

Mapeo del gen *MCI-R* responsable del color del vellón, y del gen *LYZ*, que codifica la proteína lysozima estomacal, en ovinos mediante la técnica Prins

Ponz, R.¹; Arruga, M. V.¹

RESUMEN

Con objeto de lograr el mapeo del gen *MCI-R*, responsable del color negro del vellón de ciertas razas ovinas, se ha utilizado una nueva metodología de hibridación *in situ* denominada PRINS (PRImed IN-Situ Labeling, marcaje *in situ* usando cebadores). Esta técnica permite asignar y localizar genes sobre extensiones de cromosomas metafásicos mediante la utilización de nucleótidos marcados con un fluorocromo. El gen *MCI-R* no estaba mapeado sobre el genoma ovino y dado su interés en producción animal, su localización proporciona una importante información para poderlo relacionar con otros genes ligados al mismo cromosoma.

Para asegurar que la realización de la técnica era correcta, se mapeó el gen *LYZ*, que codifica la proteína lysozima estomacal ovina y que está asignado en el cr. 3.

En el presente trabajo se pone de manifiesto la rapidez de esta metodología comparativamente con otras basadas en la hibridación *in situ*.

Palabras clave: Mapeo génico, color del vellón, *MCI-R*, fluorescencia, PRINS.

SUMMARY

In order to map the gene *MCI-R*, responsible of the black coat color in certain ovine breeds, we have used the new PRINS (PRImed IN-Situ Labeling) methodology. This technique allows to assign and locate loci of genes on metaphasic chromosomes by means of the use of nucleotides marked with fluorochromes. The gen *MCI-R* was not known in which chromosome was located; until now. For its animal production importance its location gives an important knowledge in order to study its relation with other genes linked at the same chromosome.

In order to ensure the precision of this methodology, we mapped the *LYZ* gene, responsible of stomachal lysozyme, that is located in cr. 3 in sheep.

In the present paper, the rapid results obtained by this methodology, in comparison with other ones based in the *in situ* hybridization, is shown.

Keywords: Gene mapping, coat colour, *MCI-R*, fluorescence, PRINS.

INTRODUCCIÓN

La técnica de PRINS (Primed IN-Situ Labeling) fue descrita originalmente por Koch *et al.* (1989). Este método implica el uso de un oligonucleótido específico de secuencia, no marcado, que se hibrida con el DNA en el sitio correspondiente, sirviendo de cebador. Posteriormente, se realiza una reacción de PCR-*in situ* con nucleótidos marcados. Esto permite identificar directamente el sitio de hibridación. Este método reduce el tiempo necesario para detectar hibridaciones en comparación con otras técnicas disponibles (FISH), Llambí *et al.* (2001); Vela-galeti *et al.* (1999) y Wachtel *et al.* (2002).

La localización citogenética de genes es una de las aplicaciones de esta técnica, ya que permite visualizar directamente la señal específica amplificada sobre el cromosoma en el que se encuentra.

Continuando con los trabajos del equipo sobre la pigmentación de la lana (Vage *et al.*, 2003) se mapeó el gen que codifica el receptor de la Hormona Estimulante de los Melanocitos (*MCI-R*). Este gen regula el color negro de la capa en algunas razas ovinas (Spönnenberg *et al.*, 1996 and Viege *et al.*, 1999) y todavía no estaba asignado a ninguno de los 27 cromosomas ovinos.

Debido a que esta técnica se realizaba por primera vez, se mapeó el gen *LYZ*, ya localizado en la región telomérica del cr. 3 ovino, para comprobar que la técnica se realizaba correctamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo sangre con anticoagulante de dos machos de la raza ovina Rasa Aragonesa. Posteriormente se realizó un cultivo celular en medio RPMI siguiendo el

método descrito por Moorhead *et al.* 1960 con algunas modificaciones. Se realizó el protocolo de PRINS según lo descrito en Therkelsen *et al.* (1995), utilizando yoduro de propidio para teñir los cromosomas (color rojo) y digoxigenina como marcador de fluorescencia para diferenciar la secuencia buscada (color amarillo-verde).

La secuencia utilizada como cebador para mapear el gen *MCI-R* fue la misma que se utiliza para diferenciar los alelos de la mutación D121N de dicho gen (Viege *et al.*, 1999).

Para el gen *LYZ* se diseñaron unos cebadores, que amplificaban una región de 851 pares de bases, según la aplicación Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi). La secuencia del gen se obtuvo de la base de datos GenBank (nº acceso AF170556)

¹Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177 CP 50013. Zaragoza (España).

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal con láser y las imágenes capturadas mediante cámara digital y ordenador.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la hibridación correspondiente al gen *LYZ*, que se localiza en las regiones esperadas (regiones teloméricas del cr. 3), lo que viene a corroborar que la realización de la técnica fue correcta.

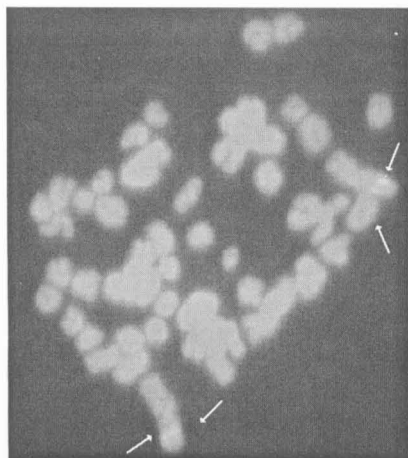


Figura 1. Localización del gen *LYZ* en la región telomérica del cr. 3

Como se puede ver en la figura 2, se observó un aumento de la fluorescencia correspondiente a la señal emitida por el gen *MCI-R* en las regiones homólogas cercanas al centrómero de un cromosoma telocéntrico de mediano tamaño. De manera provisional, del estudio de estas imágenes se puede inferir que el gen *MCI-R* puede localizarse en las proximidades del centrómero de los cromosomas 8 ó 9, ya que son los que presentan una morfología telocéntrica y son del tamaño apropiado.



Figura 2. Localización de la señal del gen *MCI-R* en un cromosoma telocéntrico de tamaño mediano.

CONCLUSIÓN

La prueba de hibridación *in situ* PRINS es una buena técnica para el mapeo directo de genes en especies de interés zootécnico, tanto por la capacidad de descubrir la localización exacta en el cromosoma como para descartar localizaciones erróneas. Asimismo, esta técnica puede ser muy útil para realizar la asignación cromosómica de QTL's, genes mayores o realizar Selección Asistida por Marcaadores (MAS).

Agradecimientos

Trabajo realizado con la financiación de la Diputación General de Aragón (Proyecto de Investigación P014/2000, y Beca predoctoral).

Agradecemos a Cristina García y M^a Jesús Gómez por su ayuda en la realización de los trabajos, y al Dr. Luis Monteagudo por sus consejos en el manejo del microscopio confocal. Asimismo agradecemos las facilidades prestadas por ANGRA (Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de la raza Rasa Aragonesa)

Referencias Bibliográficas

- Koch, J.; Kolvraa, S.; Petersen, K.B.; Gregersen, N.; Bolund, L. (1989). Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* 98: 259-265.
- Llambí, S.; Postiglioni, A.; Arruga, M. V. (2001). Instant PRINS as a rapid method for identification of the chromosome fragile sites in bovine. *Ann. Génét.* Vol. 44-Supl. 1: s45.
- Moorhead P. J.; Newell P. C.; Mellman W. J.; Battips D. A.; Hungerford, D. A. (1960). Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20: 613-616.
- Sponnenberg, D. P.; Dolling, C. H. S.; Lundie, R. S.; Rae, A. L.; Renieri, C.; Lauvergne, J. (1996). Mendelian Inheritance in Sheep (MIS 96). Editorial JJ, Dolling CHS and Renieri C. pp 13-57.
- Therkelsen, A. J.; Nielsen, A.; Koch, J.; Hindkjaer, J.; Klovraa, S. (1995). Staining of human telomeres with primed in situ labeling (PRINS). *Cytogenet Cell Genet* 68:115-118.
- Vage, D. I.; Fleet, M. R.; Ponz, R.; Olsen, R. T.; Monteagudo, L. V.; Tejedor, M. T.; Arruga, M. V.; Gagliardi, R.; Postiglioni, A.; Natrass, G. S.; Klungland, H. (2003). Mapping and Characterization of the Dominant Black Colour Locus in Sheep. *Pigment Cell Res.* 16:693-697.
- Velagaleti, G. N. V.; Tharapel, S.A.; Tharapel A.T. (1999). Validation of primed in situ labeling (prins) for interphase analysis: comparative studies with conventional fluorescence in situ hybridization and chromosome analyses. *Cancer Genet Cytogenet* 108:100-106.
- Viege, D. I.; Klungland, H.; Lu, D.; Cone, R. D. (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm Genome* 10, 39-43.
- Wachtel, S.S.; Tharapel A.T. (2002). Fish and PRINS: Competing or Complementary Technologies? *Am. J. Med. Genet.* 107:97-98

