

PROTOCOLOS DE PCR EN LA DETECCIÓN DEL SEGUNDO EXÓN DEL GEN BOLA-DRB3.2¹

Axel Villalobos-Cortés²; Rita González-Herrera³

RESUMEN

El gen del antígeno leucocitario bovino (BoLA) desempeña un papel importante en la respuesta inmune y se han asociado a la resistencia o susceptibilidad de enfermedades infecciosas y autoinmunes, tales como mastitis, leucosis, dermatofilosis, parasitosis internas y externas responsables de importantes pérdidas económicas. Existen grupos de autores que han realizado estudios moleculares y que aplican protocolos de PCR donde se amplifican el gen BoLA-DRB3.2. El objetivo de este trabajo fue evaluar los protocolos de amplificación del segundo exón del gen BoLA-DRB3.2, desarrollados por Dietz *et al.* (A) y Takeshima *et al.* (B). Se realizó un muestreo aleatorio de pelo de la zona caudal de 50 bovinos en diversos sitios de la República de Panamá. A la luz de los resultados observados en el presente trabajo, el protocolo B logró las mejores amplificaciones del segundo exón del gen BoLA-DRB3.2, siendo el de elección para profundizar en el seguimiento de las investigaciones que involucran dicho gen en bovinos panameños.

PALABRAS CLAVES: Bovinos, biotecnología, genética, biología molecular, biodiversidad.

¹Recepción: 28 de marzo de 2017. Aceptación: 31 de mayo de 2017. Proyecto Conservación y uso del bovino criollo panameño.

²Ph.D en Conservación y Mejora Animal. IDIAP. Laboratorio de Análisis y Biología Molecular Aplicada (LABMA). e-mail: villalobos.axel@gmail.com

³Lic. Biotecnología. IDIAP. LABMA. e-mail:ritacarolinagonzalez@gmail.com

PCR PROTOCOLS IN THE DETECTION OF THE SECOND EXON OF THE BoLA-DRB3.2 GENE

ABSTRACT

The bovine leukocyte antigen (BoLA) gene, plays an important role in the immune response and has been associated with the resistance or susceptibility of infectious and autoimmune diseases such as mastitis, leucosis, dermatophilosis, internal and external parasites, responsible for significant economic losses. There are groups of authors that have performed molecular studies and apply PCR protocols where the BoLA-DRB3.2 gene is amplified. The objective of this work was to evaluate the amplification protocols of the second exon of the BoLA-DRB3.2 gene in cattle developed by Dietz *et al.* (A) and Takeshima *et al.* (B). A random sampling of hair from the caudal area of 50 cattle was carried out in several sites of the Republic of Panama. Considering the results observed in the present study, protocol B achieved the best amplifications of the second exon of the BoLA-DRB3.2 gene, being the one of choice to deepen the follow up of the investigations that involve these gene in Panamanian cattle.

KEY WORDS: Bovine, bioechnology, genetics, molecular biology, biodiversity.

INTRODUCCIÓN

En los estudios de diversidad genética bovina, destacan la detección de genes de resistencia identificados en razas adaptadas localmente tales como las poblaciones criollas y autóctonas, como es el caso del gen BoLA o Antígeno Leucocitario Bovino (Martínez *et al.* 2005, Castro *et al.* 2006, Darwin 2010).

Los genes del BoLA desempeñan un papel importante en la respuesta inmune y se han asociado a la resistencia o susceptibilidad de enfermedades infecciosas y autoinmunes, tales como

mastitis (Takeshima *et al.* 2010), leucosis, dermatofilosis, parasitosis internas y externas responsables de importantes pérdidas económicas (Do Nascimento *et al.* 2006, Juliarena *et al.* 2008, Panei *et al.* 2009). Además, estos polimorfismos han sido relacionados con variables de respuesta inmune y con diferentes características productivas, como por ejemplo producción de leche y crecimiento (Takeshima y Aida 2006).

Existen grupos de autores que han realizado estudios moleculares y que aplican protocolos de PCR donde

se amplifican fragmentos asociados al antígeno leucocitario bovino (BoLA), destacando los protocolos reportados por Dietz *et al.* (1997) y Takeshima *et al.* (2001). Ambos protocolos han sido utilizados y han sufrido algunas modificaciones de las cuales se destacan las realizadas en la segunda reacción de amplificación. Estas reacciones de amplificación presentan diferencias sustanciales y es pertinente su evaluación para ajustar un protocolo para la amplificación del segundo exón del gen del complejo mayor de histocompatibilidad DRB3, de razas localmente adaptadas en la República de Panamá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo aleatorio de pelo de la zona caudal de 50 bovinos en diversos sitios de la República de Panamá. El protocolo de extracción consistió en un método modificado, una solución de extracción comercial. Se colocaron 10 muestras de pelo en tubos de 250 μ l y se agregaron 150 μ l del reactivo; se aplicó vórtex por 15 segundos; luego se incubaron a 65° C por 6 minutos, nuevamente se aplicó vórtex por 15 segundos e incubaron a 98° C por 2 minutos. Ambas incubaciones se realizaron en un equipo de PCR. Las muestras se guardaron a -20° C para su uso en el experimento. El rendimiento teórico de ADN reportado por el fabricante es de 20 a 140 ng/ μ l por cada muestra de

10 pelos. La amplificación del segundo exón del gen BoLA-DRB3, se realizó en un equipo de PCR, mediante un protocolo semi-anidado. En las reacciones de PCR se utilizaron los oligonucleótidos:

HLO30: 5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3';
HL031: 5'TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3';
HL032: 5'-TCGCCGCTCAGTGAAACTCTC-3'

(Groenen *et al.* 1990, Siguardardorttir *et al.* 1991).

En la primera reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos HL030 y HL031 (0,5 mM), en 25 μ l de mezcla total, con 70 a 100 ng de ADN, 0,2 mM de cada DNTP, 1x de tampón PCR, 1,5 mM $MgCl_2$ y 1U de Taq ADN polimerasa. El programa de amplificación constó de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94° C, 10 ciclos de 25 segundos a 94° C, 30 segundos a 60° C y 30 segundos a 72° C, con una extensión final de 5 minutos a 72° C (Dietz *et al.* 1997).

Para realizar la segunda reacción se utilizaron dos distintos protocolos de PCR: el primer protocolo (A) se basó en lo reportado por Dietz *et al.* (1997), se tomó 5 μ l de la primera reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos HL030 y HL032 en un volumen total de 25 μ l, con las mismas concentraciones de DNTP, tampón PCR, $MgCl_2$ y Taq ADN polimerasa y constó de una desnaturalización inicial de 25 ciclos

de 40 segundos a 94° C, 30 segundos 65° C y con una extensión final de 5 minutos a 72° C. En el segundo protocolo (B) se utilizó el reportado por Takeshima *et al.* (2001) en los que se tomaron 5 µl de la primera reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos HL030 y HL032 en un volumen total de 25µl, con las mismas concentraciones de DNTP, tampón PCR, MgCl₂ y Taq ADN polimerasa y constó de una desnaturalización inicial de 94° C a 4 minutos seguida de 25 ciclos de desnaturalización 94° C a un minuto; anillamiento de 67° C a 2 minutos y elongación de 72° C a un minuto y una extensión final de 72° C por 5 minutos.

El producto de PCR de ambas reacciones fue resuelto en geles de agarosa al 2% utilizando 5 ul del amplicón, 2 ul de gel de carga y 4 ul de K180 como marcador (2 ul K180 y 2 ul de gel de carga) y teñido mediante SYBR Safe. Los productos de PCR fueron visualizados en una foto documentadora. El producto de ambas reacciones será una banda de 284 pares de bases en el gel de agarosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado del protocolo A, se presenta con una baja calidad de la imagen (Figura 1), lo contrario a lo reportado por Dietz *et al.* (1997) en el estudio de factores de riesgo de mastitis subclínica en muestras de leche de ganado lechero

y la presencia del gen BoLA DRB3; Acharya *et al.* (2002) aplicaron protocolo similar en estudios de PCR-RFLP bovinos de la raza Gyr y Kankrej de la India utilizando muestras de sangre. Da Mota *et al.* (2002) y Machado *et al.* (2005) igualmente reportan el uso del protocolo A en estudios de diversidad de bovinos Gyr de Brasil; Kelly *et al.* 2003 reportan el mismo procedimiento en estudios de diversidad de bovino criollo de Uruguay en geles de poliacrilamida. Nassiry *et al.* (2008) y Mosafer *et al.* (2012) en Irán presentan resultados positivos en el uso de este protocolo de PCR, en la identificación del segundo exón del complejo mayor de histocompatibilidad en subpoblaciones de bovinos Holstein y Búfalos, respectivamente.

Por otro lado, los resultados donde se aplicó el protocolo B (Figura 2), se observan las amplificaciones correspondientes a la región cercana a 284 bp con mejor resolución y calidad que el protocolo A. Bajo este esquema de trabajo, Jeong *et al.* 2007 obtuvieron similares resultados en el estudio del complejo mayor de histocompatibilidad de bovino Hanwo de Korea. Por otro lado, Tahmoorespur *et al.* 2007 realizaron estudios de polimorfismo de genes candidatos de BoLA mediante este mismo protocolo en bovinos Sistani de Irán. Igualmente, Zambrano *et al.* 2011

utilizaron el mismo protocolo en estudios de resistencia a mastitis en bovinos criollos colombianos; Wu *et al.* 2010 en China, también realizaron estudios del gen BoLA en bovino Holstein extrayendo ADN de sangre. Finalmente, Oprzadek *et al.* 2012 realizaron un estudio del polimorfismo del gen BoLA utilizando una técnica de un solo paso para amplificar el segundo exón del BoLA, con este mismo protocolo de amplificación, en hatos comerciales Holstein-Friesian de Polonia. En este trabajo pudieron aislar el fragmento esperado de 284 bp, región similar a la encontrada en el presente trabajo. Comparando las reacciones de PCR de los dos grupos de autores

que utilizaron ambos protocolos, no se observan diferencias sustanciales en cuanto a volumen final, producto de PCR utilizado, cantidad de DNTP, Taq polimerasa y cebadores, sin embargo, en este trabajo el protocolo B presentó el mejor resultado.

Respecto a los protocolos evaluados, se puede mencionar que el protocolo A presenta una secuencia simplificada de desnaturalización inicial, ciclo de desnaturalización, anillamiento y elongación y una extensión final, ya que entra directo a los ciclos de desnaturalización y anillamiento y una extensión final (ver Cuadro).

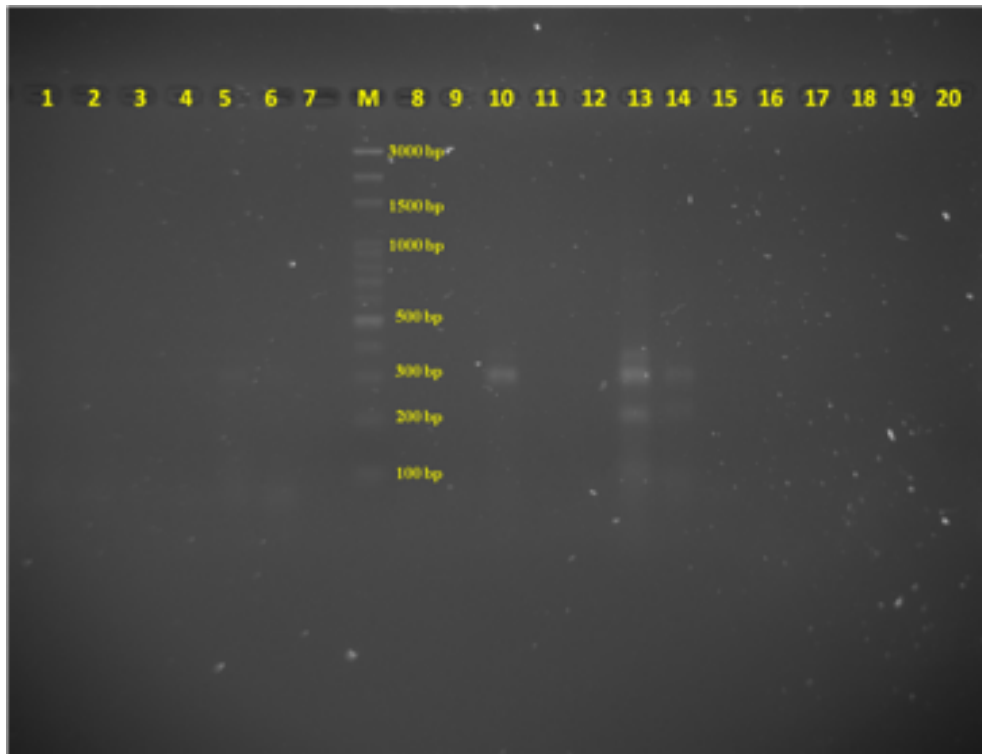


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de fragmentos de PCR correspondientes al segundo exón del gen BoLA-DRB3 utilizando protocolo A.

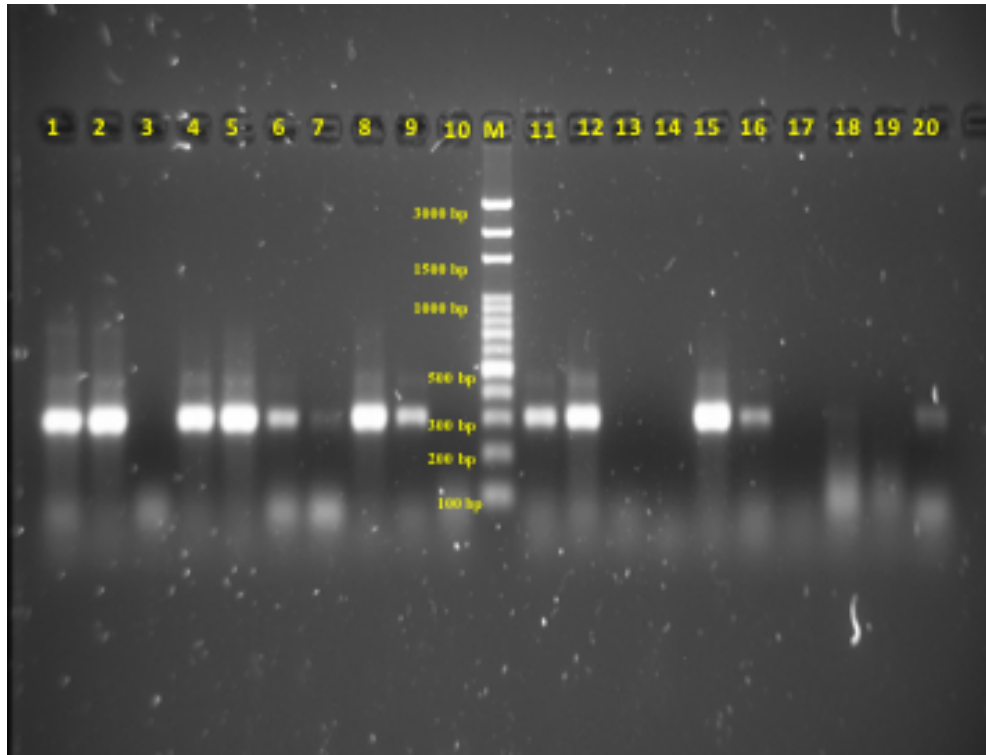


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de fragmentos de PCR correspondientes al segundo exón del gen BoLA-DRB3 utilizando protocolo B.

CUADRO. COMPARACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE PCR REPORTADO POR DIVERSOS AUTORES PARA LA DETECCIÓN DEL SEGUNDO EXÓN DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

	Protocolo A	Protocolo B
Desnaturalización inicial	...	94° C, 4 minutos
Ciclos	25	25
Desnaturalización	94° C, 40 segundos	94° C, 1 minuto
Anillamiento	65° C, 30 segundos	67° C, 2 minutos
Extensión	...	72° C, 1 minuto
Extensión final	72° C, 5 minutos	72° C, 5 minutos

Protocolo A: Dietz *et al.* (1997), Kelly *et al.* (2003), Mosafer *et al.* (2012).

Protocolo B: Zambrano *et al.* (2011), Wu *et al.* (2010), Oprządek *et al.* (2011).

Comparando ambos protocolos, es posible que en el protocolo A, la supresión de la etapa de extensión posterior al anillamiento de los cebadores, afecte significativamente la reacción en cadena produciendo un bajo rendimiento de amplicones por parte de la Taq polimerasa en el periodo de extensión final de cinco minutos, además el hecho que no haya desnaturalización inicial pudo afectar también la apertura de la horquilla de ADN. Por otro lado, en el tratamiento B se presentan todas las etapas de la reacción y se observa una imagen más clara y de mejor calidad en la amplificación del segundo exón del gen del complejo mayor de histocompatibilidad lo que indica que este último protocolo sería el de elección para el estudio de este gen.

CONCLUSIÓN

- El protocolo B logró las mejores amplificaciones del segundo exón del gen BoLA-DRB3, siendo el de elección para profundizar en el seguimiento de las investigaciones que involucran dicho gen en bovinos criollos panameños.

BIBLIOGRAFÍA

Acharya, CP; Pipalia, DL; Rank, DN; Joshi, CG; Solanki, JV; Shah, RR. 2002. Detection of BoLA.DRB3 gene polymorphism in Gir and

Kankrej cattle using PCR-RFLP. Indian Journal of Animal Science 72(8):680-683.

Castro, GS; Trujillo, EB; Duran, CV. 2006. Polimorfismos del gen BoLADRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. Rev Col Cienc Pec. 19:3:270-279.

Da Mota, AF; Gabriel, JE; Martinez, ML; Coutinho, LL. 2002. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). European Journal of Immunogenetics 29:223–227.

Darwin, Y. 2010. Asociación del locus BOLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis Bovina en razas criollas y colombianas. Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Agropecuarias Coordinación General De Posgrados Palmira. Tesis de Maestría. 101p.

Dietz, AB; Cohen, ND; Timms, L; Kehrl, ME. 1997. Bovine Lymphocyte Antigen Class II Alleles as Risk Factors for High Somatic Cell Counts in Milk of Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 80(2):406-412.

- Do Nascimento, CS; Machado, MA; Martinez, ML; Barbosa Da Silva, MVG; Martins, MFG; Campos, AL; Sousa, ALA; Teodoro, RL; Da Silva, RV; Facioni, SEG; Andrade, DAO. 2006. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular Biology* 29(4): 641-647.
- Groenen, M; Van Der Poel, J; Dijkhof, R; Giphart, M. 1990. The nucleotide sequence of bovine MHC class II DQB and DRB genes. *Immunogenetics* 31:37-44.
- Jeong, JH; Bhuiyan, MSA; Lee, JS; Yu, SL; Sang, BC; Yoon, D; Jeon, JT; Lee, JH. 2007. Characterization of BoLA-DRB3.2 Alleles in Hanwoo (Korean cattle) by Sequence Based Typing (SBT). *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20(12):1791-1797.
- Juliarena, MA; Poli, M; Sala, L; Ceriani, C; Gutierrez, S; Dolcini, G; Rodriguez, EM; Mariño, B; Rodriguez-Dubra, C; Esteban, EN. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gen. *Animal Genetics* 39:432-438.
- Kelly, L; Nicolini, P; D'Angelo, M; Nimo, A; Rincón, G; Piaggio, J; Postiglioni, A. 2003. Polimorfismo del gen DRB3.2 en bovinos criollos del Uruguay. *Arch. Zootec.* 52:77-80.
- Machado, MA; Nascimento, CS; Martínez, ML; Silva, MVGB; Campos, AL; Teodoro, RL; Verneque, RS; Guimarães, SEF. 2005. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57(3):380-389.
- Martínez, ML; Machado, MA; Nascimento, CS; Silva, MVGB; Martínez, R; Toro, R; Montoya, F; Burbano, M; Tobon, J; Gallego, J; Ariza, F. 2005. Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Arch Zootec.* 54:349-356.
- Mosafer, J; Heydarpour, M; Manshad, E; Russell, G; Sulimova, GE. 2012. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of Two New Alleles in Iranian Buffalo Breed. *The Scientific World Journal*, Volume 2012, Article ID 863024, 6 p.

- Nassiry, M; Sadeghi, B; Tohidi, R; Tavakkoli Afshari, J; Khosravi, M. 2008. Comparison of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 allele frequencies between two subpopulations of Iranian holstein cattle. *African Journal of Biotechnology* 7(15):2671-2675.
- Tahmoorespur Mojtaba, Mohammad Reza Nassiry, Mohsen Fathi Najafi; Shahrokh Ghovvati. 2007. Genetic Polymorphism at the Candidate Gene in Iranian Sistani Cattle (*Bos indicus*). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10:3368-3373.
- Takeshima, S; Ikegami, M; Morita, M; Nakai, Y; Aida, Y. 2001. Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics* 53:74-8.
- Takeshima, SN; Aida, Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J.* 77:138-150.
- Takeshima, S; Matsumoto, Y; Arainga-Ramirez, M; Kim, J; Miyasaka, T; Xue, G; De La Barra Díaz, VG; Giovambattista, G; Pofcher, EJ; Rivera-Geronimo, H; Saito, H; Acosta, TJ; Kanemaki, M; Ortiz, ML; Oltra, J; Onuma, M; Aida, Y. 2010. Variation of cattle major histocompatibility complex (BoLA) DRB3 allele frequencies within different farm, breed and countries in South America. *In XXXII Conference of the International Society for Animal Genetics*, Edimburgo, Reino Unido, del 26 al 30 de julio. p. 82.
- Oprządek, J; Urtnowski, P; Sender, G; Pawlik, A; Łukaszewicz, M. 2012. Frequency of BoLA-DRB3 alleles in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports* 30(2):91-101.
- Panei, CJ; Suzuki, K; Echeverria, MG; Serena, MS; Metz, GE; Gonzales, ET. 2009. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *International of Journal of Dairy Science* 4:123-128.
- Wu, XX; Yang, ZP; Wang, XL; Mao, YJ; Li, SC; Shi, XK; Chen, Y. 2010. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Chinese Holstein of the south China. *J. Biomedical Science and Engineering* 3:221-225 (en línea). Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.SciRP.org/journal/jbise/>

Zambrano, JC; Echeverri, JZ; López, AH.

2011. Alleles of the BoLA DRB3.2 gene are associated with mastitis in dairy cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(2).

AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) y Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología se les agradece el apoyo financiero del presente trabajo.