración optima de $MgCl_2$ para todas las reacciones de PCR.

La determinación de la cantidad de DNA para la reacción de PCR es de importancia ya que una alta cantidad de templado disminuye la eficiencia de PCR debido al mayor número de contaminantes en el DNA (Harford et al., 1999). Esto se ve incrementado con el uso de Chelex-100 como metodología debido a que no es una extracción pura de DNA lo que podría contener inhibidores de PCR como es con las muestras de sangre (Walsh et al., 1991). Esto es demostrado en el caso especifico en la determinación de cantidad de DNA extraído de muestras de sangre en el montaje de determinación de Citrulinemia en que se observa en muestras de sangre de la figura 5 que a concentraciones de 1,2 μg no se observa amplificación del producto de PCR que se espera, ocurriendo lo mismo para el método 1 y 2 de determinación de BLAD.

Cabe señalar la importancia de la eliminación del grupo Hemo que puede estar presente en las extracciones de DNA ya que es el mayor inhibidor de PCR, se sugiere que el inhibidor es un producto de la digestión del complejo Hemo de la sangre con proteinasa K. Este producto no se aísla completamente por parte de los solventes orgánicos y coprecipitan con el DNA, por lo tanto se hace importante la eliminación de la hemoglobina por medio de un tampón (Prieto, 2002). Por lo cual es importante el lavado con la solución de lisis de eritrocitos durante el proceso de extracción de DNA a partir de muestras de sangre.

Para el caso de DNA extraído de muestras de pelo se observa amplificación en todo el rango estudiado en los ensayos para determinación de Citrulinemia pero no sucedió lo mismo en los experimentos para determinar BLAD a través del método 2 en

que no hubo amplificación sobre 1 μg. Estos dos ensayos fueron realizados con una muestra de un mismo individuo extraída el mismo día. Esta diferencia de amplificación para BLAD a través del método 2 posiblemente se deba a que el DNA usado contenía más inhibidores de PCR ya que se disminuía el volumen de DNA extraído cada vez que se sacaba muestra pudiéndose así recoger más de estos inhibidores de PCR. Otro dato importante en la extracción de DNA a partir de pelo y su uso como templado para PCR es la presencia de melaninas hidrosolubles que se generan durante el proceso de extracción de DNA y que forman un complejo inactivo que está constituido por dos moléculas de melanina y una de *Taq* polimerasa, esta melanina puede ser eliminada a través de una minicolumna Bio-Gel P-60 (Yoshii et al., 1993).

En la determinación de cantidad de DNA genómico para la reacción de PCR (Citrulinemia) al usar DNA de muestras de semen, se observa amplificación hasta los 20 ng y sobre esta cantidad hasta los 600 ng no hubo amplificación. En este ensayo se usó la extracción obtenida de DNA (150 ng a 600 ng) y una dilución de esta (2 ng a 50 ng). Al usarse la extracción obtenida así como su dilución en que se agrega una mayor cantidad en volumen de la dilución para los 50 ng se agrega una mayor cantidad de inhibidores de PCR. En la metodología de la extracción a partir de estas muestras de semen se usan inhibidores de PCR como el SDS (Harford et al., 1999; Prieto, 2002) que se mantiene dentro del volumen de la extracción. Esto se observó también para el método 2 de determinación de BLAD. La dilución de la extracción de DNA se realizó para hacer que los inhibidores se encuentren a una concentración mínima a la cual no sean capaces de inhibir la reacción de PCR (Prieto, 2002) así como también para poder agregar la cantidad de DNA requerida para las reacciones de PCR.

Se disminuyó la concentración de partidores al usar DNA extraído de muestras de semen ya que hubo formación de dímeros a las concentraciones de partidores ocupadas al usarse DNA de muestras de sangre y pelo. La aparición de estos dímeros en los carriles de las muestras bajo los productos de amplificación, poseen el mismo tamaño que los dímeros que se producen en los controles negativos para todos los PCR en las muestras de pelo y sangre. Se observa en los geles del montaje de determinación de Citrulinemia (figura 6) que las bandas de dímeros están por debajo de la altura de los 50 pb del marcador molecular (50 pb), esto debido a que los partidores tienen un tamaño de 18 nucleótidos. Estos dímeros son formados debido a hibridación de los extremos 3` de los partidores usados extendiéndose la amplificación (Harford et al., 1999). Para BLAD (método 2) también se observa esta formación de dímeros en los carriles de los controles negativos. La ausencia de amplificación a cantidades más alta de DNA extraído de muestras de semen podría también ser debido a que hubo una concentración de primer limitada haciendo la reacción de PCR extremadamente ineficiente (Sambrook et al., 1989).

La importancia de la determinación de estas cantidades de DNA es también para fijar un rango en que se asegure la amplificación del fragmento esperado buscando así una cantidad promedio de DNA a agregar en la reacción de PCR en el caso de que no se cuente con un espectrofotómetro para medir la concentración de DNA.

En el método 1 de determinación de BLAD, la temperatura de hibridación determinada se basó en una gradiente realizada con una cantidad mayor de partidores, la que posteriormente fue disminuida ya que al hacer un gel de agarosa para observar los productos digeridos se observó un exceso de partidores que impidió observar en

buena forma el producto de digestión de 65 pb, por lo que se determinó seguir con la misma temperatura de hibridación pero disminuyendo a la mitad la concentración de partidores, obteniendo así resultados excelentes por este método.

Los productos amplificados para determinación de Citrulinemia y BLAD a través de sus dos metodologías y que se muestran en las figura 6, figura 17 y figura 22 concuerdan con lo esperado teóricamente.

Los tiempos de digestión fueron determinados para cada método. Para determinación de Citrulinemia, se observó una digestión completa a 1 hora de digestión, pero sobre la base de los resultados obtenidos en otros ensayos, se determinó 3 horas como tiempo de digestión óptimo. Lo mismo sucedió con el método 1 de determinación de BLAD en que a pesar de observarse una digestión a las 2 y 4 horas se determinó como tiempo de digestión 5 horas. Para el método 2 se determinó 2 horas, esto debido a que se realizó un gel de poliacrilamida al 20% para observar las bandas obtenidas como producto de digestión, no requiriéndose un mayor tiempo para este método, además los resultados obtenidos por otros ensayos no hicieron necesario un mayor tiempo de digestión.

Los productos de digestión obtenidos para ambas enfermedades demuestran que las bandas obtenidas y su ubicación en relación a los marcadores de tamaño molecular coinciden con lo esperado teóricamente, genotipificandose a los individuos usados como homocigotos sanos para ambas enfermedades.

En el caso del montaje de determinación de Citrulinemia se compararon los resultados con los publicados por Dennis et al., (1989) observándose resultados similares a los esperados teóricamente.

Se usaron geles de agarosa para determinación de Citrulinemia y geles de agarosa además de geles de poliacrilamida nativos y nativos en gradiente para determinación de BLAD. Para el método 1 en un principio se usó aparte de los geles de agarosa, un gel de poliacrilamida nativo al 8% (no se muestra en el presente trabajo) el que posteriormente fue modificado, preparándose un gel de poliacrilamida nativo en gradiente para una mejor separación de las bandas más grandes de 626 y 544 pb además de poder observar los 65 pb permitiendo visualizar en un gel con mejor resolución las bandas obtenidas por la digestión. Para el método 2 de determinación de BLAD a través de los geles de agarosa se observan bien los resultados pero hay mejor resolución de las bandas en un gel de poliacrilamida al 20%, tal como se muestra en la figura 25. Para este método 2 se hace dificultoso la observación de las bandas de 25 pb en geles de agarosa, especialmente al ser usado DNA extraído a partir de muestras de semen con que se amplificó el producto digerido, se observan dímeros de partidores formados en los carriles de los productos de PCR no digeridos que se habían evitado al disminuir la concentración de partidores. Esto se observa en este gel ya que en otro experimento se observaron mejor las bandas de los 25 pb pero con poca resolución. La ubicación de la banda de los 65 pares de bases y de acuerdo a lo esperado teóricamente para los productos de digestión hace posible la genotipificación de los individuos, es importante eso sí, la ausencia de los dímeros de partidores para que no interfieran en la observación de las bandas.

Para determinación de Citrulinemia y para determinación de BLAD (método 1) se hicieron pruebas con DNA extraído de muestras de sangre a través de la metodología tradicional de fenol/cloroformo en que se obtuvieron resultados similares a los obtenidos

a través del uso de Chelex-100 corroborando así el uso de este método de extracción de DNA genómico como metodología para la determinación de estas enfermedades genéticas.

De acuerdo a los resultados señalados por Felmer et al. (2001) el cual genotipificó a través de su método de determinación de BLAD a un reproductor heterocigoto portador y 2 vacas heterocigotas portadoras (de 3 vacas analizadas) hace necesario el montaje de esta técnica como método valido para determinar esta enfermedad genética.

Es importante señalar además que en el uso de las muestras de semen no influyen la condición de haploide de los espermatozoides ya que no se ocupa uno solo sino que millones de células germinales en la extracción de DNA.

Se hizo necesaria la presencia de homocigotos enfermos o heterocigotos portadores para estas enfermedades para analizar los resultados en base a estos individuos. La existencia de estos individuos podrían encontrarse en un futuro análisis tanto para los toros como vacas que vienen de una línea genética con ancestros portadores o enfermos.

CONCLUSIONES

Los métodos A y B de extracción de DNA a partir de muestras de sangre a través del uso de Chelex-100 proporciona un DNA de alto tamaño molecular, integro y en gran cantidad para las reacciones de PCR-RFLP.

La utilización de las técnicas descritas de determinación de estas enfermedades genéticas, Citrulinemia y BLAD, permite la identificación en forma rápida y fácil de homocigotos enfermos, homocigotos sanos y heterocigotos portadores a través del uso de Chelex-100 como metodología de extracción de DNA.

El uso de DNA extraído a través de la metodología tradicional de fenol/cloroformo permitió confirmar los resultados obtenidos a través del uso de la metodología de Chelex-100, esto valida los resultados para la determinación de ambas enfermedades usando este método de extracción.

Para BLAD, el mejoramiento a las técnicas anteriormente descritas permite obtener resultados rápidos, confiables y exactos para la genotipificación de toros de raza Holstein Friesian, entre otras (Ej. Frizón Negro) antes de que entren al programa de inseminación artificial.

A pesar de los buenos resultados que dan los dos métodos diseñados y montados de determinación de BLAD, el método 2 con observación de los productos de digestión usando un gel de poliacrilamida da mejor resolución que los geles de agarosa.

Las muestras de sangre otorgan el mejor resultado para los montajes de determinación de estas enfermedades.

La utilización de estas técnicas permitió que los individuos usados sean genotipificado como homocigotos sanos para ambas enfermedades.

Mediante esta metodología implementada, se podrá comprobar las muestras de semen de toros con porcentaje de Holstein Friesian del centro de inseminación artificial para ambas enfermedades genéticas.

Estas técnicas fueron montadas también exitosamente en el Centro de Inseminación Artificial de la UACh.

PROYECCIÓN DEL TRABAJO

La utilización de esta técnica descrita permitirá la identificación en forma fácil de homocigotos enfermos, homocigotos sanos y heterocigotos portadores para las enfermedades genéticas BLAD y Citrulinemia.

Este mejoramiento a las técnicas anteriormente descritas permitirá obtener resultados rápidos, confiables y exactos para la genotipificación de toros de raza Holstein Friesian, entre otras antes de que entren al programa de inseminación artificial.

Mediante esta metodología implementada, se podrá comprobar las muestras de semen de toros con porcentaje de Holstein Friesian del centro de inseminación artificial.

Además de acuerdo a los resultados obtenidos por Felmer et al. (2001) para BLAD, se hacia necesario contar con una técnica en Chile para genotipificar a los reproductores nacionales así como a las vacas de esta raza Holstein Friesian, por lo cual se ofrecerá estas metodologías como servicio al resto del país para los criaderos nacionales.

6. BIBLIOGRAFÍA

Amills, M., Francino, O., Jansa, M., Sanchez, A. (1997) Insolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin. *The Journal of dairy research*, 64(2), 231-238.

Arnheim, N., White, T., Rainey, W. (1990) Application of PCR: Organismal and Population Biology. *BioScience*, 40(3), 174-182.

Brody, J., Kern, S. (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium por DNA electroforesis. *Biotechniques*, 36(2), 214-216.

Citek, J., Bláhová, B. (2004) Recessive disorders – a serious health hazard?. *Journal of Applied Biomedicine*, 2, 187-194.

Dennis, J., Healy, P., Beaudet, A., O Brien, W. (1989) Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 7947-7951.

Felmer, R., Butendieck, N., Butendieck, B., Villegas, J. (2001) Detección de un defecto genético en bovinos mediante una prueba de ADN. *Agricultura Técnica,* 61(1), 42-50.

Gilbert, R., Rebhun, W., Kim, C., Kehrli, M., Shuster, D., Ackermann, M. (1993) Clinical manifestations of leukocyte adhesion deficiency in cattle:14 cases (1977-1991). *Journal American Veterinary Medical Association*, 202, 445-449.

Harford, J., Dasso, M., Lippincott-Schwartz, J., Yamada, K., Bonifacio, J. (1999) Current Protocols in Cell Biology. John Wiley and Sons. New York.

Healy, P., Harper, P., Dennis, J. (1990) Bovine citrulinemia: a clinical, pathological, biochemical and genetic study. *Australian Veterinary Journal*, 67(7), 255-258.

Kriegesmann, B., Jansen, S., Baumgartner, B., Brenig, B. (1997) Partial genomic structure of the bovine CD18 gene and refinement of test for bovine leukocyte adhesion deficiency. *Journal of Dairy Science*, 80, 2547-2549.

Nagahata, H., Nochi, H., Tomoto, K., Taniyama, H., Noda, H., Morita, M. Kanamaki, M., Kociba, G. (1993) Bovine leukocyte adhesión deficiency in holstein cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57, 255-261.

Nagahata, H., Kehrli, M., Murata, H., Okada, H. Noda, H., Kociba, G. (1994) Neutrophil function and pathologic findings in holstein calves with leukocyte adhesion deficiency. *American Journal of Veterinary Research*, 55(1), 40-48.

Nagahata, H., Higuchi, H., Nochi, H., Tamoto, K., Araiso, T., Noda, H., Kociba, G. (1996) Biosynthesis of β2-integrin, intracellular calcium signalling and functional responses of normal and CD-18 deficient bovine neutrophils. *Research in Veterinary Science*, 61, 95-101.

Nagahata, H., Masuyama, A., Masue, M., Yuki, M., Higuchi, H., Ohtsuka, H. Kurosawa, T., Sato, H., Noda, H. (1997) Leukocyte emigration in normal calves and calves with leukocyte adhesión deficiency. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(12), 1143-1147.

Nagahata, H., Miura, T., Tagaki, K., Ohtake, M. Noda, H., Yasuda, T., Nioka, K. (1997) Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(4), 233-238.

Nagahata, H., Hagiwara, K., Kasamatsu, M., Higuchi, H. Kurosawa, T. (2002) Cytokine profile of a Holstein calf with bovine leukocyte adhesion deficiency during the acute-phase inflammatory response. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(12), 1141-1143.

Nagahata, H. (2004) Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): A Review. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(12), 1475-1482.

Polski, J., Kimzey, S., Percival, R., Grosso, L. (1998) Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100. *Molecular Pathology*, 51, 215-217.

Prieto, L. (2002) Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses criticas: valoración de estrategias y resultados. Tesis, Grado de Doctor, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid

Ribeiro, L., Baron, E., Martinez, M., Coutinho, L. (2000) PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and gir cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Biology,* 23(4), 831-834.

Robinson, J., Burns, J., Magura, C., Shanks, R. (1993) Low incidence of citrulinemia carriers among dairy cattle of the United States. *Journal of Dairy Science*, 76, 853-858.

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Sharf, S., Higuchi., R., Horn, G., Mullis, K., Herlich, H. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

Sambrook, J., Frisch, E., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manuel. 2º Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.

Shuster, D., Kehrli, M., Ackermann, M., Gilbert, R. (1992) Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 89, 9225-9229.

Suenaga, E., Nakamura, H. (2005) Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 820(1), 137-141.

Tammen, I., Klippert, H., Kuczka, A., Treviranus, A., Pohlenz, J., Stöber, M., Simon, D., Harlizius, B. (1996) An improved DNA test for bovine leucocyte adhesion deficiency. *Research in Veterinary Science*, 60, 218-221.

Walsh, P., Metzger, D., Higuchi, R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.

Yoshii, T., Tamura, K., Taniguchi, T., Akiyama, K., Ishiyama, I. (1993) Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. *Nippon Hoigaku Zasshi*, 47(4), 323-329.

Zaragoza, P., Rodellar, R., Osta, R., Elduque, C., Martín, I., Marcos, S., Vázquez, F., Romero, A., García-Muro, E., Zarazaga, I. (1994) Aplicaciones de la PCR al diagnóstico de enfermedades. Un ejemplo concreto: detección de portadores de la “deficiencia de adhesión leucocitaria bovina (BLAD/LAD bovine)”. *Medicina Veterinaria*, 11(3), 133-138.

7. ANEXOS

7.1 Anexo 1. Soluciones usadas y preparación de estas.

Preparación Chelex-100 5%

Pesar 5 g de Chelex-100 y ajustar a 100 ml con agua desionizada.

Preparación SB 20X

Pesar 8 g de NaOH y 45 g ácido bórico, agregar agua, disolver y ajustar volumen final a 1 litro con agua desionizada (Brody et al., 2004).

Preparación TBE 5X

Disolver 54 g Tris Base; 27,5 g ácido bórico y 20 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) en agua desionizada, disolver y ajustar volumen final a 1 litro con agua desionizada (Sambook et al., 1989).

Preparación PBS 10X

Pesar 80 g NaCl; 2 g KCl; 2,4 g KH_2PO_4; 14,4 g Na_2HPO_4 en agua desionizada. Disolver en 800 ml de agua desionizada. Ajustar pH a 7,4. ajustar volumen final a 1 litro con agua desionizada (Harford et al., 1999). Esterilizar por autoclavado.

Preparación tampón lisis (Extracción DNA fenol / cloroformo) 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; SDS 0,5%.

Para preparar 100 ml agregar: 2 ml NaCl 5M; 1 ml Tris-HCl 1M pH 8,0; 5 ml EDTA 0,5 M pH 8,0; 2,5 ml SDS 20% y aforar a 100 ml con agua desionizada estéril.

Preparación solución lisis eritrocitos.

5,4 g sacarosa; 500 μl Tris-HCl pH 7,5; 250 μl $MgCl_2$ 1M; 500 μl Tritón X-100 y agua desionizada para volumen de 50 ml.

Preparación tampón lisis (Extracción DNA semen) 50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; SDS 2%, pH 7,5

Para preparar 100 ml agregar: 1 ml NaCl 5M; 1 ml Tris-HCl 1M pH 7,5; 2 ml EDTA 0,5 M pH 8,0; 10 ml SDS 20% y aforar a 100 ml con agua desionizada estéril.

Preparación mix dNTPs 10mM

Sacar 10 μl de cada dNTP (dATP, dCTT, dTTP, dGTT,) y agregar 60 μl de agua desionizada estéril y filtrada. Guardar a –20ºC

Preparación tampón TE, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0.

Mezclar 5 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0; 0,1 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0, mezclar con agua desionizada y ajustar volumen a 500 ml. Alicuotar (100 ml, recomendado) y autoclavar la solución. Guardar a temperatura ambiente.

7.2 Anexo 2. Equipos principales utilizados.

Figura a) Espectrofotometro, Shimadzu UV 1203

Figura b) Termociclador, Thermo Electron corporation (Px2 Thermal cycler)

Figura c) Baño termorregulado, KiotoYCW-03S

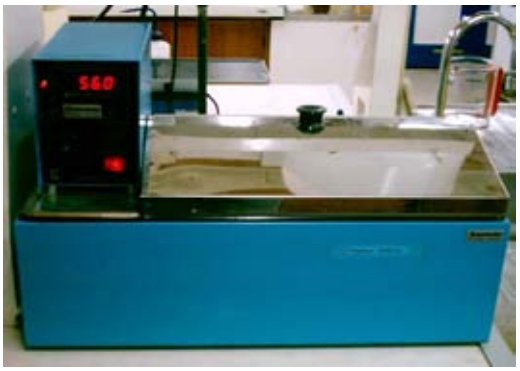
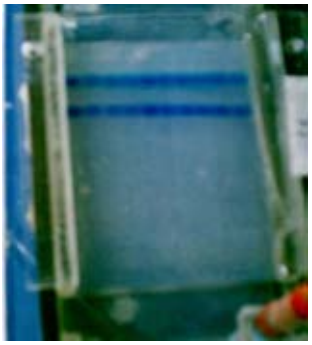


Figura d) CCD Camera, Spectroline model CA 1000/F; Video Archival unit, Spectroline model AU-1000/F; Impresora, Sony UP-860; Transiluminador Vilbert Loumart (TFX-20 M) y cámara de electroforesis de geles de agarosa.



7.3 Anexo 3. Reproductores usados (Frizón Negro y Frizón Rojo).

a) Lego FN

b) Marlin FR

c) Mosco FR

d) Mustafa FR

Fuente: Catálogo reproductores de leche,
Centro de Inseminación Artificial. Año 2004.

7.4 Anexo 4. Análisis de secuencia de partidores en BLAST. Determinación de Citrulinemia.

CFOR

5` GTGTTCATTGAGGACATC 3`

gi|162696|gb|M26198.1|BOVASS Bovine ASS mRNA encoding argininosuccinate synthetase, complete cds
Length=1398

```
 Score = 36.2 bits (18),  Expect = 0.43
 Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    GTGTTCATTGAGGACATC  18
            ||||||||||||||||||
Sbjct  184  GTGTTCATTGAGGACATC  201
```

CREW:

5` CCGTGAGACACATACTTG 3`

gi|162696|gb|M26198.1|BOVASS Bovine ASS mRNA encoding argininosuccinate synthetase, complete cds
Length=1398

```
 Score = 36.2 bits (18),  Expect = 0.43
 Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    CCGTGAGACACATACTTG  18
            ||||||||||||||||||
Sbjct  359  CCGTGAGACACATACTTG  342
```

7.5 Anexo 5. Análisis de secuencia de partidores en BLAST. Determinación de BLAD. Método 1.

FOR1

5` GACTCCATTCGCTGTGACAC 3`

```
gi|2407808|emb|Y12672.1|BTCD18  B.taurus CD18 gene
          Length=1640

 Score = 40.1 bits (20),  Expect = 0.024
 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1   GACTCCATTCGCTGTGACAC  20
           ||||||||||||||||||||
Sbjct  29  GACTCCATTCGCTGTGACAC  48
```

REW

5` GCTTCTTGACGTTGACGAGG 3`

```
gi|2407808|emb|Y12672.1|BTCD18  B.taurus CD18 gene
          Length=1640

 Score = 40.1 bits (20),  Expect = 0.024
 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1     GCTTCTTGACGTTGACGAGG  20
             ||||||||||||||||||||
Sbjct  1262  GCTTCTTGACGTTGACGAGG  1243
```

7.6 Anexo 6. Análisis de secuencia de partidores en BLAST. Determinación de BLAD. Método 2.

FOR2

5` TCCGGAGGGCCAAGGGCTA 3`

```
gi|2407808|emb|Y12672.1|BTCD18  B.taurus CD18 gene
          Length = 1640

 Score = 38.2 bits (19), Expect = 0.076
 Identities = 19/19 (100%)
 Strand = Plus / Plus


Query: 1    TCCGGAGGGCCAAGGGCTA 19
            |||||||||||||||||||
Sbjct: 1173 TCCGGAGGGCCAAGGGCTA 1191
```

REW

5` GCTTCTTGACGTTGACGAGG 3`

```
gi|2407808|emb|Y12672.1|BTCD18  B.taurus CD18 gene
          Length=1640

 Score = 40.1 bits (20),  Expect = 0.024
 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1     GCTTCTTGACGTTGACGAGG  20
             ||||||||||||||||||||
Sbjct  1262  GCTTCTTGACGTTGACGAGG  1243
```

7.7 Anexo 7. Análisis de secuencia de partidores en BLAST. Determinación de BLAD.

FOR (FOR2)

5` TCCGGAGGGCCAAGGGCTA 3`

```
gi|162818|gb|M81233.1|BOVCD18A  LU Bos taurus antigen CD18
(CD18) mRNA, complete cds
          Length = 2817

 Score = 38.2 bits (19), Expect = 0.076
 Identities = 19/19 (100%)
 Strand = Plus / Plus


Query: 1   TCCGGAGGGCCAAGGGCTA 19
           ||||||||||||||||||
Sbjct: 461 TCCGGAGGGCCAAGGGCTA 479
```

REW

5` GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTAGTACAGG 3`

```
gi|162818|gb|M81233.1|BOVCD18A  LU Bos taurus antigen CD18
(CD18) mRNA, complete cds
          Length = 2817

 Score = 60.0 bits (30), Expect = 1e-07
 Identities = 30/30 (100%)
 Strand = Plus / Minus


Query: 1   GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTAGTACAGG 30
           ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 518 GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTAGTACAGG 489
```

7.8 Anexo 8. Alineamiento secuencia gen CD18 bovino / secuencia del cDNA del gen CD18 bovino. Determinación de BLAD.

Genbank: gi: 2407808 = Y12672 = Gen CD18 bovino.

Genbank: gi: 162818 = M81233 = Secuencia del cDNA del gen CD18 bovino.

```
gi|2407808|      ACCAGCATAAGAGAATGGGGAGAGTCCTGAGGTTCTGAGGCCTGACAAGATGCCATAAGT 1080
gi|162818|       GCGGAGCTGCTGTCAAAGGGCTGCCCAGCTGATGACATCATGGAACCCAAGAGCCTCGCT 360
                  *     *      *  ***     *    * *           **   *   * *   *

gi|2407808|      GCCCATGAACCCCCCCACCCCCAGACCAGATAGTACACCCTGACTATCTCCCAAATCCT 1140
gi|162818|       GAGACCCGGGACAGCCAGGCGGGCAGTCGGAAGCAGCTGTCCCCACAGGAAGTGACGCTC 420
                 *          *  **   *       * **     *   *     *       *  *
                                                                 FOR2

gi|2407808|      GG--------CAGGTCAGGCAGTTGCGTTCAACGTGACCTTCCGGAGGGCCAAGGGCTAC 1192
gi|162818|       TACCTGAGACCAGGTCAGGCAGTTGCGTTCAACGTGACCTTCCGGAGGGCCAAGGGCTAC 480
                           **************************************************
                              REW (Shuster et al., 1992)                REW

gi|2407808|      CCCATCGACCTGTACTACCTGATGGACCTCTCCTACTCCATGGTGGATGACCTCGTCAAC 1252
gi|162818|       CCCATCGACCTGTACTACCTGATGGACCTCTCCTACTCCATGGTGGATGACCTCGTCAAC 540
                 ************************************************************

gi|2407808|      GTCAAGAAGCTGGGGGGTGACCTGCTCCGGGCCCTCAATGGCATCACCGAGTCGGGCCGC 1312
gi|162818|       GTCAAGAAGCTGGGGGGTGACCTGCTCCGGGCCCTCAATGGCATCACCGAGTCGGGCCGC 600
                 ************************************************************

gi|2407808|      ATTGGTGAGGCAGCTACTCCATCTTCCCCTGAAACCCCAAGCCCCGGTCCCAGGCACCTC 1372
gi|162818|       ATTGGTTTCGGGTCCTTCGTGGACAAGACGGTGCTCCCCTTCGTCAACACGCACCCCG-- 658
                 ******   *   *              * *    ***   *  *    *    * *

gi|2407808|      TGCACCTCTGCACCCCAAGGGCAGGGCGCCAGGCCCCTCCCCACGTGCCGGGCCTTCCTA 1432
gi|162818|       AGAAGCTGCGGAACCCCTGCCCCAACAAGGAG-AAGGAGTGCCAGCCCCCGTTCGCCTTC 717
                  * * **  * * ***  *  *        **         *  *  ** *  *  * *
```

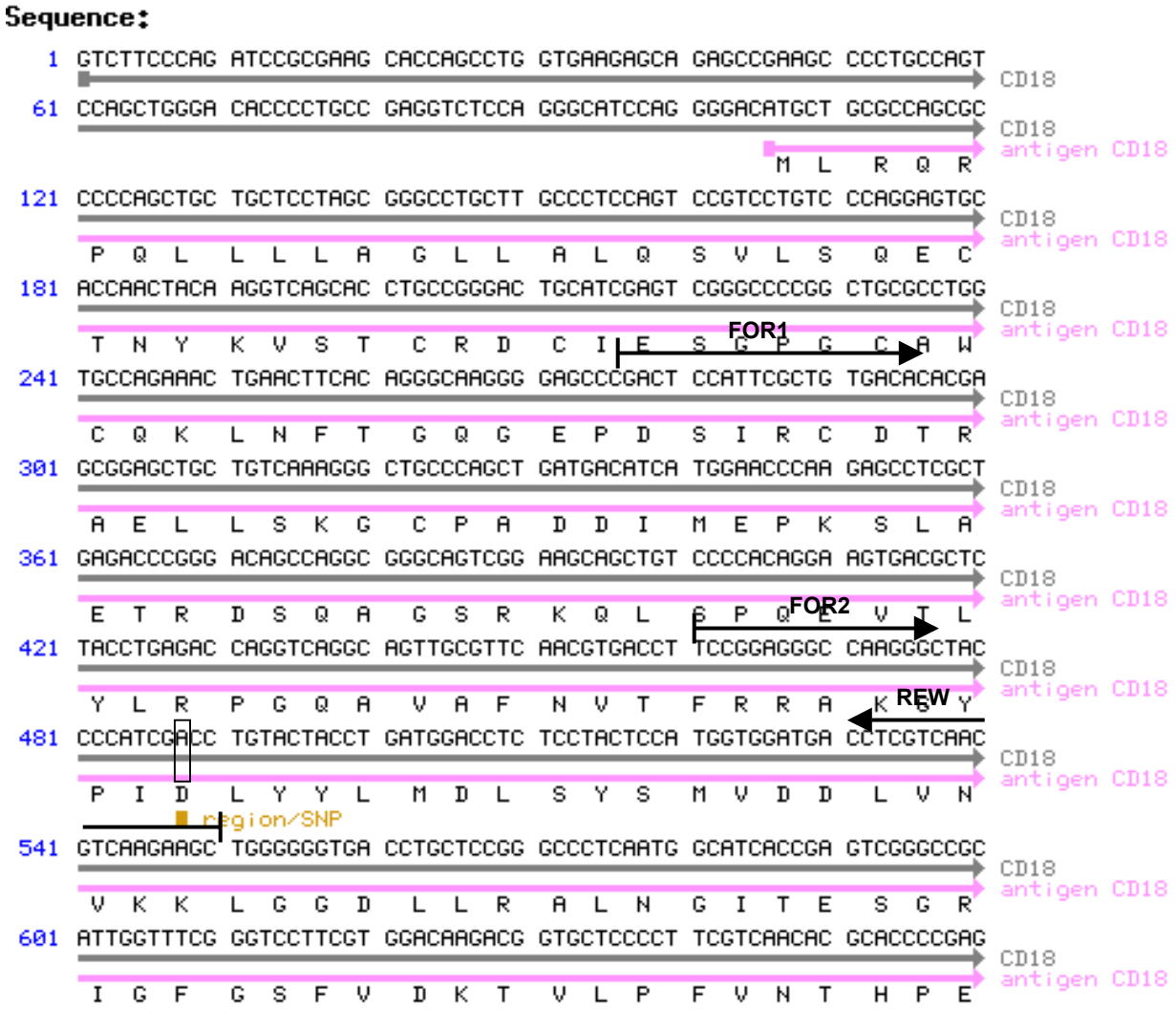
Color celeste : Ubicación de los partidores FOR2 y REW del método 2 de determinación de BLAD.

Color rojo : Ubicación del partidor REW descrito por Shuster et al. (1992).

Color gris : Sitio en que se produce la mutación de A → G (D128G).

7.9 Anexo 9. Segmento de la secuencia del cDNA del gen CD18 bovino y ubicación de los partidores para determinar BLAD a través de método 1 y método 2.

(Genbank M81233)



: Segmento de la secuencia del cDNA del gen CD18 bovino.