

POLIMORFISMOS DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLPS) DEL *LOCUS* DE LA PROTEINA ACTIVADORA DE ESFINGOLIPIDOS-2 (SAP-2) EN GANADO VACUNO

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OF THE SPHINGOLIPID ACTIVATOR PROTEIN-2 (SAP-2) *LOCUS* IN CATTLE

Elduque, C., P. Zaragoza y C. Rodellar

Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza, España.

Palabras clave adicionales

Polimorfismo del DNA. U29. Southern blot.

Additional keywords

DNA polymorphism. U29. Southern blot.

RESUMEN

En este momento uno de los objetivos del proyecto europeo acerca de la construcción del mapa genético bovino (BOVMAP project) es la búsqueda y descripción de *loci* de tipo I (*loci* conservados entre especies mamíferas) para poder realizar análisis de mapeo comparativo.

En este trabajo se describe el polimorfismo a nivel del DNA del gen SAP-2 (proteína activadora de esfingolipidos-2) en la especie bovina, como un paso para incorporar *loci* comparativos tipo I en el mapa de ligamiento bovino. El gen SAP-2 ha sido asignado, mediante análisis de un panel de células somáticas híbridas, al grupo de sintenia U29 junto con los genes HK-1 (hexokinasa-1), RBP3 (proteína que se une al retinol-3) y PLAU (activador del plasminógeno, tipo urokinasa).

Se han analizado 154 muestras de DNA (pertenecientes a una muestra cogida al azar de individuos de diferentes razas bovinas) utilizando una sonda heteróloga (sonda cDNA humana del gen SAP-2). Tras conseguir las condiciones de hibridación y lavado apropiadas, se realizó la búsqueda de RFLPs

utilizando 7 enzimas de restricción (BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, MspI, PstI y TaqI).

El patrón de bandas obtenido, en el caso de HindIII y PstI, una vez comprobada la segregación en familias, es el resultado de dos alelos que siguen una herencia mendeliana autosómica codominante (SAP-2^A y SAP-2^B). El resto de enzimas, muestran un modelo monomórfico.

La frecuencia génica ha sido de 0,81 para el alelo SAP-2^A, y 0,19 para SAP-2^B, con un valor de PIC de 0,26 (contenido de información polimórfica).

SUMMARY

At the moment, one of the aims of the European bovine gene mapping project (BOVMAP project) is the search for and description of type I *loci* (conserved among mammalian species), in order to carry out comparative gene mapping studies.

The SAP-2 gene has been assigned to the U29 syntenic group, by somatic cell mapping, together

with the following genes: HK-1 (hexokinase-I), RBP3 (retinol-binding protein 3) and PLAU (plasminogen activator, urokinase type).

In this work, DNA polymorphism is described at the SAP-2 (sphingolipid activator protein 2) gene in cattle, as a first step to incorporate type I comparative *loci* into the bovine linkage map.

154 DNA samples (corresponding to random selected individuals from different bovine breeds) have been analyzed using an heterologous probe (a human cDNA SAP-2 probe).

After achieving the idoneous hybridization and washing conditions, RFLPs searching was carried out using seven restriction enzymes.

The fragment patterns obtained by HindIII and PstI digestion, as family segregation analysis showed, are the result of two codominant autosomal alleles (SAP-2^a and SAP-2^b). The other enzymes showed to be monomorphic.

Allele frequencies were 0.81 for SAP-2^a and 0.19 for SAP-2^b, and the polymorphic information content (PIC) value was 0.26.

INTRODUCCION

La consecución de un mapa génico detallado en las diferentes especies animales, en particular en la especie bovina, se ha convertido en los últimos años en el objetivo de muchos equipos de investigación en genética molecular. Recordemos que en este momento está elaborándose la carta genética de varias especies animales (bovino, ovino, cerdos, perros y ratón), además de la del hombre.

Los trabajos realizados en el mapeo génico humano y animal han llevado a la clasificación de dos clases de *loci* útiles para la construcción de mapas génicos en nuevas especies (O'Brien *et al.*, 1993). El primer tipo -tipo I- son *loci* conservados entre especies de mamíferos, generalmente genes codificantes, útiles en

estudios de mapeo génico comparativo. Estos estudios comparan las asociaciones de *loci* homólogos entre distintas especies. La segunda clase de *loci* -tipo II- son segmentos de DNA altamente polimórficos, que proporcionan gran información genética, pero menos útiles para estudios comparativos de evolución.

La detección de variación en genes asignados anteriormente a grupos sinténicos bovinos o a cromosomas, ofrece un medio para aprovechar la información de los mapas físicos a favor del desarrollo del mapa de ligamiento bovino.

La variación de los marcadores de tipo I puede ser detectada mediante RFLPs. Las enzimas de restricción (Nathans y Smith, 1975) reconocen secuencias concretas del DNA, cortándolas y originando la fragmentación del mismo. Estos fragmentos de restricción originados pueden ser separados según su tamaño y carga mediante electroforesis en gel de agarosa.

Cuando existen genotipos diferentes en la población causados por deleciones, inserciones o mutaciones a nivel del DNA, se originan sitios de corte nuevos y por tanto diferentes longitudes de estos fragmentos (RFLP-marcadores de tipo I). Estos cambios pueden reconocerse según la movilidad de estos fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para detectar zonas concretas dentro de todo el complejo DNA fragmentado, se utiliza la hibridación con el método de Southern (Southern, 1975), de forma que el DNA del gel de agarosa es transferido a una membrana de nylon o nitrocelulosa e hibridado con una sonda marcada, que localiza la zona deseada.

SAP-2 RFLPS EN VACUNO

Los RFLPs fueron los primeros marcadores genéticos, a nivel del DNA, utilizados en el mapeo (Botstein *et al.*, 1980), además como están generalmente relacionados con genes concretos, en este momento están siendo buscados a lo largo del genoma ya que son muy útiles en el estudio de asociaciones entre un carácter de interés (como la resistencia a enfermedades) y la variación en un *gen candidato*, del que se intuye su relación con el carácter por sus características bioquímicas, fisiológicas, etc.

Las proteínas activadoras de esfingolípidos (SAPs) se caracterizan por tener un peso molecular relativamente bajo y ser estimulantes de reacciones entre sustratos de los esfingolípidos y ácidos lisosomales específicos (Inui y Wenger, 1983). Las saposinas son SAPs, cuatro de las cuales (Saposina A, Saposina B o SAP-1, Saposina C o SAP-2 y Saposina D) se derivan de un único precursor (prosaposina) por proteólisis (O'Brien y Kishimoto, 1991).

En la especie humana, la deficiencia de alguna de estas saposinas ha sido descrita en enfermedades hereditarias caracterizadas por desórdenes en el almacenamiento de lisosomas (*human lysosomal storage disorder*, O'Brien y Kishimoto, 1991).

Collard, *et al.* (1988) demostraron una alta identidad de aminoácidos entre la prosaposina humana y la glicoproteína sulfatada (SGP-1) de rata.

En el presente trabajo se ha buscado el polimorfismo a nivel del DNA del gen SAP-2 en la especie bovina, utilizando para ello la sonda cDNA humana SAP-2 y la técnica *Southern blot*. Este tipo de estudios son necesarios para incorporar *loci* comparativos tipo I en el mapa de

ligamiento bovino. Asimismo, se ha establecido el control genético de este gen mediante estudio de familias, así como la frecuencia génica y el valor de PIC (contenido de información polimórfica).

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Para el análisis de los RFLPs del gen SAP-2 en bovino se utilizó una población de 154 muestras correspondientes a dos poblaciones bien diferenciadas. La población 1 correspondía a 120 animales no emparentados de las razas Asturiana de los Valles, de Lidia, Pirenaica, Frisona y Limousine, recogidas en España. La población 2 está representada por un rebaño experimental de Texas Agricultural Experiment Station McGregor TX, correspondiente a 34 animales de razas puras y cruzadas de las razas Angus, Brahman, Charolais, Hereford, Holstein, Jersey y Red Polled. Con ello se ha pretendido formar una muestra suficientemente variable como para poder encontrar variabilidad genética.

Para el análisis de familias se estudiaron un total de 44 descendientes correspondientes a 9 machos y 40 hembras. Para asegurar que no había errores en la asignación de paternidad se ha realizado un análisis estándar de grupos sanguíneos (A, B, C, FV, J, L, S, T, Z) y polimorfismos bioquímicos (ALB, CA, GC, AMY-1, TF, PTF-2, HB).

La sangre (30 - 50 ml) fue recogida en tubos con anticoagulante EDTA y una vez aislados los leucocitos por centrifugación a 3500 rpm, almacenados a -70°C hasta que se realizó la extracción del DNA genómico.

OBTENCION DEL DNA

El DNA fue aislado según el método de Jeanpierre (1987) modificado por Grohs (comunicación personal).

A los leucocitos aislados se les añadió de 15 a 20 ml de tampón para lisis (acetato de amonio 7,5 M, guanidina hidrociorada 6M, M-lauril sarcosina al 20 p.100 y proteínasa K: 1,5 mg/muestra), y se mantuvieron en agitación durante 12 horas a 56°C. El DNA fue recogido por precipitación con etanol al 100 p.100. Finalmente se lavó mediante agitación con etanol al 70 p.100 a 4°C durante una hora.

La dilución final del DNA se realizó añadiendo TE (Tris ClH 10mM y EDTA 1 mM pH=8) para obtener una concentración final de 250 ng/ml. El DNA obtenido se almacenó a -30°C.

SONDA DE HIBRIDACION

La sonda cDNA humana SAP-2 usada (*American Type Culture Collection n° 59662*) contiene la mayor parte de la secuencia del gen que codifica la proteína activadora de esfingolípido 2 en la especie humana.

La sonda de 648 pares de bases fue aislada del clon SAP4B. Dicha sonda estaba introducida en un plásmido pUC en *E. coli* y se obtuvo mediante digestión con EcoRI. Los fragmentos fueron separados en gel de agarosa, recuperándola a partir de éste.

Esta sonda fue marcada radioactivamente con α (32 P) dCTP, utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*.

DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y TRANSFERENCIA DEL DNA

Cinco mg de DNA vacuno fueron digeridos con las enzimas de restricción

(5 unidades/mgDNA) BglII, BamHI, EcoRI, HindIII, MspI y PstI a 37°C toda la noche y a 65°C con TaqI siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Promega).

Las muestras digeridas fueron separadas en gel de agarosa al 0,8 p.100 y transferidas a membrana de nylon Hybond-N (Amersham), siguiendo el método de Southern (1975). Como marcador de talla se utilizó el DNA del fago λ , digerido con HindIII.

CONDICIONES DE HIBRIDACION

La prehibridación e hibridación se realizaron en un horno de hibridación. Las membranas fueron prehibridadas durante 30 minutos a 65°C en 3-5 ml de una solución que contiene 10 p.100 de polietilenglicol, 7 p.100 SDS en 1.5 X SSPE y esperma de salmón en una concentración de 100 mg/ml. La sonda marcada se añadió a la solución de prehibridación ($>10^6$ cpm/ml).

En cada tubo del horno se realizó la hibridación de hasta 4 membranas a la vez. La hibridación fue llevada a cabo durante 16 horas a 65°C.

Después de la hibridación las membranas fueron lavadas dos veces en una solución 1X SSC y 1 p.100 SDS, durante 15 minutos a temperatura ambiente y 4 veces durante 20 minutos a 55°C en 1X SSC y 0,1 p.100 SDS.

Las membranas fueron expuestas a película Kodak XAR-5 con dos pantallas intensificadoras Quanta III a -70°C durante 14-48 horas.

La deshibridación fue llevada a cabo lavando las membranas en solución 1 p.100 SDS, 0,1X SSC, previamente calentada hasta 90°C y manteniéndola con agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

SAP-2 RFLPS EN VACUNO

PARAMETROS GENETICOS DE LA POBLACION

Para el estudio de la variabilidad genética en la población estudiada se ha utilizado el programa BYOSIS-1 (Swofford y Selander, 1989).

El cálculo de frecuencias génicas se realizó por el método del contaje directo de genes, que en el caso de locus con dos alelos codominantes, se realizó de la forma siguiente:

$$p_i = \frac{P + 1/2Q}{N} \quad q_i = 1 - p_i$$

siendo:

P = número de individuos homocigóticos para el alelo *i* de un locus.

Q = número de individuos heterocigóticos para este locus.

N = número total de animales.

El cálculo del error estándar se realizó según la fórmula:

$$e.s. = \sqrt{p_i(1-p_i)/2N}$$

El cálculo de las frecuencias genotípicas esperadas se realizó utilizando la fórmula de Levene (1949) para tamaños pequeños de muestra. Para determinar si la población se encontraba en equilibrio genético Hardy-Weinberg, se realizó la prueba de χ^2 de equilibrio, aplicándose la corrección de Yates (Fisher y Yates, 1963).

El cálculo de la heterocigosidad observada y esperada, se realizó de la forma siguiente:

H_o = Número de heterocigotos observados / N; $H_e = 1 - \sum p_i^2$

El índice de fijación de Wright (1965), se calculó como $F = (H_e - H_o) / H_e$

La desviación de F de cero puede ser testada mediante test de χ^2 de significación, según la fórmula $\chi^2 = NF^2$ (Hedrick, 1985; Nei, 1987).

La evaluación del contenido de información polimórfica (PIC), se calculó según Botstein *et al.* (1980). La fórmula es la siguiente:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

siendo n el número de alelos de un marcador y p_i sus frecuencias. De esta forma, se considera que un locus es altamente informativo cuando tiene un valor PIC mayor a 0,5; razonablemente informativos con valores entre 0,5 y 0,25; y poco informativos cuando son menores a 0,25.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las condiciones de nuestro trabajo se ha obtenido una buena hibridación con la sonda SAP2 de cDNA humano, al utilizarla en muestras de DNA bovino. Esto sugiere la presencia de una región SAP-2 semejante en bovino.

Esta zona muestra una hibridación muy intensa y sin fondo *background*, caracterizada por la presencia de muy pocas bandas (de 1 a 3 por muestra, véase **figura 1**), lo cual nos puede indicar que SAP-2 es un gen de copia única en el genoma bovino (Johansson *et al.*, 1993).

El DNA aislado de cada animal fue digerido con 7 enzimas de restricción (BglII, BamHI, EcoRI, HindIII, MspI, PstI y TaqI). Con las enzimas BglII, BamHI, EcoRI, MspI y TaqI apareció un único fragmento y no hubo variación entre individuos.

Al realizar el análisis del *Southern*

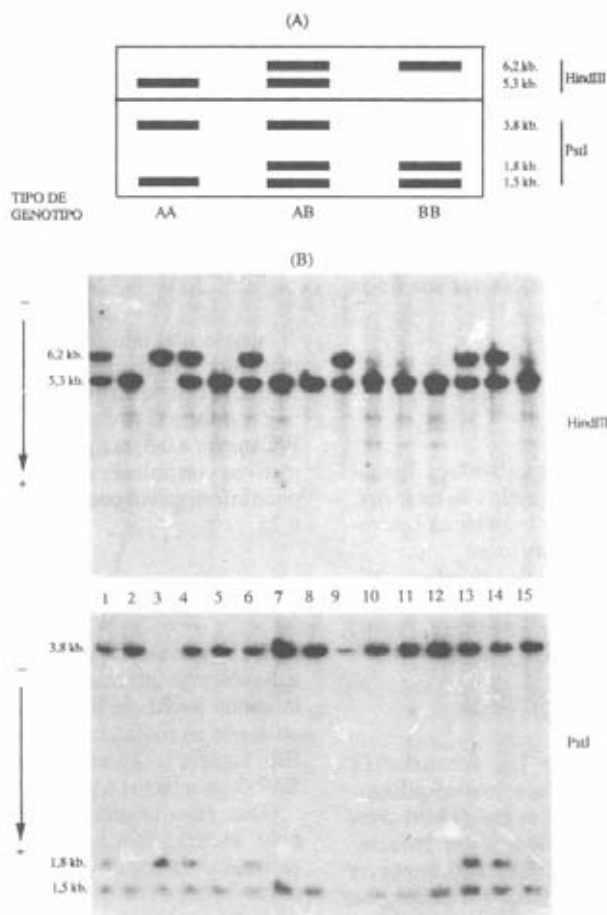


Figura 1.- RFLPs del gen SAP-2 bovino, obtenidos mediante Southern blot y digestión con las enzimas de restricción *HindIII* y *PstI* (A). Diagrama representativo de los modelos de los genotipos encontrados. (B) Imagen de dos autorradiografías: calles 2, 5, 7, 8, 10, 11, 12 y 15, corresponden a animales SAP-2^A/SAP-2^A; calles 1, 4, 6, 9, 13 y 14, a animales SAP-2^A/SAP-2^B; calle 3 corresponde a un animal SAP-2^B/SAP-2^B. (Bovine SAP-2 RFLPs obtained by Southern blot and *HindIII* and *PstI* digestion. (A) Diagrammatic representation of the fragment patterns. (B) Autoradiograms: lines 2, 5, 7, 8, 10, 11, 12 and 15, corresponding to SAP-2^A/SAP-2^A animals; lines 1, 4, 6, 9, 13 and 14, to SAP-2^A/SAP-2^B animals; line 3 corresponding to a SAP-2^B/SAP-2^B animal).

SAP-2 RFLPS EN VACUNO

blot usando los enzimas HindIII y PstI aparecieron diferentes modelos de restricción (RFLPs). Concretamente con la enzima HindIII aparecieron 3 modelos diferentes. El tamaño de los fragmentos fue 5,3 kb y 6,2 kb, observándose individuos que presentaban los patrones siguientes: 5,3 kb, 5,3 kb + 6,2 kb y 6,2 kb (véase **figura 1**).

Cuando utilizamos la enzima de restricción PstI, aparecen 2 fragmentos variables de 3,8 kb y 1,8 kb y uno constante de 1,5 kb. En este caso se observaron individuos con 3 modelos diferentes: 3,8 kb + 1,5 kb; 3,8 kb + 1,8 kb + 1,5 y 1,8 kb + 1,5 kb (véase **figura 1**).

Se observó una total correspondencia en cada individuo para los polimorfismos encontrados con estas dos enzimas, es decir, todos los animales con un modelo determinado para la enzima HindIII, tuvieron un único modelo con la enzima PstI. Estos resultados sugieren que los distintos RFLPs detectados con las enzimas HindIII y PstI corresponden a la misma zona de variación, detectada por la sonda SAP-2 en el genoma bovino.

En base a estos hechos se pensó que la región del genoma revelada por la sonda

SAP-2 corresponde a un gen de copia única SAP-2 con dos alelos de herencia codominante SAP-2^A y SAP-2^B. El alelo SAP-2^A estaría caracterizado por 5,3 kb EcoRI-(3,8 kb + 1,5 kb) PstI y SAP-2^B por 6,2 kb HindIII-(1,8 kb + 1,5 kb) PstI.

Para comprobar que el gen SAP-2 está controlado para dos alelos autosómicos y codominantes se realizó un estudio de segregación, utilizando nueve machos cruzados con 40 hembras diferentes de los que se obtuvieron 44 descendientes. Los resultados obtenidos se exponen en la **tabla 1**. En ninguno de los cruces se observan diferencias significativas entre los genotipos observados y esperados, lo que supone una herencia controlada por un gen autosómico con dos alelos codominantes SAP-2^A y SAP-2^B.

A partir de los resultados expuestos podemos diferenciar claramente 3 genotipos: SAP-2^A/SAP-2^A; SAP-2^A/SAP-2^B y SAP-2^B/SAP-2^B, tal como se muestra en la **figura 1**. El genotipo SAP-2^A/SAP-2^A se caracteriza por la presencia de una banda de 5,3 kb con HindIII, y de dos bandas de 3,8 kb y 1,5 kb con PstI; el genotipo SAP-2^A/SAP-2^B muestra las

Tabla 1. Estudios de segregación del gen SAP-2 mediante análisis de familias en la especie bovina. (Study of SAP-2 gene segregation by family analysis in cattle).

Cruce	Número de cruces	Descendencia			χ^2
		AA	AB	BB	
AAxAA	30	30(30)	0(0)	0(0)	0 N.S.
AAxAB	12	5(6)	7(6)	0(0)	0,32 N.S.
AB xAB	2	1(0,5)	1(1)	0(0,5)	1 N.S.

N.S. (no significativo)

ELDUQUE, ZARAGOZA Y RODELLAR

bandas de 6,2 kb y 5,3 kb con HindIII, y de 3,8 kb, 1,8 kb y 1,5 kb con PstI y el genotipo SAP-2^B/SAP-2^B posee los fragmentos de 6,2 kb con HindIII y 1,8 kb y 1,5 kb con PstI.

En la **tabla II** se muestra la distribución de las frecuencias génicas y genotípicas, la heterocigosidad y el índice de fijación de las poblaciones, así como la existencia de equilibrio genético y el

Tabla II. Distribución de frecuencias genotípicas observadas y esperadas, frecuencias génicas, χ^2 de equilibrio, heterocigosidad observada y esperada, índice de fijación (F) y contenido de información polimórfica (PIC) del locus SAP-2 en la especie bovina. (Distribution of observed and expected genotype frequencies, allele frequencies, χ^2 values, observed and expected heterozygosity, fixation index and polymorphic information content value, at the SAP-2 locus in cattle).

POBLACIONES		1	2	TOTAL
N		120	34	154
Frecuencias genotípicas observadas	SAP-2 ^A /SAP-2 ^A	0,73	0,41	0,66
	SAP-2 ^A /SAP-2 ^B	0,25	0,53	0,31
	SAP-2 ^B /SAP-2 ^B	0,02	0,06	0,03
Frecuencias genotípicas esperadas	SAP-2 ^A /SAP-2 ^A	0,72	0,46	0,65
	SAP-2 ^A /SAP-2 ^B	0,25	0,44	0,31
	SAP-2 ^B /SAP-2 ^B	0,03	0,10	0,04
Frecuencias Génicas	SAP-2 ^A	0,85±0,001	0,68±0,003	0,81±0,001
	SAP-2 ^B	0,15±0,001	0,53±0,003	0,31±0,001
χ^2 de equilibrio		0,046 N.S.	1,35 N.S.	0,013 N.S.
Heterocigosidad observada		0,25	0,53	0,31
Heterocigosidad esperada		0,255	0,435	0,308
Índice de fijación (F)		0,019	- 0,218	- 0,006
χ^2 de F		0,046 N.S.	1,62 N.S.	0,006 N.S.
P.I.C.		0,22	0,34	0,26
N.S. (No significativo)				

1: Muestra experimental recogida en España con individuos de las razas Asturiana de los Valles, de Lidia, Pirenaica, Frisona y Limousine. 2: Muestra experimental de Texas Agricultural Experiment Station Mc Gregor TX, correspondiente a individuos puros y cruzados de las razas Angus, Brahman, Charolais, Hereford, Holstein, Jersey y Red Polled.

SAP-2 RFLPS EN VACUNO

contenido de información polimórfica.

El alelo más frecuente en la población total ha sido SAP-2^A (0,81±0,001), debido a la presencia de más individuos homocigotos SAP-2^A/SAP-2^A (0,60) frente a heterocigotos (0,31). No obstante, la variabilidad de la población es alta (Het obs= 0,31) y por tanto el índice de fijación no es significativamente distinto de cero (-0,006) (Población en equilibrio genético).

Es importante indicar que cuando esta población bovina se estudia por separado en las dos poblaciones (Población 1: Animales de varias razas explotadas en España y Población 2: Rebaño experimental, véase Material Animal) la población 2, presenta frecuencias más intermedias que la 1 (0,68±0,003 frente a 0,85±0,01), lo cual implica una heterocigosidad mayor en aquella (0,53 frente a 0,25) y por tanto, la diferencia entre las frecuencias genotípicas observadas entre los homocigotos SAP-2^A/SAP-2^A y heterocigotos es menor (0,41 y 0,53 frente a 0,73 y 0,25). Este resultado es, por otra parte, justificable si se tiene en cuenta que la población 2 corresponde a un rebaño experimental con cruces entre distintas razas, lo cual puede dar lugar a una mayor heterocigosidad con respecto a otras razas más seleccionadas por el hombre.

En todos los casos (poblaciones 1, 2 y total) se observó equilibrio genético Hardy-Weinberg.

Respecto al contenido de información polimórfica (PIC), el valor para la población total ha sido 0,26. Según Botstein *et al.* (1980), este valor indica que el *locus* es informativo como marcador polimórfico. Este dato es importante ya que como sabemos el gen SAP-2 ha sido

asignado al grupo de sintenia U29 (Elduque *et al.*, 1993; Elduque y Womack, 1995), localizado en el cromosoma 28 (Gallagher *et al.* 1994). Este grupo U29 contiene genes como HK-1, RBP3 y PLAU. Por ello, como el gen SAP-2 ha resultado polimórfico, puede ser utilizado para estudios de ligamiento entre estos genes. Igualmente estos estudios pueden servir para ordenar y delimitar los tramos de conservación de ligamiento, ya que Elduque y Womack (1995) indican que hay una conservación entre las regiones cromosómicas en las que se ha asignado el gen SAP-2 humano y bovino. Concretamente la región HSA10q 21-q22 del cromosoma 10 humano (Kao *et al.*, 1985) y MMU10 y MMU14 de bovino. Estas regiones parecen más conservadas entre humano y bovino que entre humano y ratón.

El estudio de *loci* tipo I, como es el caso del gen SAP-2, y la búsqueda de su polimorfismo en la población constituye un primer paso necesario en los estudios de ligamiento entre los genes pertenecientes al grupo de sintenia U29, y otros que puedan asignarse posteriormente, para ordenar y establecer la distancia entre ellos, y poder realizar estudios de mapeo comparativo. Estos *loci* tipo I suelen representar zonas codantes y por tanto pueden ser genes relacionados con características fisiológicas y productivas que más tarde pueden ser estudiadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado gracias a los proyectos DGICYT PB92-1104 y DG12 Biotechnology CT92-0359 (BOVMAP EC project).

BIBLIOGRAFIA

- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331.
- Collard, M.W., S.R. Sylvester, J.K. Tsuruta and M.D. Griswold. 1988.** Byosynthesis and molecular cloning of sulfatated glycoprotein-1 secreted by rat Sertoli cells: sequence similarity with the 70 kDa precursor to sulfatide GM1 activator. *Biochem.*, 27: 4557-4564.
- Elduque, C., C. Rodellar y P. Zaragoza. 1993.** Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) en el locus bovino de la proteína activadora de esfingolipidos2 (SAP-2). XXVIII Jornadas Luso Españolas de Genética. Septiembre 1993. Algarve (Portugal).
- Elduque, C. and J.E. Womack. 1995.** Somatic cell mapping and Restriction Fragment analysis of the b-nerve growth factor and the sphingolipid activator protein-2 genes in cattle. *Genomics* (in press).
- Fisher, R.A. and F. Yates. 1963.** Statistical tables for biological. *Agricultural and Medical Research* 6ª Ed. Oliver and Boy. Edimburgo.
- Gallagher, D.S.Jr., A.M. Ryan, K. Sastry and J.E. Womack. 1994.** Somatic cell mapping of conglutinin (CGN1) to cattle syntenic group U29 and fluorescence *in situ* localization to chromosome 28. *Mammalian Genome* (in press).
- Hedrick, P.W. 1985.** Genetics of Populations. Jones and Barlett Publishers. Boston.
- Inui, K. and D.A. Wenger. 1983.** Concentrations of an activator protein for sphingolipid hydrolisis in liver and brain samples from patients with lysosomal storage diseases. *J. Clin. Invest.*, 72: 1622-1628.
- Jeanpierre, M. 1987.** A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucl. Acid. Res.*, 9611.
- Johansson, M., B. Chowdhary, F. Gu, H. Elloren, I. Gustavsson and L. Anderson. 1993.** Genetic analysis of the gene for porcine submaxillary gland mucin: physical assignement of the MUC and interferon β genes to chromosome 5. *Journal of heredity*, 84: 259-262.
- Kao, F.T., M.L. Law, J. Hartz, C. Jones, X.L. Zhang, N. Dewji, J.S. O'Brien and D.A. Wenger. 1985.** Regional localization of the gene coding for sphingolipid activator protein SAP-1 on human chromosome 10. *Somat. Cell Molec. Genet.*, 13: 685-688.
- Levene, H. 1949.** On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.*, 20: 91-94.
- Nathans, D. and H. Smith. 1975.** Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.*, 44: 273-293.
- Nel, M. 1987.** Molecular Evolutionary genetics. Columbia University Press. Nueva York.
- O'Brien, J. and Y. Kishimoto. 1991.** Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J.* 5: 301-308.
- O'Brien, S.J., J.E. Womack, L.A. Lyons, K.J. Moore, N.A. Jenkins and N.G. Copeland. 1993.** Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature genetics* 3, 103-112.

SAP-2 RFLPS EN VACUNO

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.

Swofford, D. L. and R.B. Selander. 1989. Biosys-1: A computer program for the analysis of allelic

variation in population genetics and biochemical systematics. Illinois Natural History Survey.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution.*, 19: 395-420.

Recibido: 20-6-94. Aceptado: 9-3-95.