

III.4. Genotipado del gen *heart fatty acid-binding protein (H-FABP)*.

De acuerdo a los estudios previos realizados por Gerbens y col. (1997), se procedió a amplificar dos regiones del gen *heart fatty acid-binding protein*.

La primera de acuerdo al acceso X98558 de *GenBank*, amplificando mediante PCR la región 5'UTR y efectuando digestiones del producto amplificado con la enzima *Hinf I* para todos los animales de ambas poblaciones Pietrain y LargeWhite, y la segunda amplificando el exón 2.

Los oligonucleótidos 5' y 3' utilizados para ambos fragmentos fueron los siguientes: para la región 5'UTR

5'-GGACCCAAGATGCCTACGCCG

3'-CTGCATCTTTGACCAAGAGG

y para la región del intron 2:

5'-ATTGCTTCGGTGTGTTTGAG

3'-TCAGGAATGGGAGTTATTGG

La amplificación se realizó utilizando las siguientes condiciones: buffer 1 X, cloruro de magnesio al 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos 0.2 µM, 0.25 U de polimerasa de Ecogen y 100 ng de ADN, en un volumen de reacción de 50 µl.

Los ciclos de temperaturas del termociclador fueron las siguientes: Después de dos minutos de desnaturalización a 95°, fue seguido de 30 ciclos a 94°C durante un minuto, 57°C un minuto, 72°C dos minutos y finalmente una extensión a 72°C durante 10 minutos.

El producto amplificado fue digerido con la enzima *Hinf I* (Roche), que reconoce la secuencia nucleotídica G↓ANTC, utilizando para la digestión 8.5 µl de producto de PCR, 1 µl de tampón H más 5 U de la enzima, incubándolo a 37 °C durante 12 horas.

El producto amplificado posee un tamaño de 700 pb y posee varias dianas blanco para la enzima *Hinf I*, en la figura 3.7 se puede observar el patrón de un animal heterocigoto.

El ADN de los animales homocigotos para el alelo **H** carente del sitio polimórfico da como resultado a la digestión los siguientes fragmentos en pb: 339, 231, 105 y 25.

En el caso de los porcinos homocigotos para el alelo **h** los fragmentos en pb son: 339, 172, 105, 59 y 25 (Fig 3.8).

Figura 3.7. Patrón heterocigoto para el fragmento 5'UTR del gen *H-FABP* que amplifica 700 pb y posee tres dianas constantes de restricción *Hinf*-I, además de una posición polimórfica.

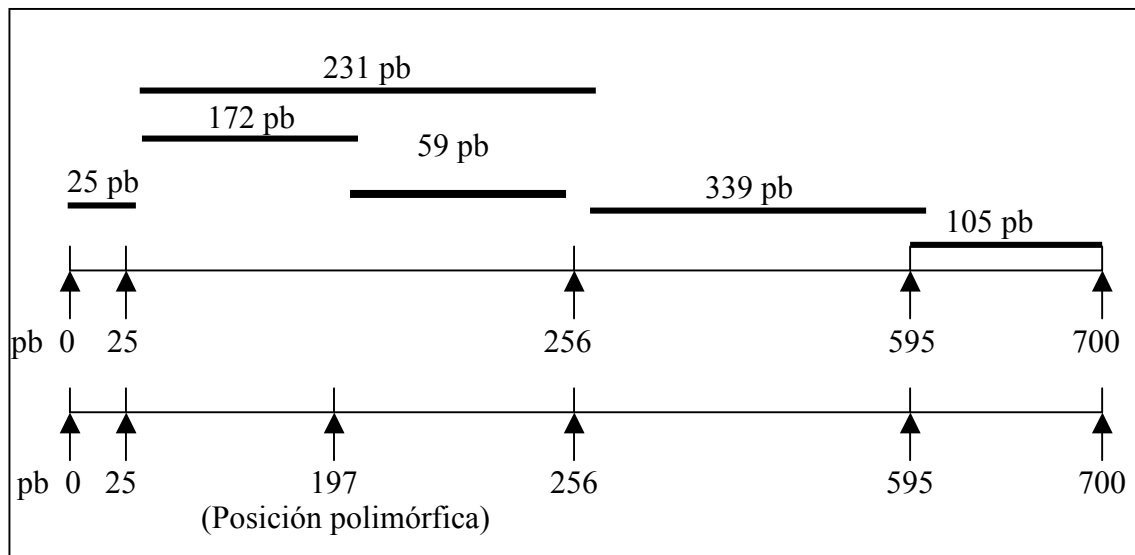
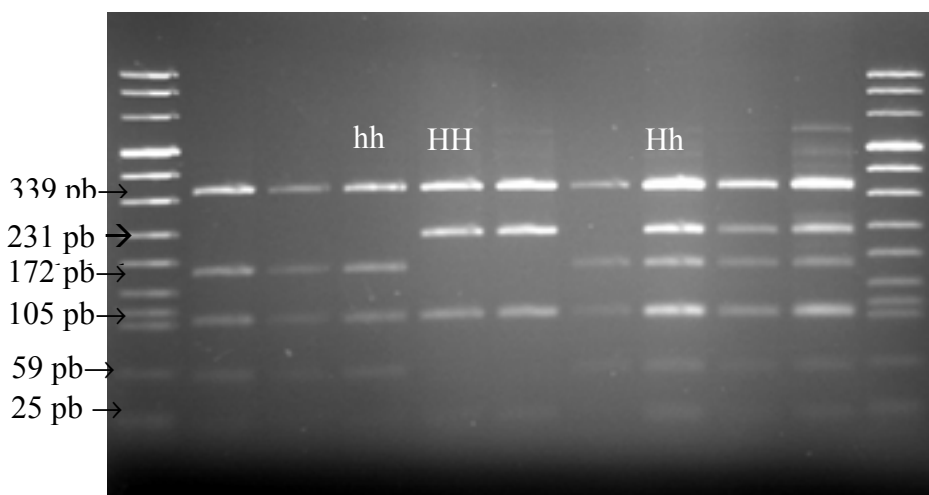


Figura 3.8 Gel de electroforesis del producto amplificado 5'UTR del gen *H-FABP* digerido con la enzima *Hinf*-I.



El segundo fragmento amplificado de acuerdo a Gerbens y col. (1997) acceso Y16180 perteneciente al intron 2, fue genotipada en los machos F_0 de las poblaciones Pietrain y LargeWhite, los resultados preliminares mostraron que en los machos LargeWhite solo

había un macho informativo con la enzima *Hinf*I, mientras que en la población Pietrain había cuatro machos informativos, por lo que se tomó la decisión de genotipar solo la población Pietrain.

Las condiciones de amplificación fueron similares a las descritas anteriormente para el fragmento 5'URT.

El fragmento del intron 2 fue digerido con la enzima *Hae* III (Roche) que reconoce la secuencia GG↓CC, para la digestión se utilizaron las mismas condiciones descritas para *Hinf* I. El fragmento amplificado del intron 2 tiene un tamaño de 816 pb y posee dos sitios diana de corte y un sitio polimórfico, en la figura 3.9 se puede observar las distintas dianas blanco reconocidas, y en compañía de un marcador de tamaños se pueden interpretar claramente el tamaño de los fragmentos (Fig. 3.10)

Figura 3.9. Patrón heterocigoto para la región amplificada del intron 2 del gen *HFABP* digerido con la enzima *Hae* III, donde el alelo **D** produce 3 fragmentos de 683, 117 y 16 pb. El alelo **d** produce 4 fragmentos de 405, 278, 117 y 16 pb.

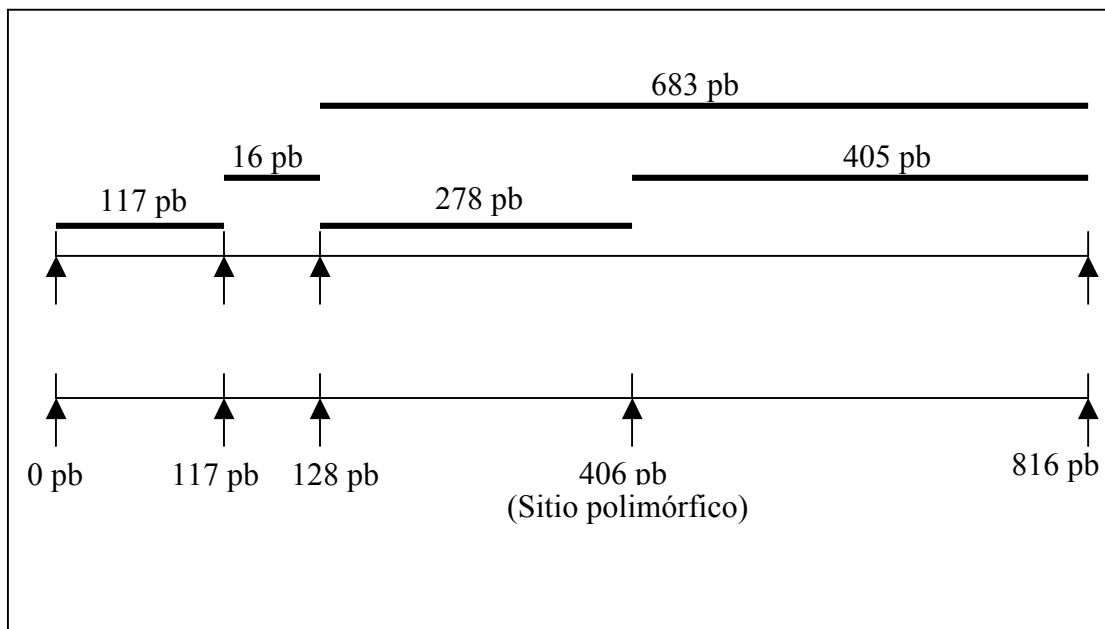
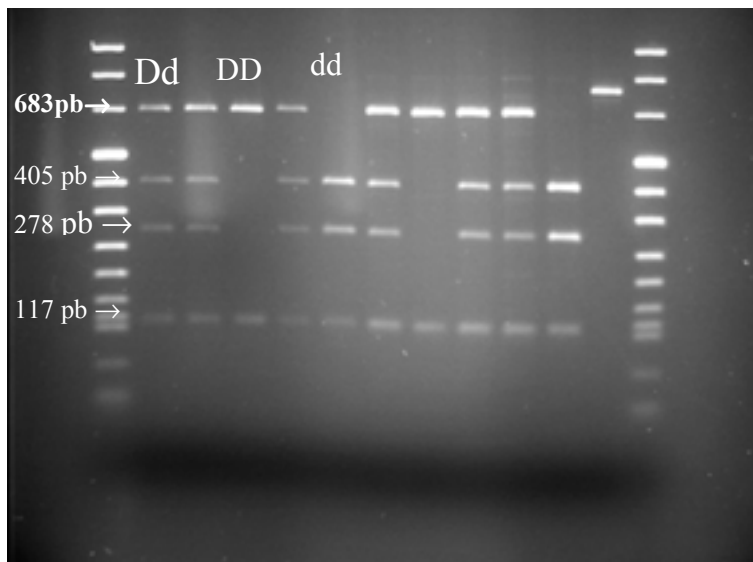


Figura 3.10. Gel de electroforesis del producto amplificado del intron 2 del gen *H-FABP* digerido con enzima *HaeIII*.



III.5. Genotipado del gen receptor de leptina.

De acuerdo a las investigaciones efectuadas con relación a la obesidad principalmente en humanos y ratones, el gen receptor de la leptina entre otros, es considerado como uno de los genes candidatos en los estudios de asociación de variantes génicas y contenido de grasa corporal.

En el presente estudio, los porcinos F_0 , así como la F_1 de las poblaciones Pietrain y LargeWhite, fueron genotipados para el gen receptor de la leptina ubicado en el mapa genético porcino en la posición 6q3.3-q6.5 (Ernst y col. 1996).

Utilizando las variantes génicas del gen descritas por Stratil y col. (1998), se amplificó la región del exón 4 al exón 5, utilizando las condiciones siguientes: buffer PCR x 1, cloruro de magnesio 1.5 mM., dNTPs 0.2 mM., 0.2 μ M de cada *primer* .025 U de Taq polimerasa, 100 ng de ADN, en un volumen final de 50 μ l.

Los ciclos de amplificación utilizados se iniciaron con una temperatura de 95 °C durante dos minutos para obtener una buena desnaturalización, seguidos de 32 ciclos con las siguientes temperaturas 94 °C durante un minuto, 55 °C durante un minuto, 72 °C durante 10 minutos, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Los productos amplificados tienen un tamaño de 2 kb y para analizar los diferentes polimorfismos se utilizaron las enzimas de restricción *Hpa* II (Roche) que reconoce la diana de restricción C↓CGG, y *Rsa* I (Roche) que reconoce la diana de restricción GT↓AC.

El fragmento amplificado de 2 kb tiene una sola diana de restricción con la enzima *Hpa* II localizado en el intrón 4 del gen, de forma que el alelo A sigue manteniendo el tamaño de 2 kb indicando que no posee la diana de restricción, en cambio el alelo B tiene una diana de restricción provocando dos fragmentos de 1450 y 550 pb (Fig 3.11).

Con el enzima de restricción *Rsa* I, en el caso del alelo A se producen cuatro fragmentos de 1 kb, 349, 334 y 300 pb, mientras que con el alelo B se producen fragmentos de 750, 349, 334, 300 y 250 pb (Fig.3.12).

En el presente estudio inicialmente fueron genotipados los cinco machos progenitores de ambas poblaciones, Pietrain y LargeWhite para observar los genotipos producidos con ambas enzimas. Posterior a la amplificación de los productos mediante la PCR, se procedió a la digestión utilizando 8.5 µl del producto amplificado en compañía de 1 µl de buffer L y 5 U de la enzima en cada caso.

Como los polimorfismos obtenidos en el caso de la enzima *Rsa* I mostraron que solo uno de los machos Pietrain era poseedor del alelo AB y los demás machos progenitores de ambas poblaciones poseían el alelo AA, se procedió a descartar este genotipado.

Con la enzima *Hpa* II los resultados de los alelos fueron diferentes, mostrando la población Pietrain el alelo AB en uno de sus machos y los otros cuatro el alelo BB, mientras que de los cinco machos de la población LargeWhite tres mostraban el alelo BB, uno el AA y el otro el AB.

Figura 3.11 Alelos A (2 kb), y B (1450 + 550 pb) producidos en el gen receptor de la leptina por la enzima *Hpa* II que reconoce la diana C↓CGG.

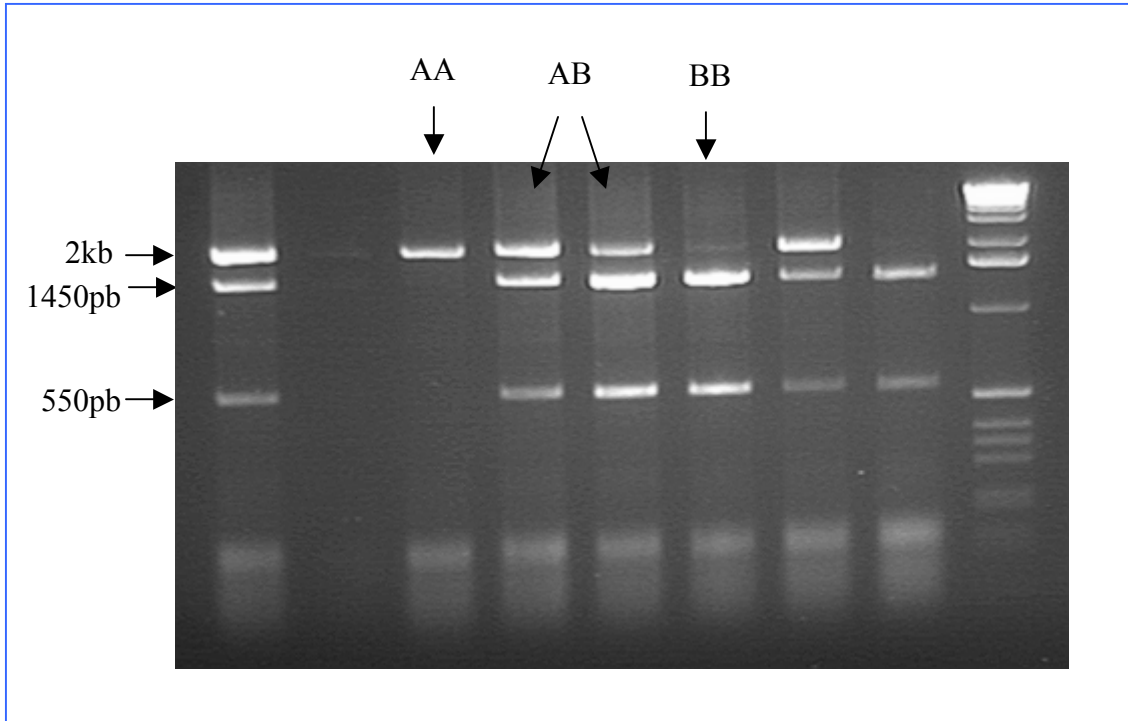
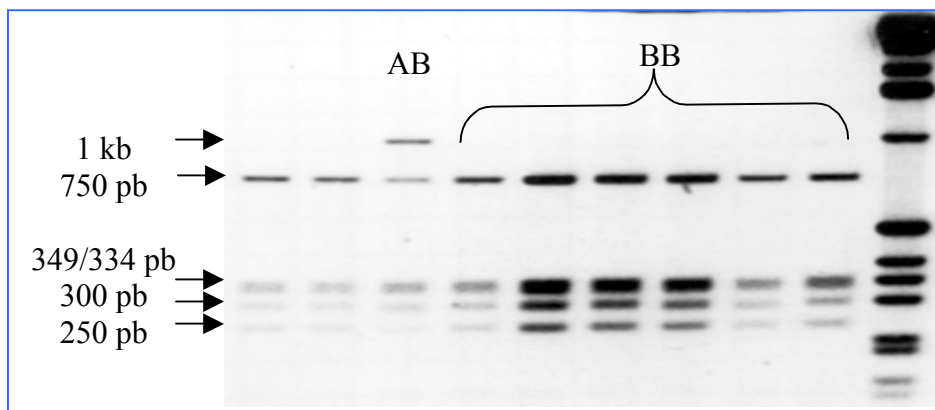


Figura 3.12 Productos del gen receptor de leptina digeridos con la enzima *Rsa* I, alelo A (1 kb + 349 + 334 + 300 pb), alelo B (750 + 349 + 334 + 300 + 250 pb).



III.6. Métodos estadísticos.

1.- Factor de Bayes para la detección de QTL.

En primer lugar se realizó un estudio de detección de *Quantitative Trait Loci* (QTL) mediante la técnica de Factor de Bayes (Varona y col., 2001). Para cada carácter y segmento cromosómico considerado, se compararon los siguientes modelos:

Modelo 1.

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{q} + \mathbf{e} \quad \{1\}$$

Donde, \mathbf{y} es el vector de datos para el carácter, $\boldsymbol{\beta}$ es el vector de efectos sistemáticos incluidos en el modelo (Genotipo de *RYR1* - 2 niveles-, Sexo -2 niveles- y Familia, \mathbf{q} es el vector de efectos asociados al segmento cromosómico de interés, \mathbf{X} y \mathbf{Z} son las matrices de incidencia que relacionan $\boldsymbol{\beta}$ y \mathbf{q} con el vector de datos \mathbf{y} . Por último \mathbf{e} es el vector de residuos. Se asume que \mathbf{q} y \mathbf{e} están distribuidos mediante las siguientes distribuciones normales multivariantes:

$$\mathbf{q} \sim N(0, \mathbf{Q}\sigma_q^2) \quad \{2\}$$

$$\mathbf{e} \sim N(0, \mathbf{I}\sigma_e^2) \quad \{3\}$$

Donde σ_q^2 es la varianza explicada por el QTL y σ_e^2 es la varianza residual, \mathbf{I} es la matriz de identidad y \mathbf{Q} es la matriz de relaciones entre los efectos de los QTL calculadas mediante el algoritmo descrito por Pérez Enciso y col., (2000).

Este modelo puede ser reparametrizado como:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{e}^* \quad \{4\}$$

donde:

$$\mathbf{e}^* = \mathbf{Z}\mathbf{q} + \mathbf{e} \quad \{5\}$$

En consecuencia,

$$\mathbf{e}^* \sim N(0, \mathbf{V}) \quad \{6\}$$

$$\mathbf{V} = \mathbf{ZQZ}'\sigma_q^2 + \mathbf{I}\sigma_e^2 = \sigma_p^2 \left[\mathbf{ZQZ}'h_q^2 + \mathbf{I}(1-h_q^2) \right] \quad \{7\}$$

Donde $h_q^2 = \sigma_q^2 / \sigma_p^2$ es la proporción de varianza explicado por el QTL y σ_p^2 es la varianza fenotípica.

Por lo tanto, la distribución conjunta de todas las variables del modelo 1 es:

$$p_1(\mathbf{y}, \boldsymbol{\beta}, \sigma_p^2, h_q^2) = p_1(\mathbf{y}|\boldsymbol{\beta}, \sigma_p^2, h_q^2) p_1(\boldsymbol{\beta}) p_1(\sigma_p^2) p_1(h_q^2) \quad \{8\}$$

donde:

$$p_1(\mathbf{y}|\boldsymbol{\beta}, \sigma_p^2, h_q^2) \sim N(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta}, \mathbf{V}) \quad \{9\}$$

$$p_1(\boldsymbol{\beta}) = k_1 \quad \{10\}$$

$$p_1(h_q^2) = 1 \quad \text{si } h_q^2 \in [0,1] \quad \{11\}$$

$$p_1(\sigma_p^2) = k_2 \quad \text{si } \sigma_p^2 \in \left[0, \frac{1}{k_2} \right] \quad \{12\}$$

Donde k_1 y k_2 son dos valores suficientemente pequeños para asegurar una distribución plana en todos los valores posibles del espacio paramétrico. Las distribuciones a priori de la heredabilidad y de la varianza fenotípica se consideran independientes entre sí.

El segundo modelo es el modelo sin efecto asociado al QTL (Modelo 2):

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{e} \quad \{13\}$$

donde:

$$\mathbf{e} \sim N(0, \mathbf{I}\sigma_p^2) \quad \{14\}$$

Entonces, la distribución conjunta de los datos y parámetros es:

$$p_2(\mathbf{y}, \boldsymbol{\beta}, \sigma_p^2) = p_2(\mathbf{y}|\boldsymbol{\beta}, \sigma_p^2) p_2(\boldsymbol{\beta}) p_2(\sigma_p^2) \quad \{15\}$$

Donde las distribuciones a priori $p_2(\boldsymbol{\beta})$ and $p_2(\sigma_p^2)$ son idénticas a las ecuaciones {10}

y {12} respectivamente, y:

$$p_2(\mathbf{y}|\boldsymbol{\beta}, \sigma_p^2) \sim N(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta}, \mathbf{I}\sigma_p^2) \quad \{16\}$$

Siguiendo el procedimiento descrito por Varona y col. (2001), el Factor de Bayes se puede calcular de manera simple mediante la siguiente ecuación:

$$BF_{12} = \frac{p_1(h_q^2 = 0)}{p_1(h_q^2 = 0|\mathbf{y})} = \frac{1}{p_1(h_q^2 = 0|\mathbf{y})} \quad \{17\}$$

Por lo tanto, un BF_{12} mayor que 1 indica una mayor probabilidad del modelo con QTL, y un BF_{12} inferior a 1 indica una mayor probabilidad del modelo sin QTL.

Debe notarse que la probabilidad del modelo con QTL se puede calcular a partir de BF_{12} mediante la formula:

$$P(M_1|\mathbf{y}) = \frac{BF_{12}}{1 + BF_{12}} \quad \{18\}$$

El cálculo se realizó mediante un algoritmo de Markov Chain Monte Carlo, en concreto, se utilizó un algoritmo de Muestreo de Gibbs. Para el cálculo de densidades se utilizaron 12500 iteraciones, después de descartar las 2500 iteraciones iniciales.

2.- Estudio de asociación de polimorfismos en genes candidato.

El estudio de asociación de polimorfismos en genes candidatos se realizo mediante un test de t de comparación de efectos asociados a cada genotipo de los genes candidatos.

El modelo descriptivo de los datos fue:

$$y_{ijklm} = \mu + S_i + H_j + F_k + G_l + e_{ijklm} \quad \{19\}$$

Donde y_{ijklm} es el dato observado, S_i es el nivel i del efecto sexo (2 niveles), H_j es el nivel j del efecto asociado al gen *RYS1* (2 niveles), F_k es el efecto asociado al nivel k de la familia, G_l es el efecto asociado al genotipo l del gen candidato considerado (3 niveles, AA, AB, BB) y e_{ijklm} es el residuo.

Se realizaron 3 tres test de t para cada gen candidato, G_{AA} vs. G_{AB} , G_{AA} vs. G_{BB} y G_{AB} vs. G_{BB} .

III.7. Caracterización de genes candidato.

III.7.1. Extracción y purificación de RNA.

III.7.1.1. Consideraciones generales para una buena extracción de RNA.

Para obtener una buena preparación de RNA eucariota, es necesario minimizar la actividad de las ribonucleasas (RNAsas) liberadas durante la lisis celular, mediante el uso de inhibidores de RNAsas o métodos que rompan células e inactiven RNAsas simultáneamente.

Es necesario ser muy cuidadoso al efectuar las extracciones de RNA ya que estas pueden ser contaminadas con RNAsas del propio material utilizado durante el proceso de extracción, en caso de que se encuentre contaminado.

Durante todo el procedimiento de extracción y manipulación de utensilios es necesario el uso de guantes de látex estériles ya que las manos y la piel a menudo contienen bacterias y son una fuente de contaminación de RNAsas.

Todo el material utilizado durante el procedimiento de extracción debe estar libre de RNAsas.

Existen algunos procedimientos que pueden ser utilizados para lograr esta finalidad, por ejemplo el material de vidrio puede ser sometido a temperaturas de 180°C durante 8 horas o más, los objetos de plástico pueden ser lavados con una solución de cloroformo. Otra alternativa es colocar en diethyl pyrocarbonate al 0.1% (DEPC) 2 horas a 37°C los vasos, tubos y otros artículos que van a ser utilizados para la extracción de RNA, ya que este reactivo es considerado un fuerte, pero no absoluto, inhibidor de RNAsas (Sambrook y col., 1989).

Posteriormente los utensilios deben ser lavados varias veces con agua estéril y después colocados a una temperatura de 100°C por 5 minutos (Sambrook y col., 1989) o esterilizados mediante autoclave por 15 minutos a 15 lb/sq. en ciclo líquido. Estos tratamientos remueven las trazas de DEPC que pueden por otro lado modificar los residuos de purina en RNA por carboximetilación.

La utilización de tubos desechables de polipropileno estériles es lo más recomendado cuando se trabaja con volúmenes inferiores a 2 ml.

III.7.1.2. Colección de biopsias para extracción de RNA.

La colección de biopsias fue obtenida directamente durante el sacrificio en un matadero comercial localizado en Lleida, se colectaron muestras de corazón, hígado, bazo, estómago, útero en el caso de las hembras y testículos en el caso de los machos, además de músculo *longissimus dorsi* y *semimembranoso*. Las muestras fueron recogidas extremando las precauciones para evitar posibles contaminaciones. El transporte de las muestras se efectuó dentro de criotubos estériles los cuales fueron de inmediato colocados en nitrógeno líquido para su transporte y posteriormente fueron almacenadas a -80°C .

III.7.1.3. Procedimiento para la extracción de RNA.

En el caso del presente estudio se procedió a extraer el RNA a partir de biopsias de hígado. La muestra de hígado congelada (1 cm^2) fue macerada en un mortero de porcelana en compañía de nitrógeno líquido, después de macerada fue colocada en otro criotubo estéril y se permitió que el nitrógeno líquido se evaporara.

Evaporado el nitrógeno se le añadió 1 ml de TRIzol LS (GIBCO Cat. No. 10296-010). Posteriormente fue homogenizada con un homogenizador pro 200 N° de serie 02109 de *Pro Scientific Inc.*

Homogenizada la muestra fue colocada en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml y se le agregó 200 μl de cloroformo, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugarse a una temperatura de 4°C durante 15 minutos a 12000 g.

En este proceso el cloroformo precipita las proteínas y el resultado en compañía del TRIzol es que se forman tres fases, la fase inferior o fase orgánica, la fase intermedia o ADN y la fase acuosa superior donde se encuentra el RNA.

La fase acuosa superior es recuperada y el RNA es precipitado en presencia de etanol, para luego ser reconstituido en agua con DEPC al 0.1%.

III.7.1.4. Cuantificación de RNA.

Para la cuantificación del RNA fue utilizado un espectrofotómetro UV 110 No. De serie 3105 de *Biotech photometer*, valorando en un ratio de 260 y 280 nm y se obtuvieron concentraciones entre 6 a 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

III.7.2. Procedimiento para la búsqueda de genes candidato.

Al obtener los resultados preliminares estadísticos de asociación de los marcadores moleculares microsatélites analizados, se pudo observar que en el cromosoma 2 de la población LargeWhite presentaba niveles altos de significación para los marcadores microsatélites SW2443 y SW2623 ubicados a 0 y 9.8 cM respectivamente, del mapa genético porcino (http://sol.marc.usda.gov/cgi-bin/species_chromosome?swine+02).

Esta significación se encontraba ligada a los caracteres de medida de grasa de la canal con Fat-O-Meater, en el caso del marcador microsatélite SW2623, y para grosor de la grasa medida con regleta entre la tercera y cuarta costilla con el marcador molecular microsatélite SW2443.

Posteriormente se procedió a revisar los mapas genéticos comparativos humano vs cerdo (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/maps.cgi?org=hum&chr=11>) y se observó que existía homología entre los brazos p del cromosoma 2 porcino y el brazo p y la región proximal al centrómero del brazo q del cromosoma 11 humano.

Al revisar el listado de los genes localizados en humano en esa región se detectó que en la posición 11q 13.4-q13.5 estaba ubicado el gen de la piruvato carboxilasa.

III.7.3. Gen de la piruvato carboxilasa.

III.7.3.1. Diseño de cebadores para amplificar el gen de la piruvato carboxilasa.

Una vez localizado el gen de la piruvato carboxilasa (GenBank acceso NM_000920), se procedió a efectuar un alineamiento a través del programa multialin utilizando para ello las regiones codificantes (<http://www.toulouse.inra.fr/multialin/multialin.html>) con el gen del ratón acceso U032314 y de la rata acceso AY034048.

Observándose que existe un grado de conservación muy elevado entre los mismos se procedió a diseñar tres pares de cebadores (*forward* y *reverse*) para amplificar el gen en cDNA de cerdo.

Para el diseño de los *primers* se utilizó el programa de ordenador *primer 3* (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) y las secuencias obtenidas de los *primers* fueron las siguientes:

PC-F1 5'-GATGCTGAAGTTCCGAACAGT -3'
PC-R1 5'-TGGGCCCGGTTCTGTGCAGGCCCT -3'
PC-F2 5'-CATTGCCACGGCAAAGA-3'
PC-R2 5'-TCCGAGTTGCCAGACTTCAT-3'
PC-F3 5'-GGCCTGTACCAGAGGGAC-3'
PC-R3 5'-CTTATTTGGCAAGAGATGAA-3'

Posterior al diseño de los cebadores se procedió a realizar un BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para comprobar que los cebadores diseñados no presenten *annealing* en alguna otra secuencia del cerdo depositada en los bancos de datos genéticos.

Una vez obtenidos los cebadores se procedieron a estandarizar las condiciones de amplificación a partir del cDNA extraído de biopsias de hígado de cerdo. La decisión de utilizar cDNA fue tomada debido a que de esta manera solo trabajaríamos con regiones codificantes y los tamaños a amplificar serían considerablemente menores.

III.7.3.2. Condiciones de amplificación por PCR del gen de la piruvato carboxilasa.

Para valorar la amplificación del gen de la piruvato carboxilasa fue utilizado cDNA de la raza Pietrain utilizando las siguientes condiciones: Buffer 1 X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 0.2 mM, *primers* 5'y 3' 0.2 mM respectivamente, 1.25 U de polimerasa (Eco Taq), 10 ng cDNA, en un volumen total de 50 µl.

Para determinar la *T_m* de cada juego de cebadores se amplificaron en un termociclador de gradientes marca MJ Research modelo PTC-200 cubriendo los rangos de temperatura de *annealing* de 52 a 72 °C con un total de 35 ciclos.

III.7.3.3. Valoración del producto amplificado por PCR del gen de la piruvato carboxilasa.

La valoración de los resultados de los productos de amplificación fue efectuada mediante una electroforesis en un gel de agarosa de alta resolución a 1.5 % utilizando un marcador de tamaños X de Roche.

La ventaja de utilizar un gel de agarosa de alta resolución al 1.5 % es que proporciona una visión más detallada de las posibles amplificaciones inespecíficas, decidiendo así el método de purificación del producto amplificado, el cual puede efectuarse directamente del producto amplificado de PCR o efectuando una electroforesis del producto completo de la PCR y recortando la banda del tamaño esperado del gel para posteriormente purificarlo.

La lectura de los resultados fue efectuada utilizando un transiluminador que cuenta con una cámara conectada a un ordenador el cual tiene instalado un *software* (BioCap) para hacer posible la visualización de la imagen del gel.

Los resultados de las amplificaciones del gen de la piruvato carboxilasa porcina fueron los siguientes: Para la región comprendida entre el nucleótido 36 y 1538, amplificó un fragmento de 1500 pb aproximadamente a una temperatura de *annealing* de 52°C.

Para la región comprendida entre el nucleótido 1487 y 2780 la amplificación fue de un fragmento de 1293 pb como se esperaba, a una temperatura de *annealing* de 61 °C.

Para el tercer fragmento comprendido entre el nucleótido 2643 y 3962 la amplificación fue de 1320 pb a una temperatura de *annealing* de 57 °C, coincidiendo también con el tamaño esperado.

III.7.3.4. Purificación del producto de PCR del gen de la piruvato carboxilasa.

El principio de purificación de los productos de PCR consiste en eliminar los compuestos que no fueron utilizados durante la reacción. Una vez efectuada la electroforesis del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5 % se procedió a recortar la banda del gel. Para observar las bandas, se utilizó un transiluminador marca VILBER LOURMAT.

Para la purificación de las bandas de gel se utilizó el kit de QIAquick de QIAGEN cat. No. 28706 debido a que en las lecturas de los resultados de las amplificaciones se podía observar una muy débil segunda banda. El principio del kit QIAquick consiste en degradar el gel de agarosa que contiene el producto amplificado y pasarlo a través de una columna que contiene una membrana de gel-silica la cual en compañía de tampones pH dependientes y altas concentraciones de sales, fija el ADN a la membrana de silica, permitiendo el lavado eficiente de las impurezas.

III.7.3.5. Valoración del producto de PCR purificado.

Para valorar la cantidad de DNA obtenida con el kit de QIAquick de QIAGEN se procedió a preparar un marcador de tamaños ϕ X *Hae* III a una concentración de 16 ng μ l cargando 10 μ l en el gel (160 ng).

Considerando que el total de pares de bases contenidas en la suma de los fragmentos del marcador es de 5386 pb, se puede extrapolar directamente la cantidad aproximada de ng equivalentes al grosor de cada banda.

III.7.3.6. Condiciones de PCR para secuenciación.

La secuenciación de los tres fragmentos amplificados del gen de la piruvato carboxilasa se realizó utilizando el DNA *Sequencing kit part.* No. 4314417 de *Biosystems Inc.*

Durante la amplificación el *kit* posee dNTPs más ddNTPs marcados fluorescentemente incorporándose ambos durante la extensión, solo que en el caso de incorporación de un dideoxynucleotido fluorescente este ya no permite la incorporación de otro nucleótido.

Para la amplificación de los fragmentos fueron utilizados los cebadores originales responsables de la amplificación de cada fragmento, y cebadores adicionales obtenidos de las primeras secuencias del cerdo. En este tipo de reacción se utiliza ya sea el cebador 5' o 3' en forma independiente en cada amplificación a una concentración de 3.2 μ M. Los *primers* utilizados fueron los siguientes:

5'-GATGCTGAAGTTCCGAACAGT -3'
5'-CCATGAGTTCTCCAACACCT -3'
5'-GGTGTCTGCTCTGAGTAGA-3'
5'-GCCACCATGACCTTCTTGAT-3'
5'-TGGGCCCCGGTTCTGTGCAGGCCCT -3'
5'-CATTGCCACGGCAAAGA-3'
5'-ACCTCAAAAAGATCTCCCC-3'
5'-CGACTCCATGTCTGGAATGA -3'
5'-TCCGAGTTGCCAGACTTCAT-3'
5'-GGCCTGTACCAGAGGGAC-3'
5'-CTAAAGGACCTGCCAAGGG -3'
5'-GAGATTGAATGACCTTGCCC -3'
5'-CCATCCTGGTCAAGGACACT -3'
5'-CTTATTTGGCAAGAGATGAA-3'

Durante la precipitación del producto de secuenciación se utilizó un marcador visible azul no fluorescente de ácidos nucleicos (*Pellet Paint®TM Co-Precipitant* de Novagen Cat. No.: 70748-3), que permite visualizar el *pellet* y no interfiere a la detección de la fluorescencia.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 94°C/3', 96°C/10'', 50°C/5'', 60°C/4', 4°C/ α , con un total de 25 ciclos.

III.7.3.7. Secuenciación del gen de la piruvato carboxilasa.

La secuenciación de los productos amplificados del gen de la piruvato carboxilasa, se efectuó en un secuenciador automático de electroforesis capilar y detección fluorescente ABI PRISM 310 *Genetic Analyser* de *Applied Biosystems*.

III.8. Panel de células somáticas híbridas irradiadas *IMpRH*.

El panel de células somáticas clones híbridos irradiados (*RH*) es producido después de irradiar las células de una especie de interés y fusionarla a una célula de especies recipientes generalmente roedores.

Siguiendo la producción de paneles híbridos irradiados del genoma humano, paneles *RH* han sido desarrollados para varias especies de mamíferos como rata, ratón, porcino, bovino y perro <http://linkage.rockefeller.edu/tara/rhmap>.

Las células somáticas híbridas irradiadas contienen fragmentos cortos de ADN de la especie donadora, permitiendo ordenar los marcadores con una resolución de 10 a 50 veces mayor que el mapa genético.

El servidor del *Intra Minnesota Porcine Radiation Hybrid (IMpRH)* proporciona dos herramientas, las herramientas para mapa *IMpRH* y una base de datos de resultados oficiales sometidos. Las herramientas de mapa permiten el mapeo de un nuevo marcador relacionado a los marcadores previamente posicionados en el mapa a través del panel *IMpRH*. La base de datos *IMpRH* es la base de datos oficial para someter un nuevo resultado y comentarios. La base de datos permite el compartir datos privados y semiprivados <http://imprh.toulouse.inra.fr>. para el genoma porcino, el INRA-Minnesota ha desarrollado el panel porcino híbrido irradiado (*IMpRH*) (Yerle y col., 1998) y caracterizado (Hawken y col., 1999) en colaboración entre INRA y la Universidad de Minnesota. El panel esta constituido por 118 clones y un control de ADN de hamster.

III.8.1. Diseño de cebadores para posicionar el gen de la piruvato carboxilasa en el genoma porcino.

El diseño de los cebadores 5' y 3' fue obtenido a partir de una alineación efectuada con las secuencias de humano, ratón, rata y porcino.

Tomando como guía para ubicar una posición nucleotídica fue utilizada la secuencia humana (NM_000920), y el procedimiento consistió en detectar cambios de dos o más nucleótidos entre las secuencias del cerdo, rata y ratón. Los resultados del alinamiento mostraron dos cambios nucleotídicos (C/T) en las posiciones 1774 y 1776, las cuales fueron posicionadas en la región 3' para el diseño del cebador *forward* (5'-GGCCAGCCCCAGCCCCAC-3'). Otro cambio de dos nucleótidos fue detectado en la posición 1943 (C/A) y 1945 (T/A) que fue utilizado para el diseño del cebador *reverse* (5'-GTCGTGGGTTCGCACACG-3').

III.8.2. Amplificación del gen de la piruvato carboxilasa en el panel de células somáticas híbridas irradiadas.

Previamente a la utilización de los cebadores diseñados para amplificar el gen de la piruvato carboxilasa en el panel de células somáticas híbridas irradiadas, se procedió a estandarizar las condiciones de amplificación en ADN genómico porcino Vs hamster.

Las condiciones obtenidas fueron las siguientes, buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, cebador 5' y 3' 0.2 μM respectivamente, .025 U de Ecotaq polimerasa en un volumen total de 50 μl. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 30 ciclos de 94°C 1 minuto, 70 °C 1 minuto y 72 °C 2 minutos, con una extensión final a 72 °C de 10 minutos.

Considerando que este gen está muy conservado entre especies, y que de acuerdo a la secuencia humana, los cebadores utilizados amplifican 47 pb del exón 11, más 84 pb del intrón 11 y 155 pb en el exón 12 (Carbone y col. 1998), el tamaño esperado de amplificación es de 286 pb. (Fig. 3.13)

Como las secuencias de los cebadores diseñados solo diferían en dos nucleótidos en la región 3' del hamster, existieron amplificaciones inespecíficas que fueron fácilmente diferenciadas por su tamaño de amplificación como se muestra en la figura 3.14.

Figura 3.13 Regiones amplificadas del gen de la piruvato carboxilasa por los *primers* diseñados para el panel de células somáticas Híbridas irradiadas.

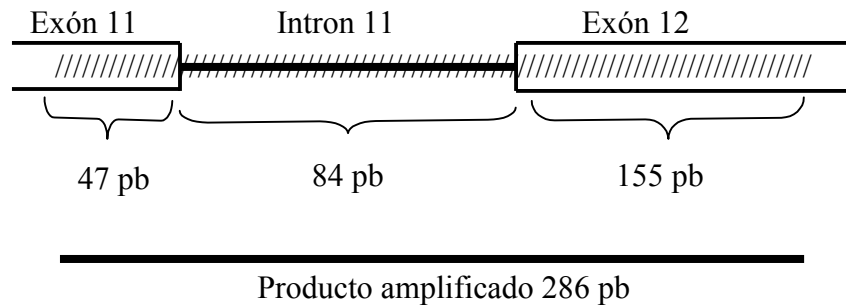
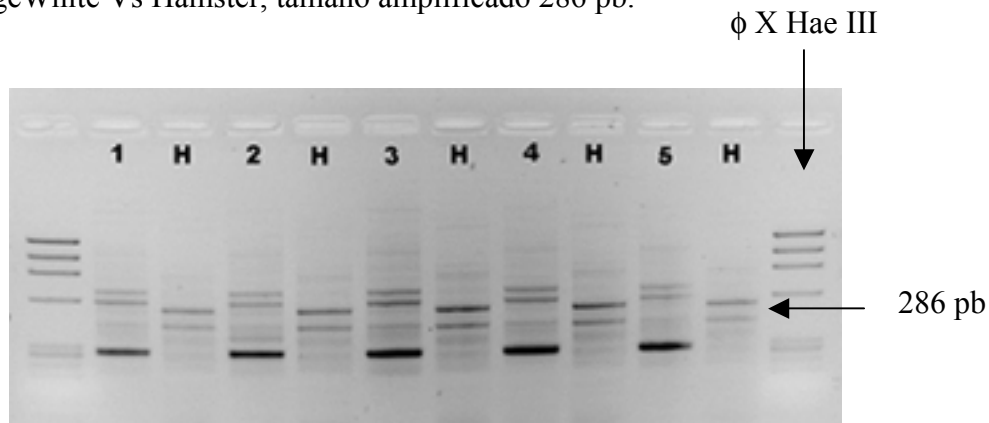


Figura 3.14 Amplificaciones del gen de la piruvato carboxilasa de los 5 machos LargeWhite Vs Hamster, tamaño amplificado 286 pb.



Posteriormente a la amplificación del gen de la piruvato carboxilasa en porcino, se procedió a secuenciar la región codificante en 6 animales de las razas Pietrain, Large White e Ibérico. La raza Ibérica fue incluida en este estudio, debido a que sus características fenotípicas de engrasamiento difieren de las otras dos razas analizadas, aumentando la posibilidad de detección de SNPs. Una vez obtenidas las secuencias en las 6 muestras, se realizó un alineamiento mediante el programa multialin (<http://www.toulouse.inra.fr/multialin/multialin.html>) y la búsqueda de mutaciones. Una vez localizado el sitio polimórfico, se procedió a diseñar un *primer* específico para su diagnóstico mediante la técnica de *primer extensión analysis*, además se diseñó un juego de *primers* para mapear el gen mediante un panel de células somáticas híbridas irradiadas.