

## IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE LOS LOCI H-FABP, MC4R Y LEPR EN GANADO PORCINO MEDIANTE PRIMER EXTENSION

Padilla, J. A.<sup>a</sup>, Portilla, J.<sup>a</sup>, Parejo, J. C.<sup>a</sup>, Corral, J.M.<sup>b</sup>, Mateos, S.<sup>a</sup>, Salazar, J.<sup>a</sup>, Izquierdo, M.<sup>b</sup>, Rabasco, A.<sup>a</sup>, Martínez-Trancón, M.<sup>a</sup>, Sansinforiano, M.E.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dpto Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Campus Universitario s/n. 10071. Cáceres. <sup>b</sup>Centro de Investigación La Orden-Valdesequera. Junta de Extremadura. Apdo. 22. 06080. Badajoz. [jpadilla@unex.es](mailto:jpadilla@unex.es).

### INTRODUCCIÓN

La industria porcina está adoptando nuevas estrategias para la selección de los animales con objeto de obtener productos de mayor calidad que satisfagan la demanda de los consumidores. Una de las aproximaciones para determinar las bases genéticas de los caracteres de producción y calidad es la detección de mutaciones en genes candidatos y su asociación con caracteres económicos. La identificación de los animales portadores de los mejores genotipos puede incrementar la precisión de la selección y, por tanto, la respuesta obtenida en los Programas de Mejora.

Se han identificado varios genes candidatos relacionados con la cantidad y calidad de carne de porcino. El gen H-FABP codifica una proteína relacionada con el transporte intracelular de ácidos grasos en el músculo esquelético y en la regulación del metabolismo lipídico. Gerbens *et al.* (1999) en Duroc, encontraron una asociación significativa entre tres loci polimórficos A, D y H y el contenido en grasa intramuscular, grasa dorsal y peso corporal. Las sustituciones nucleotídicas C1489T y C1811G de la secuencia del gen H-FABP (intrón 2) (Genbank Y16180) permiten diferenciar entre los alelos A/a y D/d, respectivamente. La sustitución T1324C de la región 5'UTR del gen H-FABP (Genbank X98558), permite diferenciar los alelos H/h.

El receptor 4 de la melanocortina (MC4R) es una de las moléculas relacionadas con la regulación del comportamiento alimentario y el peso corporal. El gen que codifica esta proteína se considera, por tanto, candidato para caracteres de engrasamiento y crecimiento. En este gen, Kim *et al.* (2000) detectaron una sustitución nucleotídica G/A no sinónima (Asp298Asn) (GAU → AAU) localizada en la posición 1426 de la secuencia génica (Genbank AB021664), que ha mostrado una asociación significativa con el espesor del tocino dorsal, el crecimiento y el consumo de alimentos.

Los genes de la leptina (LEP) y su receptor (LEPR) influyen en la regulación del peso corporal regulando el control de la ingesta y la actividad metabólica celular. Se han identificado dos lugares polimórficos en la secuencia del exón 4 del gen LEPR (Genbank AF092422): T221C y una sustitución dinucleotídica T232A y C233T. La sustitución T221C causa un cambio ATG → ACG, de Met → Thr en la secuencia del polipéptido codificado. La sustitución dinucleotídica: T232A y C233T puede crear cuatro codones: TCA (serina); ATA (isoleucina); TTA (leucina); ACA (Threonina). La sustitución T221C no es reconocible por ninguna de las enzimas de restricción disponibles. En la sustitución TC → AT solamente el primer nucleótido (T232A) es reconocible por restricción con Tsp509I (AATT). Esta mutación parece estar asociada con la topografía de la grasa (Mackowski *et al.*, 2005).

En este trabajo describimos un método fiable, basado en la técnica de minisequenciación o "Primer Extensión", para el genotipado simultáneo de los 7 SNPs, anteriormente indicados, que permite diferenciar los polimorfismos T221C y C233T del gen LEPR no reconocibles por restricción y evita los errores de genotipado debidos a digestión parcial de los productos de PCR o a la presencia de heteroduplex en los productos de PCR que les hacen refractarios a la restricción (Suda *et al.*, 2003).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para la verificación del método de identificación de los genotipos se han analizado un total de 295 animales de diversas razas porcinas y de su pariente silvestre el jabalí (Tabla 3). El ADN genómico de cada animal fue extraído utilizando el kit *Perfect gDNA Blood Mini* (Eppendorf AG) a partir de sangre completa en el caso de las razas porcinas y de un lisado hepático en el caso de los jabalíes.

El análisis de los polimorfismos de una sola base (SNP) se ha realizado con la técnica de minisequenciación o 'primer extension' (Syvanen, 1999; Sauer *et al.*, 2000). A partir de las secuencias de los genes FABP3 (Genbank Y16180 y X98558), MC4R (Genbank AB021664) y LEPR (Genbank AF092422) se han diseñado 4 parejas de cebadores (Tabla 1), para obtener los amplicones que contienen los SNPs. Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 25  $\mu$ L, conteniendo 100 ng de ADN genómico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,4  $\mu$ M de cada cebador, 1 x Buffer de la Taq y 0,5 U de Taq polimerasa (Biotools). Los amplicones se han purificado por incubación con fosfatasa alcalina y exonucleasa I, con el fin de eliminar el exceso de cebadores y dNTPs de la reacción.

La reacción de "primer extensión" se realizó con primers diseñados en las regiones inmediatamente adyacentes a cada uno de los SNP de interés (Tabla 2). Las reacciones de extensión se llevaron a cabo utilizando el kit ABI PRISM<sup>®</sup> SNaPshot Multiplex™ (Applied Biosystems). Los productos resultantes se purificaron con fosfatasa alcalina y se separaron electroforéticamente con un secuenciador automático ABI Prism 3130. La identificación de los genotipos se realizó mediante el software GeneMapper ver. 3.7.

Locus	Secuencia 5'→3'	Nº de ciclos	Tm °C	Tamaño en pb	Referencia
FABP3AD	F: ATTGCCTTCGGTGTGTTTGAG	5	63	816	Gerbens <i>et al.</i> , 1997
	R: TCAGGAATGGGAGTTATTGG	25	60		
FABP3H	F: CAGCCCAAGAGTGAGTTTCC	30	63	185	Este trabajo
	R: AGGACCCAGTCCCCTTTCT				
MC4R	F: TTGATTGGGGTCTTTGTGGT	30	60	194	Este trabajo
	R: TTGAAGGTTTTCTCAGTTCTTG				
LEPR	F: CTCCTGCCTGCTGGA ATCTC	30	60	183	Este trabajo
	R: CCTCCCTGCAATGTTGTCT				

Tabla 1. Cebadores de PCR utilizados para la obtención de los amplicones.

Todos los cebadores (de PCR y de Extensión) se han diseñado mediante el programa Primer3 v0.3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu>) de Rozen y Skaletsky (2000).

Cebador	Secuencia 5'→3'	Nº pb	SNP
FABP3A	GGGACATCTACCCTCTCTCAGGA 3'	23	C1489T
FABP3D	(dAT) <sub>5</sub> -CGCCAACAGTTCTATGGGATG	31	C1811G
FABP3H	(dAT) <sub>8</sub> -CCAGCGGCTTCTTCTCAGAT	37	T1324C
MC4R *	(dAT) <sub>11</sub> A-CGGAGTGCATAAAATCAGGGGAT	45	G1426A
LEPRH1	(dAT) <sub>14</sub> A-GACATGATGAGGCAGTTGTTGAAA	53	T221C
LEPRH2	(dAT) <sub>18</sub> -GGCAGTTGTTGAAACGGAACCTTAAT	61	T232A
LEPRH3*	(dTA) <sub>16</sub> T-TTTTAGAAGATAAGTTTGATAAGTAGGTACCACTT	69	C233T:

Tabla 2. Secuencias de cebadores para los 7 SNPs, con diferentes colas dAT para la separación de fragmentos. \* Cebadores diseñados complementarios a la cadena directa.

Las interacciones entre cebadores (formación de horquillas, homodímeros o heterodímeros) fueron analizadas mediante el programa OligoAnalyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de "primer extensión" ha resultado ser rápido y fiable en la determinación del genotipo de los animales analizados. En una sola reacción se discriminan 7 SNPs relacionados con la cantidad y calidad de la carne en porcino y puede servir para identificar y seleccionar los animales portadores de los genotipos más deseables, sin necesidad de ver su fenotipo. En la figura 1 podemos observar un electroferograma con todas las posiciones variables posibles, obtenido a partir de varios individuos heterocigotos para alguno de los SNPs analizados. Podemos ver que existen 7 regiones perfectamente diferenciadas en cuanto al tamaño de los productos de electroforesis.

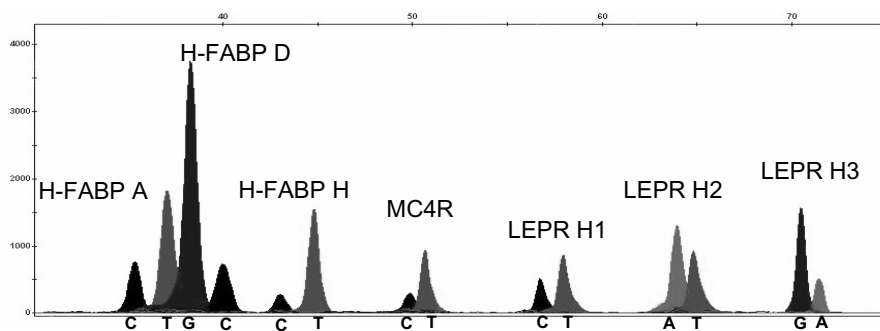


Figura 1. Electroferograma que muestra un genotipo sintético heptaheterocigoto

La tabla 3 muestra las frecuencias alélicas encontradas en las diferentes razas analizadas

Locus	Alelos	SNP	Ibérico n = 179	Duroc n = 63	LWLD n = 24	Jabalí n = 29
H-FABP A	A	C	0.764	0.331	0.896	0.714
	a	T	0.236	0.669	0.104	0.286
H-FABP D	D	C	0.688	0.339	0.521	0.034
	d	G	0.312	0.661	0.479	0.966
H-FABP H	H	T	0.989	0.905	0.875	1.000
	h	C	0.011	0.095	0.125	0.000
MC4R	R	G	0.908	0.500	0.438	1.000
	r	A	0.092	0.500	0.562	0.000
LEPR H1	H1	T	1.000	1.000	0.375	0.293
	h1	C	0.000	0.000	0.625	0.707
LEPR H2	H2	T	1.000	1.000	0.979	1.000
	h2	A	0.000	0.000	0.021	0.000
LEPR H3	H3	C	1.000	1.000	0.979	1.000
	h3	T	0.000	0.000	0.021	0.000

Tabla 3. Frecuencias alélicas encontradas en las razas analizadas.  
LWLD: Large White x Landrace.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gerbens, F., van Erp, A.J.M., Harders, F.L., Verburg, F.J., Meuwissen, T.H.E., Veerkamp, J.H., te Pas, M.F.W. 1999. Effect on genetics variants of the Heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pig. *J. Anim. Sci.* 77:846– 852.
- Kim, K.S., Larsen, N., Short, T., Plastow, G., Rothschild, M.F. 2000. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome.* 11: 131-135.
- Mackowski, M., Szymoniak, K., Szydowski, M., Kamyczek, M., Eckert, R., Rozycki, M., Switonski, M. 2005. Missense mutations in exon 4 of the porcine LEPR gene encoding extracellular domain and their association with fatness traits. *Anim. Genet.* 36:135-137.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, N.J., pp 365-386.
- Sauer, S., Lechner, D., Berlin, K., Lehrach, H., Escary, J.L., Fox, N., Gut, I.G. 2000. A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acid Res.*, 28: E13.
- Suda, T., Katoh, M., Hiratsuka, M., Fujiwara, M., Irizawa, Y., Oshimura, M. 2003. Use of real time RT-PCR for the detection of allelic expression of fan imprinted gene. *Int. J. Mol. Med.*, 12: 243-246.
- Syvanen, A.C. 1999. From gels to chips: “minisequencing” primer extension analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.*, 13: 1-10.

Este trabajo es parte del Proyecto PDT05B017. Junta de Extremadura. FEDER.